

Inhibition der Proteinbiosynthese am proteinleitenden Sec61-Komplex durch kleine Moleküle

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Wolfgang Klein

aus Engelskirchen

2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.10.2011 bis 25.02.2018 in der Arbeitsgruppe Protein-Trafficking am Leibniz Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Zusammenarbeit mit der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Schülein durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Schülein
2. Gutachter: Prof. Dr. Helge Ewers

Disputation am: 01.06.2018

"Ein Gelehrter in einem
Laboratorium ist nicht nur ein Techniker, er steht auch vor den Naturvorgängen wie ein Kind
vor einer Märchenwelt."

Marie Curie - 1933 in Madrid

INHALTSVERZEICHNIS

I	Abbildungsverzeichnis	VI
II	Abkürzungsverzeichnis	VIII
III	Tabellenverzeichnis	XI
	EINLEITUNG	1
1.1	Der Sec61-Translokation-Pathway	1
1.1.1	Signalsequenzen	4
1.1.1.1	Signalpeptide (SP)	4
1.1.1.2	Signalankersequenzen (SAS)	5
1.1.2	Das Sec61-Translokation	6
1.1.2.1	Der Sec61-Komplex	6
1.1.2.2	Die integralen Membranproteine Sec62/Sec63	10
1.1.2.3	BiP (<i>Binding immunoglobulin protein</i>)	11
1.1.2.4	Calmodulin	11
1.1.2.5	TRAM (<i>Translocating chain-associated membrane protein</i>)	11
1.1.2.6	TRAP (<i>Translocon-associated protein</i>)	12
1.1.2.7	OST (Oligosaccharyltransferase)	12
1.1.2.8	Calnexin	12
1.2	Inhibition der Proteinbiosynthese am Sec61-Translokation	13
1.2.1	Nichtpeptidische Inhibitoren	13
1.2.2	Zyklodepsipeptidische Inhibitoren	14
1.2.2.1	Hun-7293	15
1.2.2.2	CAM741 und NF1028	16
1.2.2.3	Cotransin (CT)	16
1.1	Ziel der Arbeit	20
	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.2	Geräte	23
2.1.3	Software	25
2.1.4	Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	25
2.1.5	Desoxyribonukleinsäuren	26
2.1.5.1	Vektoren	26

2.1.5.2	Rekombinante Plasmide	26
2.1.5.3	Oligonukleotide	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1.1	DNA-Isolierung	29
2.2.1.2	Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese	29
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	30
2.2.1.4	Ligation	30
2.2.1.5	Zielgerichtete Mutagenese	30
2.2.1.6	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	32
2.2.2	Zellbiologische Methoden	33
2.2.2.1	Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin	33
2.2.2.2	Kultivierung der Zellen	33
2.2.2.3	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	34
2.2.2.4	Laser Scanning Mikroskopie (LSM)	34
2.2.2.5	Bioinformatische Methoden	35
2.2.2.6	Durchflusszytometrische Analyse der Proteinbiosynthese von Markerproteinen	36
2.2.2.7	Quantitative Detektion sekretierter GFP-Fusionsproteine	37
2.2.3	Hochdurchsatz-Fluoreszenzanalyse	40
2.2.3.1	Hochdurchsatz-Screen	40
2.2.3.2	Ermittlung von Konzentration-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen	42
2.2.3.3	Datenanalyse und statistische Auswertung des Hochdurchsatz-Screens	42
2.2.3.4	Zellfreies Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassay (87)	43
2.2.3.5	Strukturbasiertes Screening und Identifikation von FMP-401319 Analoga	44
2.2.4	Statistik	45
ERGEBNISSE		46
3.1	Bioinformatische Analyse der Ergebnisse der <i>Proteomics</i> -Studie	47
3.1.1	Analyse der Signalsequenzhydrophobizität	47
3.1.2	Längenanalyse der Signalsequenzen	49
3.1.3	Analyse der strukturellen und sterischen Eigenschaften der Signalsequenzen	49
3.1.4	Bioinformatische Identifikation des Konsensusmotivs in GPCR-Signalpeptiden ..	53
3.2	Experimenteller Nachweis der Korrelation zwischen der CT-Sensitivität einer SAS und dem identifizierten Konsensusmotiv	55
3.2.1	Durchflusszytometrische Qualifizierung der Expression der AQP2-Konstrukte nach Cotransinbehandlung	56
3.2.2	Mikroskopische Funktionsanalyse der SAS der AQP2-Konstrukte	58

3.3 Nachweis der Verantwortlichkeit des Konsensusmotivs für die CT-Sensitivität des SP des ET _B R	60
3.3.1 Alaninscan des ET _B R-SP.....	60
3.3.2 Analyse möglicher additiver Effekte der Punktmutationen	62
3.3.3 Hydrophobizitätsanalyse der erzeugten ET _B R SP-Mutanten	64
3.3.4 Funktionsanalyse der SP der relevanten ET _B R-Konstrukte	65
3.4 Entwicklung und Etablierung eines Hochdurchsatz-Screens zur Identifizierung von kleinen Molekülen, die den Sec61-Komplex inhibieren	67
3.4.1 Aufbau und Durchführung des Primärscreens	68
3.4.2 Etablierung ,Validierung und Durchführung des Sekundärscreens	69
3.4.3 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte.....	70
3.4.4 Auswahl der zur weiteren Analyse verwendeten Substanzen.....	70
3.4.5 Überprüfung der Selektivität der Substanzen in einem zellulären Biosyntheseassay mit verschiedenen Membranproteinen	73
3.4.6 Untersuchung des Wirkungsmechanismus der identifizierten Substanzen auf der Ebene des Sec61-Translokation-Pathways mit Hilfe eines zellfreien Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassays.....	75
3.4.7 Identifizierung von Analoga der Substanz FMP-401319 („ <i>Hit-Expansion</i> “)	77
3.4.8 Untersuchung des Wirkungsmechanismus der Substanz FMP-401319-3 auf der Ebene des Sec61-Komplexes	79
DISKUSSION	82
4.1 Identifikation eines strukturellen Konsensusmotivs in Signalsequenzen für die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cotransin	82
4.2 Entwicklung und Etablierung eines Hochdurchsatz-Screens zur Identifizierung von kleinen Molekülen, die den Sec61-Komplex inhibieren	86
Zusammenfassung	90
Summary	93
Anhang	95
A. 1 Überprüfung der Cotransin-Sensitivität ausgewählter Membranproteine aus der <i>Proteomics</i> -Studie mit Hilfe von Immunoblots	95
A. 2 Liste der, durch die Datenbanksuche identifizierten GPCR, die das Konsensusmotiv aufweisen.....	97
Literaturverzeichnis.....	99
Eigene Publikationen.....	107
Danksagung.....	108
Selbständigkeitserklärung	109

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema des sekretorischen Wegs	2
Abb. 2: Der Sec61-Translokation-Pathway	3
Abb. 3: Aufbau von Signalpeptiden (SP)	5
Abb. 4: Struktur des prokaryontischen SecYEG-Komplexes	7
Abb. 5: Orientierung der Signalsequenzen bei der Translokation	10
Abb. 6: Struktur von (A) Eeyarestatin und (B) Cyclotriazadisulfonamid	14
Abb. 7: Struktur von Hun-7293	15
Abb. 8: Struktur von (A) CAM741 und (B) NF1028	16
Abb. 9: Struktur von Cotransin	17
Abb.10: Modell der Cotransin-Interaktion mit dem Sec61-Komplex	18
Abb.11: Darstellung des Einflusses der Signalsequenzhydrophobizität auf die Cotransin-Sensitivität	48
Abb.12: Darstellung des Einflusses der Signalsequenzlänge auf die Cotransin-Sensitivität	49
Abb.13: Cotransin-Sensitivität von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen (SILAC-Experiment)	50
Abb.14: Sequenzalignment der 12 integralen Membranproteine mit cotransinsensitiver Signalankersequenz (SAS) und schematische Darstellung des identifizierten Konsensusmotivs	51
Abb.15: Signalpeptid des ET _B R mit dem Konsensusmotiv	54
Abb.16: Sequenzvergleich der SAS des wildtypischen AQP2 (WT.AQP2) mit der Mutante CM.AQP2	55
Abb.17: Darstellung der SAS vom IMP2C (A), WT.AQP2 (B) und CM.AQP2 (C)	56
Abb.18: Inhibition der Expression von CM.AQP2 durch Cotransin	57
Abb.19: Mikroskopische Analyse der SAS-Funktion von CM.AQP2.NT	59
Abb.20: Cotransin-Sensitivität des wildtypischen ET _B R im Vergleich zu den erzeugten SP-Mutanten	61
Abb.21: Expression des wildtypischen ET _B R und der Mutanten ET _B R.R10A.GFP, ET _B R.A14L.GFP, ET _B R.V16A.GFP, ET _B R.A18L.GFP, ET _B R.G20L.GFP und ET _B R.R23A.GFP	62
Abb.22: Cotransin-Sensitivität des 4M.ET _B R.GFP-Konstrukts	63
Abb.23: Hydrophobizitätsanalyse der ET _B R-Signalpeptid-Einzelmutanten im Vergleich zum wildtypischen SP des ET _B R	64
Abb.24: Sekretionsanalyse der SP-Mutanten der ET _B R-GFP-Fusionen	66
Abb.25: Übersicht des Primär- und Sekundärscreens	68

Abb.26: Schematische Darstellung der Ergebnisse des Sekundärscreens	70
Abb.27: Molekülstrukturen und Eigenschaften der Substanzen FMP-503533, FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219	72
Abb.28: Überprüfung der Selektivität der Inhibitoren FMP-503533, FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219	74
Abb.29: Zellfreier Assay: Aktivitäten der Substanzen gegen den Sec61-Translokation-Pathway	76
Abb.30: Zelluläres Biosyntheseassay mit kommerziell erhältlichen Analoga der Substanz FMP-401319	78
Abb.31: Die Substanz FMP-401319-3 inhibiert die cotranslationale Translokation von CRF ₁ R-pPL auf der Ebene des Sec61-Komplexes	81
A.1 Überprüfung der Cotransin-Sensitivität ausgewählter Membranproteine aus der <i>Proteomics</i> -Studie mit Hilfe von Immunoblots	95

II Abkürzungsverzeichnis

A

a.u.	<i>Arbitrary unit</i> , unskalierte Einheit
Abb.	Abbildung
Acyl-CoA	<i>Acyl-CoA desaturase</i>
AGPR1	<i>Asialoglycoprotein receptor 1</i>
AS	Aminosäure
AQP2	Aquaporin 2

B

BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i> , Immunglobulin-bindendes Protein
-----	---

C

°C	Grad Celsius
CADA	Cyclotriazadisulfonamide
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i> , cyanfluoreszierendes Protein
CRF ₁ R	<i>Corticotropin-releasing factor receptor type 1</i>
CRF _{2(a)} R	<i>Corticotropin-releasing factor receptor type 2a</i>
CT	Cotransin

D

DMSO	Dimethylsulfoxid
DACS	<i>Database of Available Chemical Substances</i>

E

ECE-1	<i>Endothelin-converting enzyme 1</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> , endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation pathway</i>
ERGIC	<i>ER-Golgi intermediate compartment</i> , ER-Golgi-Intermediärkompartiment
Erlin1	<i>ER lipid raft-associated protein -1</i>
Erlin2	<i>ER lipid raft-associated protein -2</i>
ET _B R	Endothelin-B-Rezeptor

F

FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FSC	<i>Forward-scatter</i> , Vorwärtsstreulichtquelle
FKS	fetales Kälberserum
Fw	<i>Forward</i>

G

GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
------	--

H	
h	<i>Hour</i> , Stunde
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HER3	<i>Human epidermal growth factor receptor 3</i>
HLA II	<i>HLA class II histocompatibility antigen gamma chain</i>
Hsp	<i>Heat shock protein</i> , Hitzeschock-Protein
I	
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IMP2B	<i>Integral membrane protein 2 B</i> , integrales Membranprotein 2 B
IMP2C	<i>Integral membrane protein 2 C</i> , integrales Membranprotein 2 C
K	
KRH	Krebs-Ringer-Hepes-Bicarbonat Puffer
kDa	Kilodalton
L	
LIMP2	<i>Lysosome membrane protein 2</i>
LHR	Luteinizing hormone receptor
LSM	<i>Laser scanning microscopy</i> , Laser Scanning Mikroskopie
M	
MAD	Mittlere absolute Abweichung vom Median
MBS	<i>Multi beam splitter</i>
MHC I	<i>Major Histocompatibility Complex class I antigen</i>
Min	Minute
N	
n/s	keine Informationen über die N-terminale Ausrichtung vorhanden
Nc	zytosolischer N-Terminus
NC	naszierende Kette
Ne	extrazellulärer N-Terminus
O	
OST	Oligosaccharyltransferase
OD	Optische Dichte
P	
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PSP	Pseudo-Signalpeptid
PAR1	Protease-Aktivierter Rezeptor 1
pPL	bovines pre-Prolactin
PK	Proteinkinase K
PU	Puromycin

R

RNC	<i>Ribosom nascent chain SRP complex</i> , Ribosom-naszierende Polypeptidkette-Komplex
Rev	<i>Revers</i>
RM	pankreatische raue mikrosomale Membranen
RT	Raumtemperatur

S

SAS	Signalankersequenz
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i> , stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur
SP	Signalpeptid
SRP	<i>Signal recognition particle</i> , Signalerkennungspartikel
SR	<i>Signal recognition particle receptor</i> , Signalerkennungspartikel-Rezeptor
SSC	<i>Side-scatter</i> , Seitwärtsstreulichtquelle
Sub	Substanz

T

TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
TM	Transmembrandomäne
TMEM230	<i>Transmembrane protein 230</i> , Transmembranprotein 230
TM Prot2	<i>Transmembrane protein 2</i> , Transmembranprotein 2
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> ,
TRAM	<i>Translocating chain-associated membrane protein</i>
TRAP	<i>Tranlocon associated protein</i>
TSHR	Thyrotropin Rezeptor

U

UE	Untereinheiten
----	----------------

V

V ₂	Vasopressin V ₂ Rezeptor
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor

W

WDI	World-Drug-Index
WT	Wild Typ

Sonstige

λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
Å	Angström
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol

X

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1.1: Material	21-22
Tabelle 2.1.2: Geräte	23-24
Tabelle 2.1.3: Software	25
Tabelle 2.1.4: Verwendete Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	25
Tabelle 2.1.5.1: Verwendete Vektoren	26
Tabelle 2.1.5.2: Verwendete Plasmide	26-28
Tabelle 2.1.5.3: Verwendete Oligonukleotide	28-29
Tabelle 2.2.1.5: Standard PCR-Programm für die zielgerichtete Mutagenese	31
Tabelle 2.2.2.3: Transfektion von HEK293-Zellen	34
Tabelle 2.2.2.7: SDS-Gel Ansatz	39
Tabelle 3: Ergebnisse der <i>Proteomics</i> -Analyse	46
Tabelle 3.1.4: GPCR mit Signalpeptid und gesamtem Konsensusmotiv	53
Tabelle A.2: Liste der, durch die Datenbanksuche identifizierten GPCR, die das Konsensusmotiv aufweisen	97-98

EINLEITUNG

1.1 Der Sec61-Translokon-Pathway

Die Verteilung von Proteinen auf die unterschiedlichen Kompartimente von eukaryontischen Zellen ist auf eine Vielzahl verschiedener Transportsysteme angewiesen (1, 2) (Abb. 1). Der sekretorische Weg nimmt dabei eine Schlüsselfunktion ein (Abb. 1). Er verläuft über das endoplasmatische Retikulum (ER), das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und die einzelnen Kompartimente des Golgi-Apparats zur Plasmamembran (3). Integrale Membranproteine dieser Kompartimente werden mit Hilfe des Sec61-Translokon-Pathways zunächst in die ER-Membran integriert und dann in der Membran von Vesikeln zu ihrem Bestimmungsort transportiert (3-5). Lösliche Proteine, wie z.B. sekretorische Proteine, werden initial über die ER-Membran in das ER-Lumen transportiert und dann im Inneren von Vesikeln zu ihrem Bestimmungsort transportiert (3, 6, 7). Der erste Schritt dieses sekretorischen Wegs, die Integration von Proteinen in die ER-Membran, beziehungsweise der Transport über diese hinweg mit Hilfe des Sec61-Translokon-Pathways, ist für diese Arbeit von zentraler Bedeutung. Um eine Übersicht zu geben, soll der Sec61-Translokon-Pathway und seine Verbindung zum sekretorischen Weg im Folgenden, am Beispiel eines sekretorischen Proteins, in Kurzform dargestellt werden (Abb. 2A).

Der Sec61-Translokon-Pathway beginnt am zytosolischen Ribosom mit der Synthese der naszierenden Polypeptidkette und der Synthese des Signalpeptids (SP). Nach der Synthese des SP wird dieses vom Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt und gebunden. Die Translation wird verzögert oder angehalten und der Transport des entstandenen Komplexes (Ribosom, naszierende Polypeptidkette, SRP = RNC) zum SRP-Rezeptor (SR) der ER-Membran eingeleitet (Abb. 2A) (7, 8). Der SR ist für den Transfer des RNC zum Sec61-Translokon verantwortlich, dessen wichtigster Bestandteil ein proteinleitender Kanal ist. Während dieser Bindung dissoziiert der SRP und die ribosomale Translation wird fortgesetzt (7). Die Signalsequenz interagiert mit der zytosolischen Seite des Sec61-Translokons in seiner geschlossenen Konformation und destabilisiert diese. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und zur transversalen Öffnung des proteinleitenden Kanals, wodurch die Translokation der naszierenden Kette über die ER-Membran ermöglicht wird. Das Signalpeptid verlässt das Translokon über eine laterale Öffnung des proteinleitenden Kanals

und wird zunächst Bestandteil der ER-Membran. Durch die Abspaltung des SP wird die translozierte Kette des sekretorischen Proteins in das ER-Lumen entlassen.

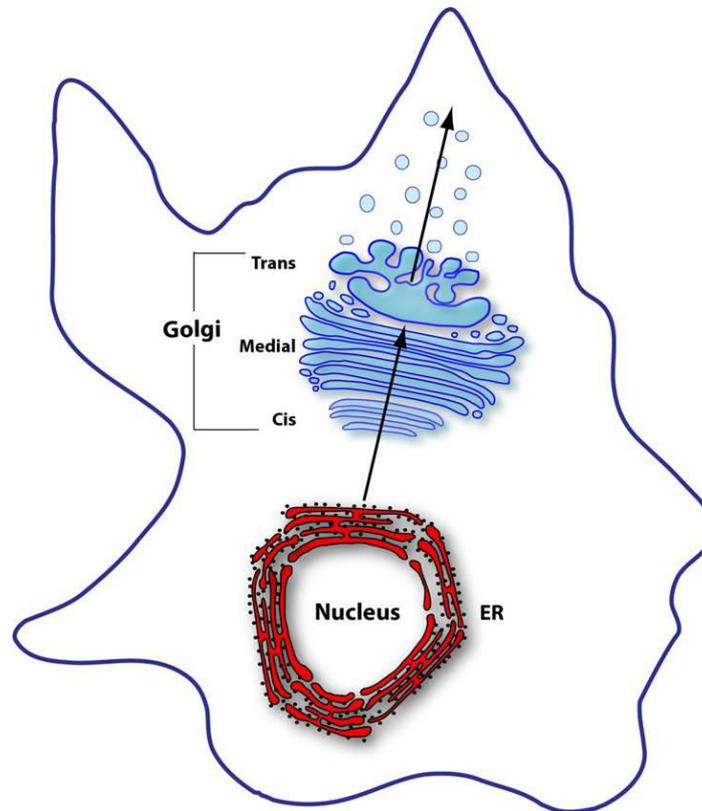


Abb. 1: Schema des sekretorischen Wegs. Der sekretorische Weg vermittelt die Freisetzung sekretorischer Proteine ins extrazelluläre Milieu und die Integration von Proteinen in Membranen. Der Sec61-Translokations-Pathway ist der erste Schritt des intrazellulären Transports (siehe auch Abb. 2). Die naszierende Polypeptidkette wird durch das Sec61-Translokon mit Hilfe von Signalsequenzen ins ER-Lumen transloziert (sekretorische Proteine) oder in die ER-Membran integriert (integrale Membranproteine). Anschließend erfolgt der vesikuläre Transport der Proteine über das ERGIC und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran. Dort werden sekretorische Proteine aus der Zelle entlassen, Membranproteine werden Teil der Plasmamembran.

Sekretorische Proteine verfügen immer über SP, die den oben beschriebenen Mechanismus vermitteln. Integrale Membranproteine können ebenfalls SP aufweisen. Die Mehrzahl verfügt aber über sogenannte Signalankersequenzen (SAS) – meist die ersten Transmembrandomänen (TM) – die an den reifen Proteinen verbleiben (9-11). Die Integration von Membranproteinen in die ER-Membran ist ähnlich (Abb. 2B): Die später extrazellulären Domänen werden transversal transloziert, die TMs verlassen das Sec61-Translokon durch die seitliche Öffnung und die intrazellulären Domänen verbleiben auf der zytosolischen Seite (9-11).

Der weitere Transport der neu synthetisierten Proteine erfolgt in Vesikeln vom ER über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat hin zur Plasmamembran oder anderen intrazellulären Membrankompartimenten (Abb. 1). An der Plasmamembran werden sekretorische Proteine durch die Fusion der Vesikel ins

extrazelluläre Milieu entlassen und integrale Membranproteine in die Plasmamembran integriert. Im Verlauf des sekretorischen Wegs werden die Proteine gefaltet und posttranslational modifiziert. Im ER werden z.B. mannosereiche N-Glykosylierungen angefügt, die im Verlauf der Passage durch den Golgi-Apparat und durch komplexe Glykane ersetzt werden. Zusätzlich können z.B. O-Glykosylierungen an Hydroxylgruppen im Golgi-Apparat geknüpft werden (12, 13).

Die Faltung der Proteine wird hauptsächlich im ER durch Chaperone unterstützt, die auch bei der Qualitätskontrolle, der Faltung, eine wichtige Rolle spielen. (14, 15).

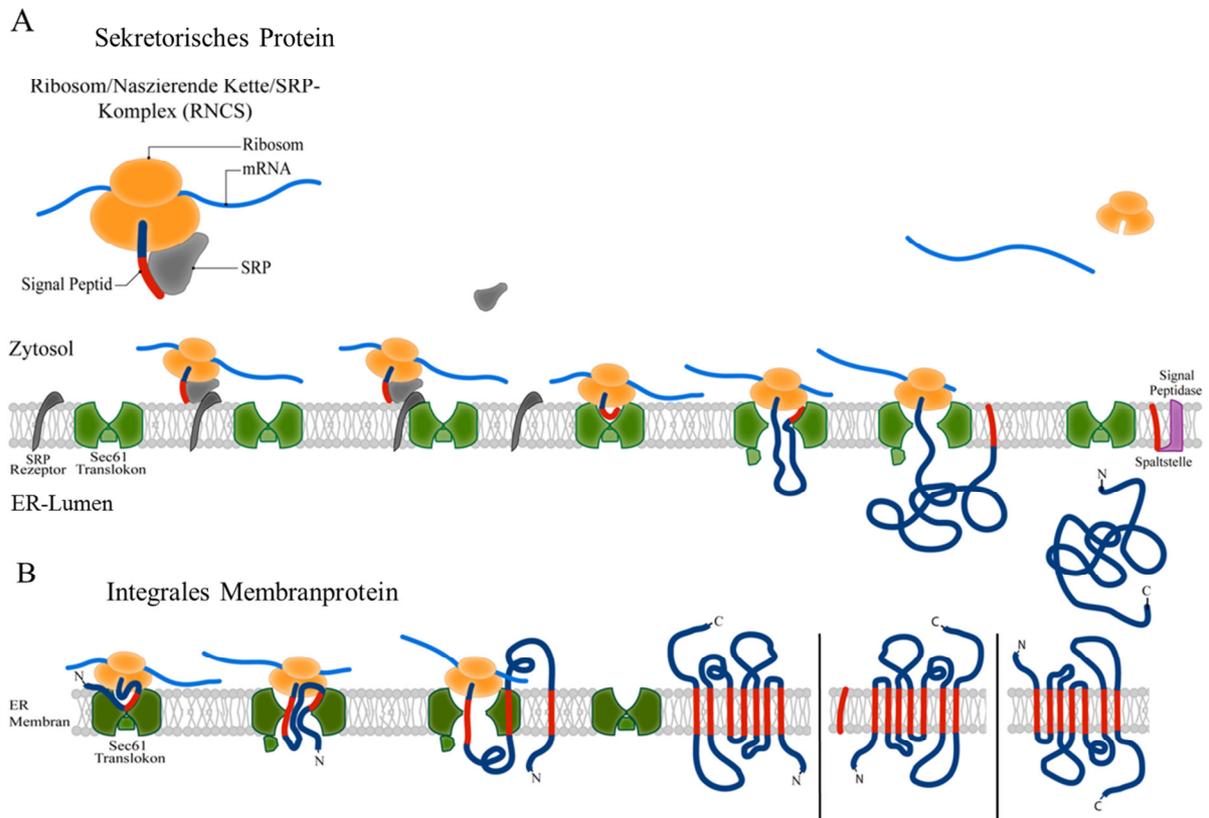


Abb. 2: Der Sec61-Translokon-Pathway. (A) Sekretorische Proteine: Ausgehend vom rauhen ER, translatiert ein Ribosom eine mRNA bis zur Ausbildung der naszierenden Kette. Die Bindung des SRP an den RNC bedingt einen Translationsstopp und vermittelt den Transport an die ER-Membran und die Bindung des SR. Der SR vermittelt den Transport des RNC zum Sec61-Translokon und unterstützt die Bildung einer temporären Bindung zwischen RNC und Sec61-Translokon. Der SRP dissoziiert und die Translation beginnt erneut. Durch die Bindung der Signalsequenz auf der zytosolischen Seite des Kanals erfolgt eine Destabilisierung der geschlossenen Konformation und anschließend die transversale Öffnung des Kanals. Die sogenannte Plug-Domäne schwingt zur Seite und die Proteinsynthese kann durch das Sec61-Translokon ins ER-Lumen erfolgen. Die Integration des SPs in die ER-Membran wird durch die laterale Öffnung des Kanals ermöglicht. Das SP wird durch die Signalpeptidase abgespalten. **(B) Integrale Membranproteine:** Integrale Membranproteine verfügen über SP oder über SAS. Die später extrazellulären Domänen werden transversal transloziert, die TMs verlassen das Sec61-Translokon durch die seitliche Öffnung, die intrazellulären Domänen verbleiben auf der zytosolischen Seite.

Im oberen Abschnitt wurden die Grundzüge des initialen Transports von sekretorischen und Membranproteinen skizziert. Im Folgenden sollen die einzelnen Mechanismen und strukturellen Voraussetzungen, auf Ebene der zu transportierenden Proteine und der Komponenten des Sec61-Translokation-Pathways, näher beleuchtet werden.

1.1.1 Signalsequenzen

Hauptfunktion der Signalsequenzen sind die Bindung des SRP und somit die Bildung des RNC, sowie die Interaktion mit dem Sec61-Translokation, wodurch die Konformationsänderung von der geschlossenen in die offene Form ermöglicht wird (16). Darüber hinaus haben Signalsequenzen Einfluss auf die Effizienz der Translation/Translokation und können die Zeitspanne verändern, die ein Protein im ER verbleibt. Verschiedene Arten von Signalsequenzen sind in der Lage weitere Funktionen zu übernehmen, wie beispielsweise die Determinierung der Orientierung eines Proteins in der Membran (17, 18). Drei Eigenschaften, die alle Signalsequenzen aufweisen, sind ihre helikale Sekundärstruktur, ihre starke Hydrophobizität und die Ausbildung verschiedener Regionen innerhalb der Signalsequenz. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des SRP maßgeblich auf der Hydrophobizität der Signalsequenzen beruht. Jedoch war es trotz des grundsätzlich ähnlichen Aufbaus der Signalsequenzen bisher nicht möglich, spezifische Aminosäurereste oder -positionen zu bestimmen, die für die Destabilisierung der geschlossenen Konformation des Sec61-Translokons verantwortlich sind. Die Aminosäureabfolgen der Signalsequenzen sind hochgradig variabel und unterscheiden sich selbst bei stark homologen Proteinen signifikant voneinander (7, 19). Es sind zwei Typen von Signalsequenzen bekannt: Signalpeptide und Signalankersequenzen.

1.1.1.1 Signalpeptide (SP)

Alle sekretorischen Proteine und einige integrale Membranproteine weisen Signalpeptide (SP) auf. SP sind direkt am N-Terminus des Proteins lokalisiert, werden während der Translokation zunächst durch die laterale Öffnung des Sec61-Translokons in der ER-Membran verankert und im fortschreitenden Prozess oder nach der Translokation von der Signalpeptidase abgespalten (20, 21). Eine Ausnahme stellt z.B. der *Corticotropin-releasing factor receptor type 2a* (CRF_{2(a)}R) dar, welcher über ein Pseudo-Signalpeptid (PSP) verfügt,

das nicht vom reifen Protein abgespalten wird (22, 23). Alle SP sind zwischen 15 und 50 Aminosäuren lang und zeigen eine Aufteilung in drei Bereiche (Abb. 3) (24):

- (i) Eine n-Region am N-Terminus, die positiv geladene Aminosäurereste enthält.
- (ii) Eine zentrale h-Region, die den hydrophoben Kern bildet und aus 6-15 Aminosäureresten besteht. Diese Region ist essenziell für die Bindung des SRP, die Öffnung des Sec61-Translokons und für die Translokation selbst (25).
- (iii) Eine c-Region am C-Terminus, die polare und auch oft helixbrechende Aminosäuren (AS) aufweist. In Position -3 und -1 befinden sich kleine ungeladene AS, die die Spaltstelle für die Signalpeptidase darstellen (26, 27).

Signalpeptide

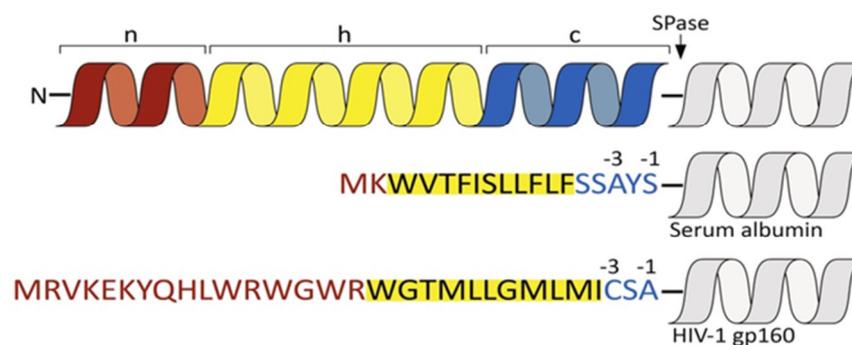


Abb. 3: Aufbau von Signalpeptiden (SP). SP sind am unmittelbaren N-Terminus des Proteins lokalisiert und verfügen über drei verschiedene Bereiche: eine positiv geladene N-terminale Region (n), eine hydrophobe Kernregion (h) und eine polare C-terminale Region (c), die an Position -3 und -1 kleine ungeladene Aminosäurereste aufweist (Spaltstelle für die Signalpeptidase) (28).

1.1.1.2 Signalankersequenzen (SAS)

Auch Membranproteine können über ein SP verfügen. Der größte Teil der integralen Membranproteine weist aber Signalankersequenzen (SAS) auf. In der Regel übernimmt die erste TM des Proteins die SAS-Funktion und somit eine Doppelrolle. Wie SP, sind auch SAS für die Bindung und Öffnung des Sec61-Translokons notwendig und dienen der Verankerung des reifen Proteins in der Membran (28, 29). SAS sind damit nicht am unmittelbaren N-Terminus des Proteins lokalisiert. Dadurch muss, nach der Öffnung des Sec61-Translokons, zuerst der schon fertig synthetisierte N-Terminus posttranslational über die ER-Membran transportiert werden. Der Rest des Proteins wird anschließend wieder cotranslational in die ER-Membran eingebacht (21). Membranproteine mit langen, schwer translozierbaren, extrazellulären N-Termini haben daher häufig SP, um diese Problematik zu umgehen (das SP

induziert hier durch SRP-Bindung einen Translationsstopp bevor der eigentliche N-Terminus synthetisiert wird).

SAS unterscheiden sich in einigen Aspekten von SP. Zum einen sind sie länger und stärker hydrophob. Zum anderen sind Ladungen – wenn überhaupt – nur an der Grenzfläche lokalisiert. Die Ladungen an den Grenzflächen sind dabei meist den negativen Ladungen der Membranphospholipide entgegengesetzt (28, 29).

1.1.2 Das Sec61-Translokon

Die Mehrheit aller sekretorischen und integralen Membranproteine wird durch das Sec61-Translokon transloziert, welches einen proteinleitenden Kanal bildet. Dieser ermöglicht die Translokation über oder die Integration in die ER-Membran. Das Sec61-Translokon ist ein Komplex aus einer Vielzahl verschiedener Proteine (7, 30, 31), dessen Kern der eigentliche Sec61-Komplex darstellt (32). Weitere permanente Bestandteile sind das *Translocating chain-associated membrane protein* (TRAM) (33), das *Translocon associated protein* (TRAP) (34) und die Oligosaccharyltransferase (OST) (35). Zusätzlich zu den permanenten Bestandteilen des Sec61-Translokons gibt es Proteine, die nur während des Translokationsprozesses mit dem Komplex assoziiert sind. Zu diesen gehören unter anderem luminaire Chaperone, wie Calnexin (36), Calmodulin (37), das *Binding immunoglobulin protein* (BiP) (37, 38), sowie Sec62 und Sec63 (39). Ob während des Prozesses der Translokation die verschiedenen Signalsequenzen auf die Unterstützung zusätzlicher Proteine angewiesen sind und welche sequenzspezifischen Voraussetzungen Signalsequenzen hierfür mitbringen müssen, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. (30)

1.1.2.1 Der Sec61-Komplex

Der Sec61-Komplex wird aus den drei heterotrimeren Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ gebildet. Dabei stellt die Sec61 α -Untereinheit (UE) mit zehn α -helikalen TM und einer molekularen Masse von 52 kDa den Hauptbestandteil des Sec61-Translokons dar und bildet den proteinleitenden Kanal aus (40). Die Betrachtung von der zytosolischen Seite der kompakt gebündelten zehn TM der Sec61 α -UE zeigt eine Art Klappgehäuse, welches die TM in zwei Bereiche unterteilt: TM 1-5 und TM 6-10 (6). Die Helices fünf und sechs sind durch eine zytoplasmatische Schleife miteinander verbunden, die als Hinge-Region oder „Rückgrat“ der lateralen Öffnung fungiert (Abb. 4). Die Konformationsänderung wird durch das Binden der Sec61 γ -UE stabilisiert. Die Sec61 γ -UE weist eine TM auf und hat eine Masse von etwa 8

kDa (Abb. 4). Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Sec61 γ -UE essenziell für den Translokationsprozess ist. Die laterale Öffnung findet durch das Auseinanderdriften der Helices 2/3 und 7/8, auf der gegenüberliegenden Seite des Kanals, statt (41) (Abb. 4). Die Sec61 β -UE ist ebenfalls an die Sec61 α -UE assoziiert und trägt zur Stabilität des Sec61-Komplexes bei. Sie ist jedoch nicht essenziell für die Proteintranslokation (6, 42, 43). Die Sec61 β -UE weist bei Säugern eine TM auf und hat eine Masse von 12 kDa. Weiterhin interagiert die Sec61 β -UE mit dem SR und der Signalpeptidase in Hefe (43) (Abb. 4). Bisher ist nur die Kristallstruktur des prokaryontischen SecYEG-Komplexes publiziert (Abb. 4). Neuere Cryo-EM-Strukturen für den Sec61-Komplex zeigen aber (44, 45), dass beide Kanäle nicht nur strukturell, sondern auch funktionell stark homolog sind, sodass sich die Befunde des SecYEG-Komplexes auf den Sec61-Komplex übertragen lassen.

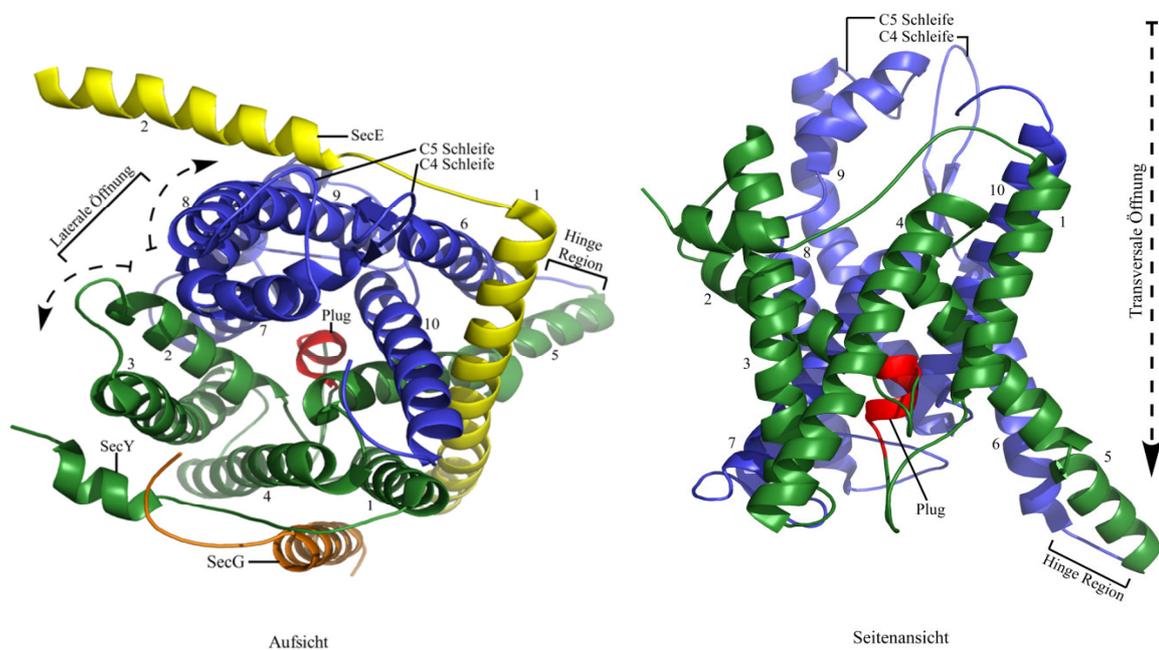


Abb. 4: Struktur des prokaryontischen SecYEG-Komplexes. (PDB: 1RHZ) SecY ist in Blau und Grün dargestellt (Sec61 α in Eukaryonten), SecG in Orange (Sec61 β in Eukaryonten) und SecE in Gelb (Sec61 γ in Eukaryonten). Der SecYEG-Komplex unterscheidet sich vom Sec61-Komplex v.a. durch eine zusätzliche, nicht membranständige Helix in SecE (linkes Bild oben), die bei Sec61 γ fehlt. Die proteinleitende SecY (Sec61 α)-Untereinheit besteht aus 10 transmembranären Helices, wobei das Auseinandergleiten von Helix 2/3 und 7/8 die laterale Öffnung des Kanals ermöglicht. Die flexible Hinge-Region des Kanals ist gegenüberliegend, zwischen Helix 5 und 6, lokalisiert. SecE (Sec61 γ) stabilisiert die laterale Öffnung zusätzlich. Die C4- und C5-Schleifen sind für die initiale Bindung des Ribosoms essenziell. Die Plug-Domäne, die den Kanal ER-luminal schließt, ist in Rot dargestellt und ist bei geschlossener Konformation in der Mitte des Kanals lokalisiert. Während der Öffnung schwingt sie zur Seite. SecG (Sec61 β) ist ebenfalls mit dem proteinleitenden Kanal assoziiert. In der Seitenansicht ist der sanduhrförmige Aufbau des SecYEG-(Sec61-) Komplexes in der geschlossenen Konformation zu erkennen. Bei einer transversalen Öffnung des Kanals vergrößert sich durch Verschiebung der Helices der Innendurchmesser des Kanals um 35 Å.

Bei einer seitlichen Betrachtung des Sec61-Komplexes im geschlossenen Zustand zeigt sich eine sanduhrförmige Struktur, die jeweils einen Trichter mit der Öffnung zur zytosolischen und zur luminalen Seite der ER-Membran ausbildet. Die zytosolische Seite des Kanals bleibt leer. Von der luminalen Seite verschließt eine kurze Helix den Kanal, die sogenannte Plug-Domäne, und verhindert so eine Permeabilität für kleine Moleküle (Abb. 4). Dies wird durch den sogenannten Porenring zusätzlich unterstützt, der die zehn TM des Sec61-Komplexes in der Mitte umschließt. Der Porenring besteht aus AS mit großen hydrophoben Seitenketten (6, 10, 11, 30, 46). Die zytosolischen Schleifen C4 (zwischen TM 6 und 7) und C5 (zwischen TM 8 und 9) vermitteln die Bindung des Ribosoms an den Sec61-Komplex und dadurch, nach Bindung einer Signalsequenz in den zytosolischen Bereich von Sec61 α , die Öffnung des Kanals. Es konnte noch nicht geklärt werden, wo und wie genau die Bindung der Signalsequenz erfolgt, allerdings wird angenommen, dass hierfür v.a. die Hydrophobizität der Signalsequenz eine Rolle spielt (47). Neuere Daten weisen auf einen Assoziationsprozess mit mehreren intermediären Zuständen hin: Die Bindung erfolgt wahrscheinlich initial am zytosolischen Rand des Kanals und dehnt sich dann im weiteren Verlauf bis zur Plug-Domäne aus. Es ist jedoch zweifelhaft, ob dieser Vorgang tatsächlich ausschließlich auf der Hydrophobizität der Signalsequenzen beruht (47).

Durch die Bindung der Signalsequenz destabilisiert sich die geschlossene Konformation des Kanals und es kommt zur Konformationsänderung und somit zur Öffnung. Während dieses Prozesses erfolgt die Translation der naszierenden Kette bis auf eine Länge von mehr als 70 Aminosäureresten. Die Plug-Domäne schwingt zur Seite, der Porenring lockert sich und die transmembranären Helices erweitern ihren Abstand zueinander. Dabei vergrößert sich der äußere Durchmesser des Kanals nur von 100 Å auf 110 Å, der innere Durchmesser allerdings erweitert sich von 15 Å auf 50 Å. Der stark vergrößerte Innendurchmesser ermöglicht im Folgenden die transversale Translokation von Proteinen (sekretorische Proteine) oder Proteindomänen (Membranproteine) durch den Kanal ins ER (9, 10, 30, 48) (Abb. 5). Es konnte gezeigt werden, dass der Porenring und die Plug-Domäne möglicherweise Einfluss auf die korrekte Öffnung und Schließung des Kanals nehmen, sowie auf dessen Substratspezifität und Bindung von Signalsequenzen (47, 49-51). Welche Orientierung die Aminosäurekette im proteinleitenden Kanal während der Translokation einnimmt, wird durch verschiedene Eigenschaften der Signalsequenzen bestimmt, welche jedoch noch nicht vollständig geklärt sind.

Bei Membranproteinen legt die Orientierung der Signalsequenz auch die Topologie des restlichen Proteins fest. Verfügt das Membranprotein über ein SP, so wird das Protein später einen extrazellulären N-Terminus haben, da sich SP immer mit dem N-Terminus zum Zytosol drehen (Abb. 5A). Hat das Membranprotein dagegen eine SAS, entscheidet deren Orientierung über die spätere Topologie des Proteins. Nach der Lokalisation des N-Terminus werden zwei Typen von Membranproteinen unterschieden. Bei Typ I integralen Membranproteinen liegt der N-Terminus initial auf der ER-luminalen Seite und ist somit später extrazellulär lokalisiert (Abb. 5B). Typ II integrale Membranproteine weisen dagegen einen zytosolisch lokalisierten N-Terminus auf (Abb. 5C). Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Ladungsverteilung entlang der SAS für deren Orientierung verantwortlich ist. Durch das Fehlen von geladenen Aminosäureseitenketten in der n-Region und einer ausgeprägten h-Region entsteht ein Typ I integrales Membranprotein. Geladene AS im N-terminalen Bereich und eine kürzere h-Region favorisieren hingegen den Typ II (28). Während Typ II integrale Membranproteine immer eine SAS haben, verfügen Typ I integrale Membranproteine entweder über ein SP oder eine SAS. Sehr wichtige Typ I integrale Membranproteine sind z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*, GPCR), die auch im Verlauf dieser Arbeit eingesetzt wurden. GPCR bilden eine der größten Proteinfamilien im menschlichen Genom und sind die Zielmoleküle für etwa 60% aller derzeit eingesetzten Arzneimittel (52). Anhand von GPCR konnte in vergleichenden Studien gezeigt werden, dass bei Typ I integralen Membranproteinen die Eigenschaften der N-Termini der Proteine bestimmen, ob ein SP oder eine SAS vorhanden ist (53).

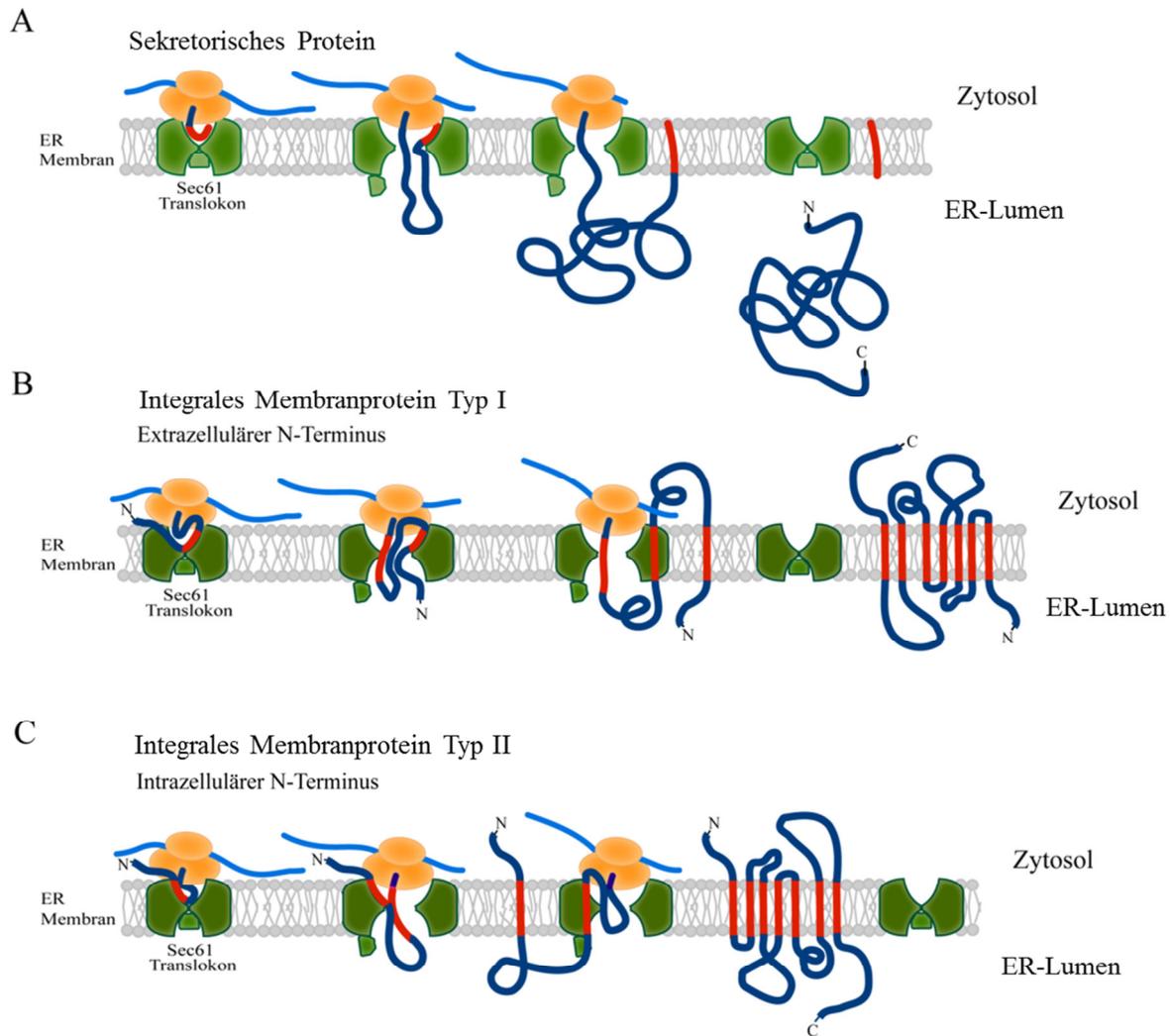


Abb. 5: Orientierung der Signalsequenzen bei der Translokation. (A) Die Translokation sekretorischer Proteine erfolgt durch den transversal geöffneten Kanal direkt ins ER-Lumen. Das SP des Proteins bildet während der Translokation zunächst eine Haarnadelschleife aus und wird während des Prozesses durch die laterale Öffnung des Kanals seitlich in die ER-Membran eingebettet. Durch die anschließende Abspaltung des SP ist das sekretorische Protein danach im ER-Lumen lokalisiert. (B) Typ I integrale Membranproteine haben einen ER-luminalen und später extrazellulären N-Terminus. Hierzu gehören auch alle Membranproteine, die ein zusätzliches SP haben. (C) Typ II integrale Membranproteine haben einen zytosolischen N-Terminus. Bei Typ I und Typ II integralen Membranproteinen mit SAS (hier in B und C dargestellt) entscheidet die Orientierung der SAS über die spätere Topologie des Proteins.

1.1.2.2 Die integralen Membranproteine Sec62/Sec63

Das integrale ER-Membranprotein Sec62 scheint eine wichtige Rolle bei der selteneren posttranslationalen Translokation von Proteinen über das Sec61-Translokon zu spielen (54). Es weist zwei TM und einen positiv geladenen zytosomatischen N-Terminus auf. Sec63 ist ebenfalls ein integrales ER-Membranprotein mit einem negativ geladenen zytosomatischen C-Terminus, der mit dem N-Terminus von Sec62 interagiert. Sec63 scheint aber auch unabhängig von Sec62 zu funktionieren (55, 56). Sec63 wirkt unterstützend bei der co- und

posttranslationalen Translokation und zählt zur Familie der Hitzeschock-Proteine 40kD (*heat shock protein* 40kD, Hsp40). Es verfügt zwischen der zweiten und dritten TM über eine charakteristische J-Domäne, die im ER-Lumen mit BiP, einem Chaperon der Proteinfamilie Hitzeschock-Protein 70kD (Hsp70), interagiert (39, 57, 58).

1.1.2.3 BiP (*Binding immunoglobulin protein*)

BiP ist ein multifunktionales Chaperon der Hsp70 Proteinfamilie und übernimmt verschiedene Aufgaben während der Translokation. Es unterstützt das Einführen der Prä-Proteine in das Sec61-Translokon und begünstigt die Konformationsänderung des Sec61-Komplexes (37, 38) nach der Signalsequenzbindung. Ferner wurde gezeigt, dass BiP während der frühen Translokation, im Verlauf der Öffnung des Sec61-Komplexes, die luminalen Seite von Sec61 α verschließt (37). Im weiteren Verlauf unterstützt BiP die Translokation der naszierenden Kette durch ATP-abhängiges Öffnen und Schließen der luminalen Seite von Sec61 α . Darüber hinaus fungiert BiP während der Translokation als eine Art molekulares Schaltrad, welches die naszierende Kette durch das Translokon zieht (31, 59). Die Assoziation an den Sec61-Komplex erfolgt über das Co-Chaperon Sec63 an die zytosolische Schleife 7 von Sec61 α (60-62).

1.1.2.4 Calmodulin

Der passive Austritt von Calcium (Ca^{2+}) aus dem ER ins Zytoplasma, in Folge der Öffnung und Schließung des Sec61-Komplexes, wird auf der luminalen Seite durch BiP verhindert. Dieser Prozess wird in höheren Eukaryonten zusätzlich von der zytosolischen Seite durch Calmodulin unterstützt. Calmodulin hat eine Masse von 17 kDa und ist ein wichtiger Modulator bei einer großen Anzahl von Ca^{2+} abhängigen Enzymen, Kanälen und anderen Proteinen (63). Sec61 α weist an seinem zytosolischen N-Terminus eine hochaffine Bindungsstelle für Calmodulin (IQ-Motiv) auf. Diese bindet Ca^{2+} beladenes Calmodulin und verhindert so in Kombination mit BiP den Einstrom von Ionen aus dem ER ins Zytosol (60, 64).

1.1.2.5 TRAM (*Translocating chain-associated membrane protein*)

TRAM ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 37 kDa. Es ist mit acht TM in der ER-Membran verankert und es konnte gezeigt werden, dass TRAM ein Interaktionspartner

diverser sekretorischer Proteine ist, die auch nach der Translokation mit TRAM assoziiert bleiben (65-67). Es wird vermutet, dass TRAM während der Integration der TM in die ER-Membran ebenfalls als Chaperon fungiert. Hierbei unterstützt TRAM wahrscheinlich die Assemblierung weniger stark hydrophober TM im geöffneten Sec61-Komplex und dadurch deren laterale Integration in die ER-Membran (68, 69).

1.1.2.6 TRAP (*Translocon-associated protein*)

TRAP ist ein Heterotetramer-Komplex und bindet im Verlauf der Translokation an den Sec61-Komplex sowie an OST (34). Der Komplex aus OST und TRAP ist einer der am häufigsten auftretenden Interaktionspartner membrangebundener Ribosomen (70). TRAP beschleunigt den Transport diverser Substrate, die während der Translokation benötigt werden. Die genaue Funktion und Wirkungsweise ist jedoch noch nicht bekannt (30). Neuere Studien weisen auch auf eine mögliche Funktion bei der Orientierung der TMs in die ER-Membran hin, möglicherweise durch eine Beeinflussung von geladenen Aminosäureresten der naszierenden Kette während der Translokation (71).

1.1.2.7 OST (*Oligosaccharyltransferase*)

Die Mehrzahl aller sekretorischen Proteine und Membranproteine wird N-glykosyliert. Die Asparagin-gekoppelte Glykosylierung von Proteinen findet schon während der cotranslationalen Translokation im Lumen des ER statt. Dieser Prozess wird durch die OST katalysiert, einem in die ER-Membran eingebundenen Proteinkomplex. Die OST interagiert dabei mit dem Sec61-Komplex (72, 73) und bindet das Ribosom nahe der Auslassöffnung der naszierenden Kette (72, 74). Darüber hinaus zeigt OST eine hohe Affinität zu TRAM (75).

1.1.2.8 Calnexin

Das ER weist eine sehr große Anzahl an Chaperonen auf, die in die Glykosylierung von Proteinen involviert sind. Einige dieser Chaperone, so wie Calnexin, scheinen dabei auch mit dem Sec61-Komplex assoziiert zu sein (36, 76, 77). So konnten Lakkaraju *et al.* zeigen, dass palmitoyliertes Calnexin ein Bestandteil des Komplexes aus Ribosom, naszierender Kette und dem Sec61-Komplex ist und eine direkte Interaktion mit TRAP eingeht (78). Die Interaktion von Calnexin mit dem Sec61-Komplex weist auf eine enge Verknüpfung der Prozesse Translokation, Faltung und Qualitätskontrolle hin.

1.2 Inhibition der Proteinbiosynthese am Sec61-Translokon

Das Sec61-Translokon galt lange Zeit als pharmakologisch uninteressant, da es als Zielmolekül eine zu große Substrat-Bandbreite aufweist und eine zentrale Rolle in der Proteinbiosynthese einnimmt. Jedoch wären Inhibitoren des Sec61-Komplexes potentielle neue zytotoxische Zytostatika, die im Gegensatz zu den konventionellen Zytostatika (z.B. DNA-Alkylantien oder Basenanaloga) selbst nicht mutagen wären. Eine relative Selektivität der Wirkung auf Tumorzellen könnte aus deren stark erhöhten Proteinbiosyntheseraten resultieren. Es gibt bisher aber nur wenige Studien für solche Inhibitoren. Frühe Experimente zeigten, dass synthetische Signalsequenzen den Sec61-Komplex inhibieren können (79). Eine pharmakologische Nutzung dieser Peptide kommt jedoch aufgrund ihrer geringen Stabilität nicht in Betracht. Das Gleiche gilt für Lanthanum-Ionen, die die geöffnete Konformation des Sec61-Komplexes stabilisieren (80). Weitere potentielle Inhibitoren des proteinleitenden Kanals wurden durch Zufall entdeckt, meist im Verlauf eines Screens für Expressionsinhibitoren eines spezifischen Proteins (81). Für eine pharmakologische Anwendung kommen zwei verschiedene Typen von Inhibitoren des Sec61-Komplexes in Frage. Typ 1-Inhibitoren, die eine generelle Inhibition des Komplexes bewirken und somit die Proteinbiosynthese aller Proteine blockieren, die diesen Weg nutzen (mögliche zytotoxische Zytostatika; siehe oben). Und Typ 2-Inhibitoren, die dagegen den Sec61-Komplex nur in Kombination mit spezifischen Signalsequenzen blockieren könnten und so die Proteinsynthese einzelner, spezifischer Proteine unterbinden (Signalsequenzen weisen keinerlei Sequenzhomologie auf, so dass dieser Ansatz durchaus denkbar ist). Bisher konnte nur ein Typ 2-Inhibitor identifiziert werden sowie einige gemischte Typ 1-/ Typ 2-Inhibitoren. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.2.1 Nichtpeptidische Inhibitoren

Ein Beispiel für einen gemischten Typ 1-/ Typ 2-Inhibitor ist Mycolacton, ein immunsuppressives Makrolid, das von humanpathogenen *Mycobacterium ulcerans* produziert wird. In kürzlich veröffentlichten Studien zeigt sich, dass durch Mycolacton die Proteinbiosynthese von sekretorischen und integralen Membranproteinen blockiert wird (82). Wahrscheinlich unterbindet es die Interaktion zwischen Ribosom und Sec61 α und stoppt auf diese Weise den gesamten Prozess der cotranslationalen Translokation (83). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch Mycolacton keine generelle Blockade des Sec61-

Komplexes auslöst, sondern eine eher selektive Wirkung auf die Proteinbiosynthese mehrerer Proteine hat (84).

Ein weiterer Typ 1-/ Typ 2-Inhibitor mit relativ niedriger Selektivität ist Eeyarestatin I (85). Eeyarestatin I (Abb. 6A) wurde zunächst als ein Inhibitor des *ER-associated degradation pathway* (ERAD) beschrieben. Durch die Hemmung der p97 ATPase wird vermutlich die Deubiquitinylierung der zu degradierenden Aminosäureketten verhindert. Dies blockiert den Export fehlgefalteter Proteine aus dem ER sowie den Transport zum Proteosom (86). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Eeyarestatin die effiziente Bindung des RNC-SRP-SR-Komplexes an den Sec61-Komplex verhindert. Auf diese Weise unterbindet Eeyarestatin die Biosynthese vieler sekretorischer Proteine und Membranproteine (85, 86).

Kürzlich wurde der erste Typ 2-Inhibitor des Sec61-Komplexes beschrieben. Die Substanz Cyclotriazadisulfonamid (CADA) inhibiert spezifisch die Biosynthese des humanen CD4 (*cluster of differentiation 4*)-Proteins am Sec61-Komplex (87). CADA (Abb. 6B) wurde im Verlauf eines Screens entdeckt, mit dem Moleküle identifiziert werden sollten, die eine modulierende Wirkung auf das HIV-Virus haben. Es konnte gezeigt werden, dass CADA spezifisch die Proteinbiosynthese des Glykomembranproteins CD4 inhibiert (88, 89). CADA bindet dabei an das SP der naszierenden Kette von CD4 und blockiert so die Ausbildung einer Haarnadelschleife, die für die korrekte Ausrichtung des SP im Sec61-Komplex essenziell ist. Die Folge ist ein Translokationsstopp der spezifisch für CD4 ist (87, 90).

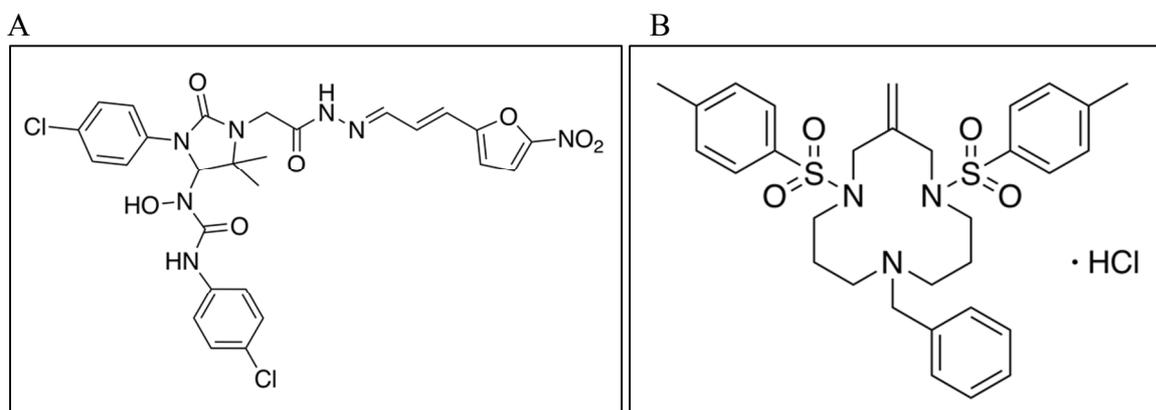


Abb. 6: Struktur von (A) Eeyarestatin und (B) Cyclotriazadisulfonamid.

1.2.2 Zyklodepsipeptidische Inhibitoren

Zusätzlich zu nicht peptidischen Inhibitoren wurden auch Zyklodepsipeptide gefunden, die am Sec61-Komplex angreifen. Diese Inhibitoren haben alle gemischte Typ 1-/ Typ 2-Inhibitoreigenschaften (19, 91-93). Aufgrund ihrer vielfältigen zellulären Effekte waren

Zyklodepsipeptide von großem pharmakologischem Interesse, da sie sowohl antivirale, antibakterielle, antiinflammatorische und antitumorale Wirkungen aufweisen (94-97). Charakteristisch für Zyklodepsipeptide ist eine Ringstruktur aus AS, bei der mindestens eine Peptidbindung durch eine Esterbindung ersetzt ist (94). Häufig treten auch nicht-proteinogene AS in diesen Substanzen auf. Die Synthese dieser Strukturklasse ist sehr aufwendig (97-99). Die Wirkungsmechanismen am Sec61-Komplex wurden intensiv untersucht, sind aber noch nicht vollständig verstanden. Vor allem war unklar, wie viele und welche Proteine tatsächlich in ihrer Biosynthese am Sec61-Komplex inhibiert werden.

1.2.2.1 Hun-7293

Hun-7293 wurde im Zuge eines Screens für Moleküle entdeckt, die die Expression von Zelladhäsionsmolekülen unterdrücken sollten (91). Dabei zeigte Hun-7293 eine inhibitorische Wirkung auf das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), E-Selektin und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM1) (100, 101). Hun-7293 ist ein zyklisches Depsipeptid, aus nicht-proteinogenen AS, einer Hydroxysäure und Leucin (100) (Abb. 7). Die Synthese ist aufgrund der kovalenten Bindung von nicht-proteinogenen AS und der Esterbindung des Aminosäurerings hoch komplex. Im Jahr 2008 konnte eine Flüssigphasensynthese etabliert und eine systematische Derivatisierung vorgenommen werden (102). Es entstanden die drei Derivate CAM741, NF1028 und Cotransin (CT). Hun-7293 wurde als der erste Inhibitor beschrieben, der in einer Signalsequenz-selektiven Weise die Proteinbiosynthese am Sec61-Komplex inhibiert. Die abgeleiteten Derivate zeigen ähnliche Wirkungen (47, 92, 103-105). Hun-7293 lässt sich damit, wie seine Derivate, als gemischter Typ 1-/ Typ 2-Inhibitor am Sec61-Komplex beschreiben, d.h. es wird selektiv die Biosynthese einiger Proteine inhibiert, nicht aber spezifisch die Biosynthese von nur einem Protein (siehe CADA).

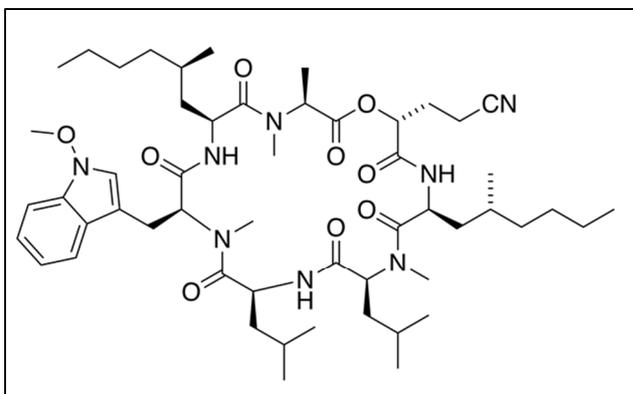


Abb. 7: Struktur von Hun-7293.

1.2.2.2 CAM741 und NF1028

CAM741 ist ein Derivat von Hun-7293 und stellt einen zylopeptidischen Decyanopropylester dar (Abb. 8A). Es wurde gezeigt, dass CAM741 die cotranslationale Translokation der Proteine VCAM1 und *Vascular endothelial growth factor receptor* (VEGF) inhibiert (19, 92, 106). Die Inhibition erfolgt wahrscheinlich durch die Umlagerung der SP der Proteine während der Bindung an die zytosolische Seite des Sec61-Translokons. *Crosslinking*-Studien zeigten eine mögliche Interaktion mit der Sec61 β -Untereinheit des Sec61-Komplexes. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die n- und h-Regionen der SP der sensitiven Proteine eine wichtige Rolle bei der Inhibition spielen. Eine Änderung der Hydrophobizität der h-Region ändert auch die Sensitivität der SP gegenüber CAM741, wobei steigende Hydrophobizität mit einem Verlust der Sensitivität einhergeht (19, 92, 106, 107).

NF1028 ist ein weiteres Derivat von Hun-7293, bei dem die zyklische Struktur von sieben auf sechs Reste reduziert wurde. Im Molekül liegen ausschließlich Peptidbindungen vor und die Esterbindung ist nicht mehr vorhanden (93) (Abb. 8B). Das Hexapeptid inhibiert im Gegensatz zu CAM741 zwar die Proteinbiosynthese von VCAM1, jedoch nicht mehr die von VEGF (19, 93, 107). Auf welchen Eigenschaftsänderungen der Derivate (sterisch, elektrophysikalisch, chemisch) die Änderungen der Selektivität beruhen, ist nicht bekannt. Dennoch war die Änderung der Selektivität durch Veränderung der Molekülstruktur ein Hinweis, dass durch weitere Derivatisierung Spezifität (d.h. Typ 2-Inhibitoreigenschaften) erreicht werden könnte.

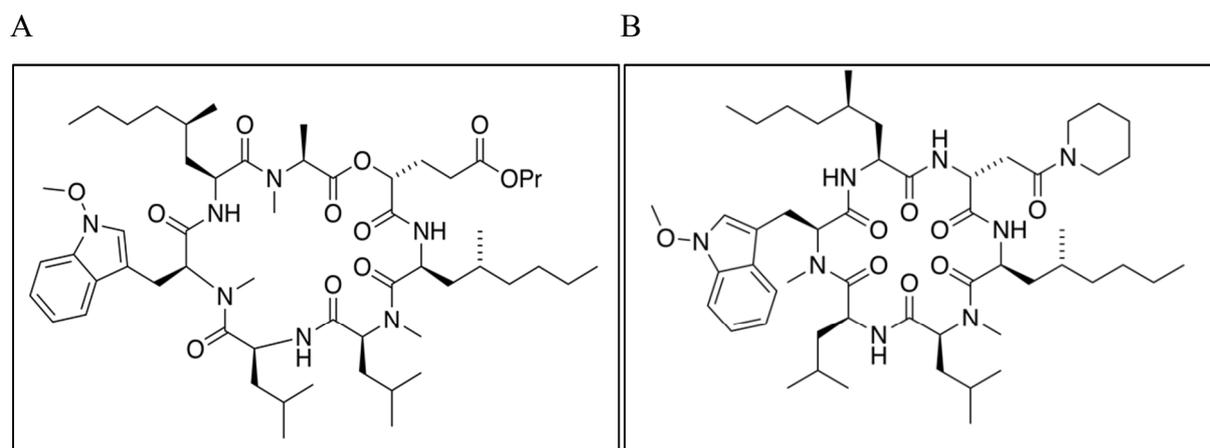


Abb. 8: Struktur von (A) CAM741 und (B) NF1028.

1.2.2.3 Cotransin (CT)

Cotransin (CT) ist ebenfalls ein Derivat von Hun-7293 und ein Heptadepsipeptid. Im Gegensatz zu Hun-7293 besteht CT jedoch aus leicht zugänglichen AS und ist durch eine

Vereinfachung der Struktur deutlich besser zu synthetisieren (Abb. 9). Im Jahr 2008 gelang der Arbeitsgruppe von M. Beyermann am FMP eine Festphasensynthese der linearen Aminosäurekette mit anschließender epidemisierungsfreier Zyklisierung (108).

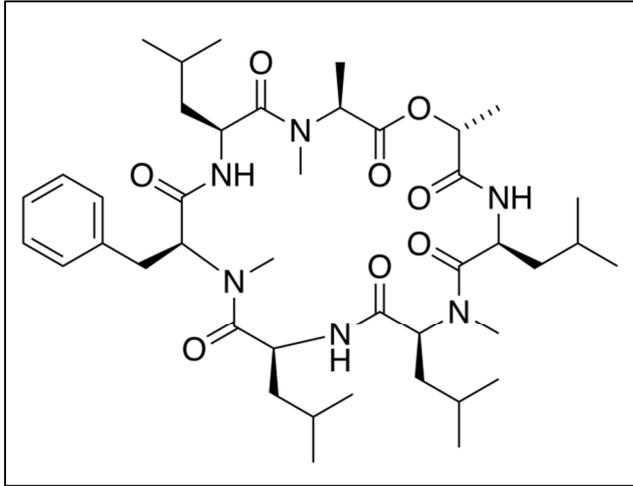


Abb. 9: Struktur von Cotransin.

CT besitzt, wie die anderen Cyclodepsipeptide, eine starke inhibitorische Wirkung auf die Proteinbiosynthese am Sec61-Komplex, welche selektiv für bestimmte Signalsequenzen ist. Die IC_{50} für die Inhibition der Proteinbiosynthese ist bei den sensitiven Proteinen jedoch im Vergleich zu Hun-7293 um den Faktor 10^3 höher (IC_{50} Hun-7293 für VCAM1 = 1 nM; IC_{50} Cotransin für VCAM1 = 0,5 μ M) (92, 100, 106). Zu Anfang bestand die Annahme, dass Cotransin und die anderen Zyklodepsipeptide sehr selektiv wirken und nur die Biosynthese einer sehr kleinen Gruppe von Proteinen inhibieren. Als cotransinsensitiv wurden die Membranproteine VCAM1, P-Selektin und der *Corticotropin-releasing factor receptor Type I* (CRF₁R) beschrieben, sowie die sekretorischen Proteine Angiotensin und die β -Lactamase (92). Alle diese Proteine enthalten ein SP. Diese Gruppe erweiterte sich im Laufe der Jahre um den G-Protein-gekoppelten Endothelin-B-Rezeptor (ET_BR) (104) und den *Epidermal growth factor receptor 3* (HER3) (109), welche ebenfalls ein SP aufweisen. Der Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) weist ebenfalls eine starke Sensitivität gegenüber CT auf, besitzt aber eine SAS (105). Dies zeigt, dass CT nicht ausschließlich SP beeinflusst, sondern auch auf SAS wirkt.

Der Wirkungsmechanismus von CT und den anderen zyklodepsipeptidischen Inhibitoren ist bisher nicht ausreichend geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CT keinen Einfluss

auf die Bindung des SRP an den RNC hat und auch die Interaktion zwischen RNC-SRP und SR nicht beeinträchtigt wird (92).

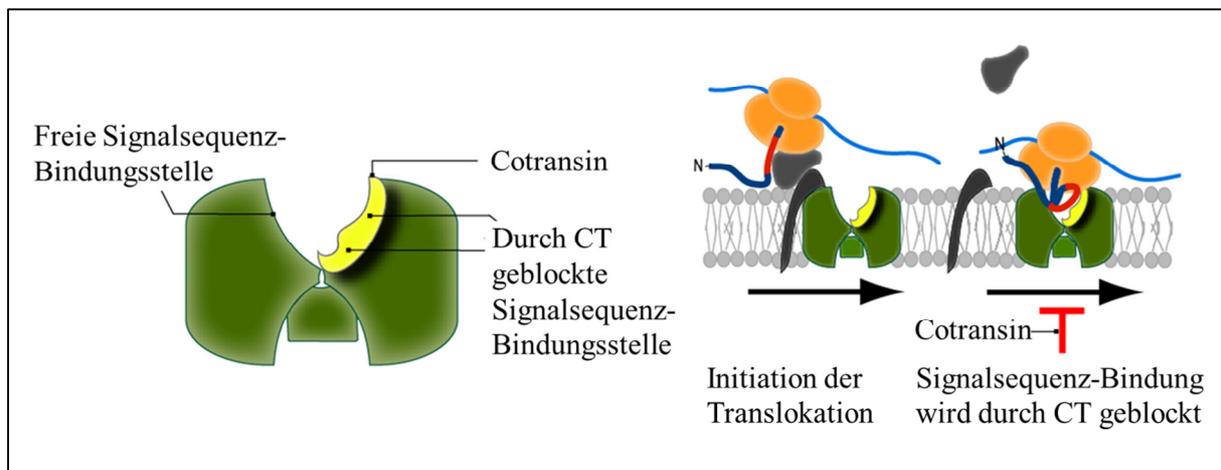


Abb. 10: Modell der Cotransin-Interaktion mit dem Sec61-Komplex. Das Schema zeigt den Sec61-Komplex in Grün, CT in Gelb, das Ribosom in Orange, die ER-Membran in Grau und den SRP und SR in dunklem Grau. (Links) Die bisherigen Daten legen nahe, dass CT auf der zytosolischen Seite des geschlossenen Kanals bindet. Dadurch blockiert CT die Bindungsstellen bestimmter Signalsequenzen und unterbindet so die Synthese der betreffenden Proteine. (Rechts) Schematische Darstellung des Inhibitionsmechanismus von CT.

Aufgrund von *Crosslinking*-Studien wird vermutet, dass CT mit Sec61 α interagiert und so sensitive Signalsequenzen von Sec61 α auf die Sec61 β -Untereinheit verschiebt. In diesem Fall würde CT mit sensitiven Signalsequenzen um die Bindung an Sec61 α konkurrieren (Abb. 10) (19). Eine kürzlich veröffentlichte Studie deutet jedoch darauf hin, dass CT auch nahe der Plug-Domäne des Sec61-Komplexes binden und in der Folge die laterale Einbettung der Signalsequenzen in die ER-Membran verhindern könnte (107).

Ein Konsensusmotiv, welches eine CT-Sensitivität der Signalsequenz (SP oder SAS) vermittelt, wurde bis jetzt noch nicht identifiziert. Es konnten lediglich in einigen Signalsequenzen AS identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Cotransin-Sensitivität haben. (19, 47, 107). Daher wurde angenommen, dass ein Konsensusmotiv, welches eine Sensitivität gegenüber CT vermittelt, nicht existiert und dass die Sensitivität einer Signalsequenz gegenüber CT ausschließlich von deren Hydrophobizität abhängt. Weiterhin war nicht bekannt, wie selektiv CT und die anderen Zyklodepsipeptide tatsächlich sind, und ob noch andere SAS (zusätzlich zu TNF α) sensitiv sind.

Um weitere Einblicke in den Wirkungsmechanismus und die Selektivität von CT zu erhalten, wurde am FMP von der Arbeitsgruppe Protein Trafficking und der Arbeitsgruppe Mass Spectrometry eine *Proteomics*-Studie durchgeführt (*stable isotope labeling of amino acids in*

cell culture, SILAC mit anschließender Massenspektrometrie) (110). Für den SILAC-Versuch wurden humane hepatozelluläre Karzinomzellen verwendet, die mit einer sättigenden CT-Konzentration (30 μM) oder DMSO als Negativkontrolle behandelt wurden. Die Proteinbiosynthese der einzelnen Proteine wurde über das Verhältnis der schwer und leicht markierten Proteine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bestimmt. Ziel war es, alle CT-sensitiven Proteine zu ermitteln und so die tatsächliche Selektivität der Substanz zu bestimmen. Weiter sollten in den Signalsequenzen mögliche Konsensusmotive für die Cotransin-Sensitivität identifiziert werden. Die überraschenden Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass 50 von 52 identifizierten sekretorischen Proteine eine signifikante Inhibition ihrer Proteinbiosynthese durch die Behandlung mit CT aufwiesen. Bei den integralen Membranproteinen waren 21 der 156 identifizierten Proteine in ihrer Proteinbiosynthese signifikant beeinträchtigt (110), 12 von diesen 21 integralen Membranproteinen weisen eine SAS auf.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass CT nicht nur Einfluss auf SP, sondern auch auf SAS-tragende Proteine haben kann. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass CT in höheren Konzentrationen die Biosynthese von fast allen sekretorischen Proteinen inhibiert. Die Mehrzahl der Membranproteine ist im Gegensatz dazu cotransinresistent (mit Ausnahme der 21 oben genannten Proteine). Das wichtigste Ergebnis war, dass Cotransin offensichtlich weitaus weniger selektiv ist, als von anderen Arbeitsgruppen ursprünglich angenommen.

1.1 Ziel der Arbeit

Alle bisher gefundenen Inhibitoren des Sec61-Komplexes wurden durch Zufall gefunden. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Daten der vorliegenden *Proteomics*-Analyse für CT mit bioinformatischen Methoden auszuwerten, um ein mögliches Konsensusmotiv für Cotransin in den sensitiven SP und SAS zu identifizieren. Ein auf diesem Weg identifiziertes Konsensusmotiv sollte anschließend durch Mutagenese-Studien experimentell verifiziert werden.

Ein Screen für Inhibitoren des Sec61-Translokon-Pathways wurde bisher nicht beschrieben. Der Grund hierfür ist, dass der Sec61-Komplex in funktioneller Form nicht in ausreichender Menge isoliert und funktionell rekonstituiert werden kann. Des Weiteren hat der Sec61-Komplex selbst keine enzymatische Aktivität, die einer leichten Messung zugänglich wäre.

Darauf basierend war das zweite Ziel dieser Arbeit die Entwicklung, Etablierung und Durchführung eines zellbasierten Hochdurchsatz-Screens, um weitere Typ 1- und/ oder Typ 2-Inhibitoren des Sec61-Komplexes zu identifizieren.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1.1: Material

Material	Lieferant
1 Kb DNA Marker	Life Technologies, USA
6 x DNA Ladepuffer	Fermentas, GER
Acrylamid	Carl Roth, GER
Agar Agar	Carl Roth, GER
Agarose	peqlab, GER
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie, GER
AlamarBlue™ Zell-Viabilitäts Reagenz	Thermo Fisher Scientific, GER
Cotransin	AG Beyermann, FMP Berlin, GER
Cycloheximid	FMP Berlin, GER
dNTP-Mix	New England BioLabs, USA
DMEM GlutaMAX™	Gibco GmbH, GER
DMSO	Sigma Aldrich Chemie, GmbH, GER
Essigsäure	J.T.Baker, NLD
Ethanol	J.T.Baker, NLD
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, CHE
Fetales Kälber Serum	Biochrom AG, GER
Glyzerin	Carl Roth, GER
G418 Sulfat	Merck KGaA, GER
Hefeextrakt	Carl Roth, GER
Isopropanol	VWR BDH Prolabo GmbH, GER
Kanamycin	Appli Chem GmbH, GER
<i>LumiLight Western Blotting Substrate</i>	Roche Diagnostics GmbH, GER
L-[35S]-Methionin	PerkinElmer, USA
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi kit	Macherey-Nagel GmbH, GER
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit	Macherey-Nagel GmbH, GER
NucleoSpin® Plasmid QuickPure kit	Macherey-Nagel GmbH, GER

Material	Lieferant
Oligonukleotidprimer	BioTez, GER
OptiTaq DNA Polymerase	Roboklon, GER
<i>QuickChange™ Kit</i>	Stratagene Europe, NDL
Penicillin 10000 U/ml	Biochrom AG, GER
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, GER
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	Thermo Fisher Scientific, USA
<i>Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution</i>	New England BioLabs, GER
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, GER USA Fermentas GmbH, GER
Retikolozytenlysat, canine	Promega, USA
<i>RNase Away</i>	Sigma-Aldrich, GER
RotiLoad-Probenpuffer, 4 x konzentriert	Carl Roth, GER
Streptomycin 10000 µg/ml	Biochrom AG, GER
T4 Ligase	New England BioLabs, USA
T7 RNA Polymerase	Promega, USA
<i>TALON Metal Affinity Resin</i>	Clontech, USA
TEMED	Sigma Aldrich Chemie GmbH, GER
Trypanblau	Seromed GmbH, AUT
Trypsin/EDTA 10x	Biochrom AG, GER
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ultra-Pure Agarose	Life Technologies, USA
Zellkultur-Multi-Well-Platten	TPP, Trasadingen, CHE
Zellkultur 384-Wellplatten, Schwarz	
Boden klar, Zellbindende Oberfläche	Corning, USA
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, CHE
<u>Zellkulturschalen</u>	<u>Grainer Bio-One GmbH, GER</u>

Hier nicht aufgeführte Standard-Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA (GER), Carl Roth GmbH & Co. KG (GER), Life Technologies (GER), Invitrogen GmbH (GER), Sigma Aldrich Chemie GmbH (GER), J.T. Baker (GER) und Perkin Elmer Inc. (USA).

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.1.2: Geräte

Gerät	Hersteller
Blotkammern	Mini-PROTEAN® 3 Western TransBlot, Bio-Rad Laboratories GmbH, GER
Durchflusszytometer	FACSCanto II, Becton Dickinson GmbH, GER
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, GER
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell™, Bio-Rad, USA
Geldokumentationssysteme	Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH, GER
Lumimager	F1™, Boehringer Mannheim GmbH, GER
Heizblock	Thermomixer Comfort, Eppendorf GmbH, GER
Inkubatoren	
für Bakterien (mit Schüttler)	Innova 4230, New Brunswick Scientific, USA
für Zellkultur	Heraeus instruments GmbH, GE
Labormikroskop	Zeiss Axiovert 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, GER
Laser Scanning-Mikroskop (LSM) mit Zusatzgeräten	ConfoCor3, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, GER LSM 510 META, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, GER
Mikroplatten Waschroboter Hydrospeed	TECAN, GER
NanoDrop 100	Thermo Scientific, GER
Netzgerät	Power Pac Basic, BioRad, USA
PCR-Gerät	DNA Engine Tetrad2, Bio-Rad, USA
pH-Meter	HI9321 Microprocessor pH-Meter, HANNA Instruments Deutschland GmbH, GER
Photometer	Ultraspec2000, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, AUT
Pipettierhilfe	Pipetboy, Integra Biosciences GmbH, GER
Pipetten	research® 0,5 – 10 µl, Eppendorf GmbH, GER research® 2 – 20 µl, Eppendorf GmbH, GER

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
	research® 20 - 200 µl, Eppendorf GmbH, GER
	research® 100 – 1000 µl, Eppendorf GmbH, GER
	research® 500 – 5000 µl, Eppendorf GmbH, GER
Plattenlesegerät (Safire)	TECAN, GER
Proteinkinase K	Roche, CHE
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Millipore GmbH, GER
Rotator	Multishaker Rotator RS-24, Biosan Ltd., USA
Rotoren	11133 Festwinkelrotor, Sartorius AG, GER
	3042 Festwinkelrotor, Heraeus Sepatech, GER
	3757 Festwinkelrotor, Heraeus Sepatech, GER
	F-45-12-1 Festwinkelrotor, Eppendorf, GER
	SLA3000 Festwinkelrotor, DuPont Corp., USA
	SS34 Festwinkelrotor, DuPont Corp., USA
Pipettierroboter Freedom Evo	TECAN, AUT
Plattenlesegerät Safire2	TECAN, AUT
Transilluminator	MacroVue UV-20, Hoefler, USA
Waagen	Sartorius AG, GER
Zelldispenser EL406	Biotek, GER
Zellzählgerät	CASY Model TT 45, 60, 150µm, Roche Diagnostics, GER
Zentrifugen	Sigma 3K12, SIGMA Laborzentrifugen, GER; Mikro22R, Hettich, GER; Universal 30RF, Hettich, GER; MiniSpin Plus, Eppendorf, GER; Picofuge, Stratagene, USA
<u>Zellhomogenator</u>	<u>Potter S, Braun Biotech Int. GmbH, GER</u>

Für die Experimente dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders angegeben, Wasser verwendet, das mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem® (Millipore GmbH) von organischen und ionischen Bestandteilen befreit wurde und eine Leitfähigkeit von höchstens 10 µS/cm bei Raumtemperatur besaß.

2.1.3 Software

Tabelle 2.1.3: Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator Professional CS3	Adobe (FMP-Grafik-PC)
Cell Quest Pro (V6)	Becton Dickinson, GER
Clone Manager 5	Sci-Ed Software, USA
ClustalW	www.ebi.ac.uk/clustalw/
FCS express 5.1	De Novo Software, USA
FinchTV	Geospiza, USA
fuzzpro application /EMBOSS calculator	http://www.geneious.com
Geneious Pro software 5.4.4	http://www.geneious.com
GRAVY calculator	S. Fuchs, University of Greifswald, GER
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., CA
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/
PyMol Software Paket 3.1	Schrödinger Inc., USA
SignalP3.0	Center for Biological Sequence Analysis, DNK
Signalsequenz Datenbank	http://www.signalpeptide.de
Zeiss LSM Image Browser	Carl Zeiss GmbH, GER
Zen	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, GER

2.1.4 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

Tabelle 2.1.4: Verwendete Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5a	fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Stratagene Europe, NL
<i>E. coli</i> JM110	rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ(lac-proAB) e14-[F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK- mK+)	Sigma Aldrich, GmbH, GER
Zelllinien	Merkmale	Herkunft
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells</i> ; mit Adenovirus Typ 5 transformiert (DSMZ-Nr. ACC 305)	DSMZ GmbH, GER

Stabile Zelllinien

In dieser Arbeit wurden für folgende Konstrukte stabil exprimierende HEK293-Zelllinien erzeugt oder verwendet: CRF₁R.GFP (A.Teichmann, FMP); eGFP (C.Rutz, FMP). Beide Zelllinien exprimieren die jeweiligen Gene unter der Kontrolle eines Tetracyclin-kontrollierten transkriptionellen Aktivierungssystems (*Tet-On-System* durch Doxycyclin induziert).

2.1.5 Desoxyribonukleinsäuren

2.1.5.1 Vektoren

Tabelle 2.1.5.1: Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz	Herkunft
peGFP-N1	Kanamycin	Clontech, JA
pcDNA3.1	Ampicillin	Invitrogen, UK
pcDNA1.neo	Kanamycin	Invitrogen, UK

2.1.5.2 Rekombinante Plasmide

Tabelle 2.1.5.2: Verwendete Plasmide

Plasmidname	Funktionelle Bereiche	Herkunft
WT.AQP2.GFP	GFP	für diese Arbeit kloniert
CM.AQP2.GFP	F25G, F26G, G27L, Q33K GFP	für diese Arbeit kloniert
WT.AQP.NT.GFP	AS 1-40, GFP	für diese Arbeit kloniert
CM.AQP.NT.GFP	AS 1-40, F25G, F26G, G27L, Q33K, GFP	für diese Arbeit kloniert
CRF ₁ R.GFP	GFP	C.Rutz FMP
CRF ₁ R.SP.NT.GFP	GFP	C.Rutz FMP
CRF ₁ R.SP2.GFP	GFP	C.Rutz FMP
CRF _{2a} R.GFP	GFP	C.Rutz FMP
CRF _{2a} R.SP.NT.GFP	GFP	C.Rutz FMP
CRF _{2a} R.SP1.GFP	GFP	C.Rutz FMP
WT.ET _B R.GFP	GFP	C.Rutz FMP
ET _B R.Q2A.GFP	Q2A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.P3A.GFP	P3A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.P4A.GFP	P4A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.P5A.GFP	P5A, GFP	für diese Arbeit kloniert

Plasmidname	Funktionelle Bereiche	Herkunft
ET _B R.S6A.GFP	S6A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.L7A.GFP	L7A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.C8A.GFP	C8A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.G9L.GFP	G9L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.R10A.GFP	R10A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.R10A.SP.NT.GFP	SP+71 AS, R10A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.A11L.GFP	A11L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.L12A.GFP	L12A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.V13A.GFP	V13A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.A14L.GFP	AS, A14L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.A14L.SP.NT.GFP	SP+71 AS, A14L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.L15A.GFP	L15A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.V16A.GFP	AS, V16A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.V16A.SP.NT.GFP	SP+71 AS, V16A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.L17A.GFP	L17A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.A18L.SP.NT.GFP	SP+71 AS, A18L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.A18L.GFP	A18L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.C19A.GFP	C19A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.G20L.GFP	G20L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.G20L.SP.NT.GFP	SP+71 AS, G20L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.L21A.GFP	L21A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.S22A.GFP	S22A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.R23A.GFP	R23A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.R23A.SP.NT.GFP	SP+71 AS, R23A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.I24A.GFP	I24A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.W25A.GFP	W25A, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.G26L.GFP	G26L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.G26L.SP.NT.GFP	SP+71 AS, G26L, GFP	für diese Arbeit kloniert
ET _B R.4M.GFP	A14I, A18I, C19I, G20I, GFP	für diese Arbeit kloniert
LHR.GFP	GFP	C.Rutz FMP
PAR1.GFP	GFP	C.Rutz FMP

Plasmidname	Funktionelle Bereiche	Herkunft
TSHR.GFP	GFP	C.Rutz FMP
V ₂ R.GFP	GFP	C.Rutz FMP

2.1.5.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von BioTeZ Berlin Buch GmbH, GER bezogen und in einer 50 pmol Konzentration verwendet. Angegeben sind nur die *Forward*-(Fw)-Oligonukleotide.

Tabelle 2.1.5.3: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')
AQP2-1	CTTGGCCGGGCTCCTTGGTGGCGCCTTTGGCCTTG
AQP2-2	CTTGGCCGCGGGCCTTATTGTCGGCGGTGGCTATGGCTCAGCCC
AQP2-3	CTTTTGTCCGGCGGTCTCCTTGGCTCAGCCCTCAAGTGGGCCAGCTC
MOR-1	CTCTATCGGGGGAGTAGTGGGCGGCTTCGGAAAC
MOR-2	CCATCAAGGCCCTCGGCGGTATCGTGGGTGGAGTGGGCTACTTC
MOR-3.1	GGCCCTCAAATCTGGCGGGTGTGTAGTG
MOR-3.2	GTGGGCGGCGTTCGGAAACTACCTGGTCATG
Q2A	AGCAGCATGGCGCCGCCTCC
P3A	AGCATGCAGGCGCCTCCAAGT
P4A	ATGCAGCCGGCTCCAAGTCTG
P5A	CAGCCGCCTGCAAGTCTGTGC
S6A	CCGCCTCCAGCTCTGTGCGGA
L7A	CCTCCAAGTGCGTGCGGACGC
C8A	CCAAGTCTGGCCGGACGCGCC
G9L	AGTCTGTGCCTACGCGCCCTG
R10A	CTGTGCGGAGCCGCCCTGGTT
A11L	TGCGGACGCCTCCTGGTTGCG
L12A	GACGCGCCGCGGTTGCGCT
V13A	GCGCCCTGGCTGCGCTGGTT
A14L	GCCCTGGTTCTGCTGGTTCT
L15A	CTGGTTGCGGCGGTTCTTGC
V16A	TTGCGCTGGCTCTTGCCCTG
L17A	CGCTGGTTGCTGCCTGCGGC

Name	Sequenz (5'-3')
A18L	CTGGTTCTTCTCTGCGGCC
C19A	GTTCTTGCCGCCGGCCTGTC
G20L	CTTGCCTGCCTCCTGTGCGG
L21A	CCTGCGGCGCGTCGCGGATC
S22A	CAGATCCGCGCCAGGCCGC
R23A	GGCCTGTCGGCGATCTGGG
I24A	CTGTGCGGGCCTGGGGAGAG
W25A	CGCGGATCGCGGGAGAGGAG
pCMV-A	GGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
pGFP3' seq	ACAACAATTGCATTC
4M1A	CCCTGGTTATCCTGGTTCTTATCATCATCCTGTGCGCGGATCTGG
4M1B	CGGACGCGCCCTGGTTATCCTGGTTCTTGCCTGCG

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Isolierung

Die Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli*-Bakterien erfolgte mittels der kommerziell erwerblichen Kits Nucleobond® Xtra und NucleoSpin® Plasmid QuickPure. Die Aufreinigung von DNA aus *Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution*-gefärbten Agarosegelen wurde mit dem NucleoSpin® Gel und dem PCR Clean-up Kit durchgeführt. Die Durchführungen erfolgten nach dem Herstellerprotokoll.

2.2.1.2 Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese

In einem 20 µl Restriktionsansatz wurde 1 µg DNA mit jeweils 5 U Restriktionsendonuklease für 45 Minuten bei 37 °C im Schüttler verdaut und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel zur Agarosegelelektrophorese aufgetragen. Für die Gelelektrophorese wurde ein Agarosegel (0,8% w/v Agarose in Elektrophorese-Puffer), ein Elektrophorese-Puffer (80 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 0,15% v/v Essigsäure) und Gelelektrophoresekammern verwendet. Um die DNA anzufärben, wurde *Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution* in einem Verhältnis von 1:80000 zugegeben. Die Trennung der DNA-Moleküle erfolgte bei 0,9 V/cm² für 45

Minuten. Zur Visualisierung der mittels *Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution* markierten DNA wurde ein UV-Geldokumentationssystem verwendet.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurde mittels eines Photometers die Extinktion bei 260 und 280nm und die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$OD_{260\text{ nm}} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA.

Die Reinheit der Proben wurde durch die Ermittlung des Verhältnisses von $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ bestimmt, wobei das Verhältnis der verwendeten DNA zwischen 1,8 und 2 lag.

2.2.1.4 Ligation

Bei der Ligation werden unter Verwendung der T4-Ligase (New England Biolabs) verdaute und aufgereinigte DNA-Fragmente durch die Ausbildung einer Esterbindung zwischen dem Phosphatrest und der Desoxyribose verknüpft. Die Ligationsreaktion wurde laut Herstellerprotokoll in einem 20 μl Ansatz durchgeführt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E.coli*-DH5 α -Bakterien.

2.2.1.5 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese ermöglicht es, einzelne oder mehrere Basen in Genen auszutauschen, zu deletieren oder zu insertieren. Zur Mutagenese wurden das *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* und Fw- bzw. Rev-Oligonukleotide der Firma BioTeZ GmbH genutzt, welche die gewünschten Mutationen trugen. Im Folgenden ist ein Standardreaktionsansatz für die Durchführung der gerichteten Mutagenese zusammengefasst.

Reaktionsansatz:

2 μl 10 \times Reaktionspuffer
50 ng Plasmid-DNA
0,5 μM Fw-Oligonukleotid
0,5 μM Rev-Oligonukleotid
0,5 mM dNTP-Mix
2 U *PfuTurbo* DNA Polymerase
ad 20 μl H₂O

Durchführung:

Tabelle 2.2.1.5: Standard PCR-Programm für die zielgerichtete Mutagenese

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1	95 °C	30 s
Denaturierung	16	95 °C	30 s
Hybridisierung		55 °C	1 min
Elongation		68 °C	2 min/kb
Finale Elongation	1	68 °C	7 min
Kühlung	1	12 °C	∞

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde der Verdau der methylierten, wildtypischen DNA, durch Zugabe von 20 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* für eine Stunde bei 37 °C durchgeführt.

Der Mutagenese-Ansatz wurde mit 5 µl 3M Na-Acetat und 125 µl 100% Ethanol versetzt und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Die so gefällte DNA wurde bei 20000 g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70% Ethanol 2 x gewaschen und anschließend getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde danach in 20 µl H₂O gelöst.

Danach erfolgte die Transformation in *E.coli*-Bakterien mit 4 µl des Mutationsansatzes.

Falls dieses Mutagenese-Protokoll nicht zum Erfolg führte, wurde ein weiteres Protokoll verwendet, welches eine Primer-Erweiterung nutzte. Bei dieser Methode werden zwei Paare von Primern verwendet. Ein Primer trägt die vorgesehene Mutation, der andere stellt den Erweiterungs-Primer dar, der im äußeren Bereich des Templates bindet.

Als Erweiterungs-Primer wurden ausschließlich pCMV-A und pGFP-3'seq (siehe Tabelle 2.1.5.3) verwendet. Dafür wurden zwei separate PCR-Reaktionen (A+B) durchgeführt, bei denen jeweils der pCMV-A oder der pGFP-3'seq als Erweiterungs-Primer Anwendung fand.

Der Reaktionsansatz war:

5 µl 10× Reaktionspuffer

50 ng Plasmid-DNA

A) 0,5 µM Fw-Oligonukleotid / pCMV-A

B) 0,5 µM Rev-Oligonukleotid / pGFP-3'seq

0,5 mM dNTP-Mix

1,25 U Opti Taq Roboklon 5U/µl

ad 50 µl H₂O

Danach wurden 20 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes durch Gelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt (siehe 2.2.1.2). Die korrespondierenden Banden der erwarteten Größe wurden dem Protokoll entsprechend (siehe 2.2.1.1) extrahiert. Anschließend wurden beide Ansätze in einer weiteren PCR-Reaktion vereint, bei der für die Hybridisierung ein Temperaturgradient zwischen 50-60 °C verwendet wurde.

Reaktionsansatz:

5 µl 10× Reaktionspuffer
1 µl Plasmid-DNA, Extraktion 1
1 µl Plasmid-DNA, Extraktion 2
0,5 µM Fw-Oligonukleotid/pCMV-A
0,5 µM Rev-Oligonukleotid/pGFP-3' seq
0,5 mM dNTP-Mix
1,25 U Opti Taq Roboklon 5U/µl
ad 50 µl H₂O

Anschließend wurde mit dem PCR-Ansatz verfahren wie oben beschrieben und es erfolgte die Transformation von 4 µl in *E.coli-DH5α* oder *E.coli-JM110*.

2.2.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-Bakterienzellen eingebracht. Dieser Prozess wird zur Klonierung, Mutagenese und Vermehrung von Plasmid-DNA genutzt. Es wurden zwei Verfahren angewendet: die Transformation von chemokompetenten Bakterien mittels Hitzeschock und die von elektrokompenten Bakterien mittels Elektroporation. Die anschließende Selektion der Bakterien erfolgte auf Agarplatten, die Antibiotika enthielten, für welche das transformierte Plasmid eine Resistenz vermittelte (30 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin). Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurden einzelne Kolonien gepickt und die Zellen für 24 h in 5 ml mit selektivem LB-Medium, unter Schütteln bei 37 °C, inkubiert. Aus dieser Zelle wurde die Plasmid-DNA isoliert.

Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation durch Elektroporation wurde der *E.coli*-Bakterienstamm *DH5α* verwendet. Es wurden 40 µl der elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl DNA bei Retransformationen, sowie 4 µl (50 ng/µl) bei Mutagenesen oder Ligationen zugegeben.

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min auf Eis und die Überführung der Probe in eine vorgekühlte Küvette (1 mm Dicke). Die Elektroporation wurde mit dem GenePulser Xcell Electroporation System bei einer Spannung von 1250 V und einer elektrischen Kapazität von 25 μ F durchgeführt. Damit die Zellen, die auf der Plasmid-DNA kodierten Gene, für die Antibiotikaresistenz exprimieren, wurden sie zuerst für eine Stunde bei 37 °C in 1 ml LB-Medium geschüttelt und anschließend auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

Transformation durch Hitzeschock

Bei der Transformation durch Hitzeschock wurde der *E.coli*-Bakterienstamm *JM110* verwendet. Es wurden 50 μ l (OD = 200) der chemokompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden für eine Retransformation mit 1 μ l DNA (50 ng/ μ l) und für eine Mutagenese oder Ligation mit 4 μ l DNA (50 ng/ μ l) gemischt. Es folgten eine 30 min Inkubation auf Eis und ein 2 min Hitzeschock bei 42 °C sowie eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurde dem Ansatz 1 ml LB-Medium zugefügt, für 1 h bei 37°C inkubiert und auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Selektive LB-Medien wurden mit positiven Klonen inokuliert und die daraus gewonnene Plasmid-DNA mittels eines Standard Sequenzierungsservices (GATC und MWG) verifiziert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin

Die Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin verbessert die Haftung von HEK293-Zellen auf dem Untergrund. Die negativ geladene Zellmembran interagiert mit dem positiv geladenen Poly-L-Lysin über elektrostatische Kräfte.

Die Beschichtung der 30 mm Deckgläser erfolgte mit 500 μ l einer 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin-Lösung, die nach einer 30 min Inkubation abgesaugt wurde. Anschließend trockneten die Deckgläser unter sterilen Bedingungen bei RT.

2.2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten HEK293-Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium GlutaMax™* mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/ Streptomycin in einer 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

2.2.2.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Bei der Transfektion wird die Bildung kationischer zellpermeabler Komplexe des Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) mit der DNA genutzt, um Fremd-DNA in die Zellen einzubringen.

Die transiente Transfektion wurde 24 h nach der Zellaussaat bei ca. 70% Konfluenz durchgeführt. Die Transfektion erfolgte in FKS-freiem Medium. Die entsprechenden Mengen PEI und DNA (siehe Tabelle 2.2.2.3) wurden 10 min bei RT einzeln vorinkubiert. Nach Mischung dieser Ansätze folgte eine weitere Inkubation bei RT für 20 min und die Zugabe des Gemisches zu den Zellen.

Tabelle 2.2.2.3: Transfektion von HEK293-Zellen

Schalen	Zellzahl	PEI	Plasmid-DNA	DMEM
100 mm Zellkultur Schale	4×10^6	15 μ l	6 μ g	8 ml
24-Wellplatte	$2,5 \times 10^4$	1,5 μ l	0,6 μ g	100 μ l
12-Wellplatte	5×10^4	3 μ l	1,2 μ g	100 μ l
35 mm	1×10^5	1,6 μ l	0,8 μ g	100 μ l

2.2.2.4 Laser Scanning Mikroskopie (LSM)

Für eine bildgebende Analyse der Expression der verwendeten Wildtyp (WT)-Rezeptoren und der erzeugten Mutanten in lebenden HEK293-Zellen wurden das LSM 780 und das LSM 710-ConfoCor3 (Plan-Apochromat 63x/ 1.4 Öl DIC M27) verwendet. Die aufgenommenen Bilder wurden im LSM-Datenformat gespeichert, bearbeitet und anschließend in ein TIFF-Format konvertiert und gespeichert.

Dazu wurden HEK293-Zellen auf ein 35 mm Deckglas ausgesät und 24 h später mit der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert (Kap. 2.2.2.3). Nach weiteren 24 h wurden die Deckgläser mit den transfizierten Zellen in eine Mikroskopie-Küvette überführt und mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} für die LSM-Analyse bedeckt. Die Einstellungen der Laserintensitäten der einzelnen Kanäle erfolgten individuell, entsprechend der Fluoreszenzintensitäten der Proben. Bei allen Aufnahmen wurde ein Zweikanalbild im Line Mode erstellt. Zur Färbung der Plasmamembran wurde eine Trypanblaulösung (0,05% w/v in KRH-Puffer) direkt auf die Zellen gegeben. Die GFP-Fluoreszenzsignale wurden, unter Verwendung eines *multi beam splitter* (MBS) 488, mittels eines Argon-Lasers ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, Emission 491–603 nm) detektiert. Die Visualisierung des ER erfolgte in einem gesonderten

Kanal durch einen CFP-markierten ER-Marker, der 1 h vor der Verwendung am Mikroskop mit den Zellen inkubiert wurde (verwendet nach Herstellerangaben). Die Detektion der CFP-Signale wurde mit einer Laserdiode ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, Emission 430–495 nm) und einem MBS 405 durchgeführt. Trypanblau wurde, ebenfalls in einem gesonderten Kanal zu GFP, unter Verwendung eines DPSS Lasers ($\lambda_{\text{exc}} = 561 \text{ nm}$, Emission 564–704 nm) mit einem MSB 561 visualisiert. Die Auswertung der Bilder und die Überlagerungen der Kanäle erfolgten mit der ZEN 2010 Software.

2.2.2.5 Bioinformatische Methoden

Hydrophobizitätsanalyse der Signalsequenzen

Um die Auswirkung der Signalsequenzhydrophobizität auf die Sensitivität gegenüber CT zu beurteilen, wurde die Gesamthydrophobizität der Signalsequenzen durch Berechnung des Gesamtdurchschnitts der AS-Einzel-Hydrophobizitäten (GRAVY) bestimmt. Darüber hinaus wurden die durchschnittlichen Hydrophobizitäten der einzelnen AS der Signalsequenzen ermittelt. Die Berechnung erfolgte unter Verwendung der GRAVY-Software.

Für die bioinformatische Betrachtung, der mittels SILAC-Methode gewonnenen Daten, wurden die einzelnen Signalsequenzen der detektierten Proteine erfasst und sowohl in sekretorische und integrale Membranproteine, als auch in SP- oder SAS-tragende Proteine unterteilt. Weiterhin wurde unterschieden zwischen Proteinen, deren Biosynthese sich durch die Anwesenheit von CT verändert hat (CT-sensitive Proteine) und jenen, deren Proteinbiosynthese unbeeinflusst blieb (CT-resistente Proteine).

Zur weiteren Analyse wurde die Häufigkeit der einzelnen Hydrophobizitäten gegen die Gesamthydrophobizität aufgetragen. Hierbei wurde die Häufigkeit einer spezifischen Hydrophobizität, die von 0-100 variieren kann, in Klassen unterteilt, die diesen Bereich in 25 4er Schritte aufteilen. So wird eine Y-Achse erzeugt, die eine Skala von 0-25 aufzeigt und eine X-Achse von 0-100. Durch die Unterteilung in die 25 Klassen werden Gruppen, in denen eine signifikant erhöhte Anzahl von sensitiven oder resistenten Signalsequenzen vertreten ist, hervorgehoben.

Längenanalyse der Signalsequenzen

Die Länge der Signalsequenzen wurde ebenfalls als Faktor für die CT-Sensitivität untersucht. Hierfür wurden die Signalsequenzen in Klassen im Bereich von 0-50 unterteilt, wobei jede

Klasse einen 4er-Schritt darstellt. Die Häufigkeiten dieser Längen wurden in einer Skala von 0-100 dargestellt. Anschließend wurde die Häufigkeit der Signalsequenzen dieser Klassen gegen die Länge der Signalsequenzen aufgetragen.

Sequenz-Alignments

Die Signalsequenz-Alignments wurden mit Hilfe der Software ClustalW erstellt. Anschließend wurden die Vergleiche manuell kontrolliert und verfeinert. Das konformationelle Konsensusmotiv konnte durch die fuzzpro-Applikation der EMBOSS Recheneinheit und der Geneious Pro Software 5.4.4 identifiziert werden. Die gleiche Software wurde für die spätere Motivsuche genutzt.

Strukturelle Darstellung von Proteinstrukturen und Signalsequenzen

Zur Visualisierung von helikalen Signalsequenzstrukturen oder lösemittelzugänglichen Signalsequenzoberflächen wurde das PyMol-Software-Paket verwendet.

2.2.2.6 Durchflusszytometrische Analyse der Proteinbiosynthese von Markerproteinen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, eine quantitative Bestimmung von fluoreszenzmarkierten intrazellulären Proteinen und Oberflächenproteinen in lebenden Zellen durchzuführen. Werden diese fluoreszenzmarkierten Proteine von der Zelle selbst synthetisiert, ist die Gesamtfluoreszenzintensität ein Maß für die Biosynthese der Proteine. Bei der Durchflusszytometrie muss zunächst eine Vereinzelung der Zellen erreicht werden. Hierfür werden die Zellen durch ein Kapillarsystem an einer Vorwärtsstreulichtquelle (*forward scatter*, FSC) und einer Seitwärtsstreulichtquelle (*sideward scatter*, SSC) entlang transportiert. Dadurch ist es möglich, die Größe (FSC) der Zellen und ihre Granularität (SSC) zu bestimmen und so eine bestimmte Population zu analysieren (*Gating*). Zusätzlich ist es möglich, die Zellen in einer definierten Wellenlänge anzuregen und die Emission fluoreszenzmarkierter Moleküle zu detektieren.

Für die Quantifizierung der Biosynthese der GFP-fusionierten Markerproteine wurden 4.5×10^5 HEK293-Zellen in 12-Wellplatten ausgesät und nach 20 h transient transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte eine Inkubation der Zellen für 4,5 h im Brutschrank mit einer 5% CO₂-Atmosphäre bei 37 °C. Es zeigte sich, dass nach 4,5 h Inkubation der frühestmögliche Zeitpunkt war, um die Behandlung der Zellen vorzunehmen, eine hohe Transfektionsrate zu erzielen und eine Beeinflussung der Transfektion durch die Testsubstanzen und/oder eine

Beeinflussung der Testsubstanzen durch die Transfektion auszuschließen. Anschließend wurden die Zellen für 19 h in 400 µl Medium mit den Testsubstanzen (Endkonzentration 10 µM oder 30 µM) im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden Cycloheximid (Endkonzentration 20 µg/ml) und DMSO verwendet. Cycloheximid ist ein Inhibitor der Proteinbiosynthese und wirkt auf ribosomaler Ebene. DMSO wurde als Negativkontrolle gewählt, da alle Testsubstanzen in DMSO gelöst wurden. Die DMSO-Endkonzentration im Zellmedium betrug bei allen Proben 1%. Zu beachten ist, dass Testsubstanzen mit hoher Hydrophobizität auch mit Kunststoffoberflächen interagieren können, so dass die wirksame Konzentration auf den Zellen im Einzelfall nicht sicher bestimmt werden kann. Nach 19 h Inkubation wurden die Zellen zweimal mit einer PBS-Lösung gewaschen. Danach erfolgte das Lösen der Zellen von den 12-Wellplatten mit 1 ml PBS-Lösung und eine mechanische Vereinzelung. Darauf folgend wurde die Zellsuspension in *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) Reagenzgefäße (5 ml) überführt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen für 5 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgten zwei Waschgänge mit 1 ml kaltem PBS. Vor der Messung wurden die Zellen in 250 µl PBS-Lösung resuspendiert. Die Fluoreszenz der einzelnen Proben wurde dann mittels des FACSCalibur Systems gemessen.

Für die Auswertung wurde mit der BD CellQuest Pro Software die Gesamtfluoreszenzintensität von 1×10^4 Zellen jeder Probe ermittelt. Die Normalisierung der Werte erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurde der Hintergrundwert von untransfizierten HEK293-Zellen von den gemessenen Werten subtrahiert. Anschließend wurden die Messwerte erneut normalisiert und zwar durch die Subtraktion der Fluoreszenzintensität, die während der 4,5 h Inkubationszeit entstanden ist. Dabei repräsentieren die Intensitäten der Zellen, die nach 4,5 h mit Cycloheximid behandelt wurden, den Zeitpunkt t_0 der Testsubstanzenbehandlung.

Für die Erzeugung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde unter gleichen Versuchsbedingungen 0-50 µM der entsprechenden Testsubstanzen verwendet. Die DMSO-Kontrolle wurde immer als 100%-Wert zur Normalisierung eingesetzt.

2.2.2.7 Quantitative Detektion sekretierter GFP-Fusionsproteine

Um die Funktionalität mutierter SP zu überprüfen, wurden verkürzte GFP-fusionierte Konstrukte der entsprechenden Proteine erzeugt, welche nur noch das SP, einen Bereich des

Proteins ohne TM, GFP und einen His-Tag aufwiesen. Die Konstrukte wurden anschließend transient in HEK293-Zellen exprimiert. Wenn die Funktionalität der mutierten SP weiterhin gegeben war, wurden die Proteine aus der Zelle als sekretorische Proteine ins Medium abgegeben. Wenn die Funktionalität der SP jedoch durch die Mutation beeinflusst wurde, verringerte sich die Sekretion der Proteine oder wurde vollständig unterbunden. Die Sekretion der GFP-Fusionsproteine wurde mit zwei verschiedenen Methoden analysiert: Zum einen wurden die Fusionsproteine mittels His-Tag isoliert und dann auf Immunoblots detektiert, zum anderen wurden sie fluorimetrisch quantifiziert.

Aufreinigung der Fusionsproteine

Für die Aufreinigung wurden 4×10^6 HEK293-Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale ausgesät und 24 h später transient transfiziert (siehe 2.2.2.3). Nach einer 24 h Wachstumsphase wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zelltrümmer durch eine 5 min Zentrifugation bei $200 \times g$ (RT) entfernt. Anschließend wurden $250 \mu\text{l}$ (*bed volume*, pro 100 mm Zellkulturschale) *TALON Metal Affinity Resin*, die zuvor zweimal mit Waschpuffer ($37 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $11 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 300 mM NaCl , pH 7.0) gewaschen wurden, zum Überstand gegeben. Eine Inkubation für 30 min gewährleistete eine adäquate Kopplung der GFP-Fusionsproteine an den Resin. Im weiteren Verlauf wurde der Resin durch Zentrifugation (2 min bei $700 \times g$, RT) gesammelt, 3 x mit Waschpuffer (jeweils 10 min im Rotator) gewaschen und der Resin in $200 \mu\text{l}$ Elutionspuffer resuspendiert ($37 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $11 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 300 mM NaCl , 150 mM Imidazol , pH 7.0). Nach der Elution wurde der Resin durch Zentrifugation entfernt.

Verdau der N-Glykosilierungen der Fusionsproteine und Charakterisierung durch SDS-PAGE

$20 \mu\text{l}$ dieser Lösung (siehe Aufreinigung der Fusionsproteine) wurden für den Verdau der N-Glykosilierungen mit Hilfe des Enzyms PNGaseF verwendet. Nach Zugabe von $2 \mu\text{l}$ Denaturierungs-Puffer ($5\% \text{ (w/v) SDS}$, $10\% \text{ (v/v) } \beta\text{-Mercaptoethanol}$) wurden die Proben für 8 min auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach der Zugabe des Reaktionspuffers ($2.2 \mu\text{l}$, $0.5 \text{ M Natriumphosphat}$, pH 7.5), PNGaseF ($1 \mu\text{l}$, $2.5 \text{ U}/\mu\text{l}$) und NP40 ($2.2 \mu\text{l}$, 10%) folgte die Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 h. Nach Zugabe von $7 \mu\text{l}$ 4 x Laemmli-Puffer (60 mM Tris-HCl , $2\% \text{ (w/v) SDS}$, $10\% \text{ (v/v) Glycerol}$, $5\% \text{ (v/v) } \beta\text{-Mercaptoethanol}$, $0.1\% \text{ (w/v) Bromphenol}$

Blau, pH 6,8) wurde die Lösung für 3 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE separiert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte, nach der Beladung der Geltaschen mit 20 µl Probe (siehe oben), bei 0,25 mA/cm² Gel für 1-1,5 h in Laufpuffer (3 g/l Tris, 14,4 g/l Glycin, 1 g/l SDS, pH 7,3). Anschließend wurde das SDS-Gel für den Western Blot verwendet.

Tabelle 2.2.2.7: SDS-Gel Ansatz

	Trenngel (13%)	Sammelgel
H ₂ O	2,5 ml	3,5 ml
Acrylamid-Bisacrylamid 30%/ 0,8%	3 ml	835 µl
Tris-HCL 0,625 M, pH 6,8	-	625 µl
Tris-HCL 0,75 M, pH 8,8	5,625 ml	-
SDS 20%	56,5 µl	25 µl
TEMED	2,5 ml	5 µl
APS 10%	25 µl	79 µl

Western Blot

Beim Western Blot werden die in einem SDS-Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt, um die Detektion von bestimmten Proteinen durch spezifische Primär- und enzymkonjugierte Sekundärantikörper zu ermöglichen. Die Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurde mittels Inkubation für 1 h in TBS-T (6,1 g/l Tris-HCl, 8,8 g/l NaCl, 0,05% v/v Tween20, pH 7,5) mit 2% BSA sichergestellt. Der verwendete Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-anti-GFP Antikörper (Clontech, USA), wurde einer 1:4000 Verdünnung zugegeben und 1 h auf der Nitrozellulose belassen. Danach wurde die Nitrozellulose 3x für 10 min mit TBS-T (ohne BSA) gewaschen und der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1500 (TBS-T + 2% BSA) zugegeben. Als Sekundärantikörper wurde alkalische-Phosphatase-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG (Dianova, GER) verwendet. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte über Nacht. Die Nitrozellulosemembran wurde wieder 3x mit TBS-T gewaschen und die Proteinbanden mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat und p-Nitrotetrazoliumblauschwarz nach Herstellerangaben visualisiert.

Fluorimetrische Messungen

Die fluorimetrische Messung der GFP-Fusionskonstrukte erfolgte mit den übrigen 180 µl des oben beschriebenen 200 µl Eluats (siehe Aufreinigung der Fusionsproteine). Diese 180 µl wurden 2 min bei RT und 13000 x g zentrifugiert und der Überstand im Anschluss direkt für fluorimetrische Messungen verwendet. Die Lösung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm angeregt. Die Detektion der Emission erfolgte bei $\lambda = 507$ nm (22, 111-113).

2.2.3 Hochdurchsatz-Fluoreszenzanalyse

In dieser Arbeit wurde ein Assay für eine Hochdurchsatz-Fluoreszenzanalyse entwickelt und etabliert, mit dem Ziel, neue kleine Moleküle zu identifizieren, die eine inhibitorische Wirkung auf das Sec61-Translokon aufweisen. Der zweistufige Screen wurde dann in Zusammenarbeit mit der Screening Unit des FMP durchgeführt. Die verwendete Substanzbibliothek umfasste 37312 Testsubstanzen. Der größte Teil (32736) bestand aus Verbindungen, die käuflich erworben wurden (114). Eine kleinere Gruppe (4576) wurde von verschiedenen akademischen Forschungsgruppen zur Verfügung gestellt. Alle Testsubstanzen der Substanzbibliothek lagen in 10 mM Konzentration in DMSO gelöst vor.

2.2.3.1 Hochdurchsatz-Screen

Für den Primärscreen wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil das sekretorische GFP-Fusionskonstrukt CRF₁R.GFP unter der Kontrolle eines Tet-On Promotors exprimierten. Dieses Protein durchläuft den Sec61-Translokon-Pathway. Mittels eines Zelldispensers wurden 30 µl einer Zellsuspension in 384-Wellplatten ausgesät (12000 Zellen/Well) und die Zellen für 24 h in einem Brutschrank bei 37 °C (5% CO₂) inkubiert. Parallel wurden die jeweiligen Testsubstanzen auf einer 384-Well-Mikrotiter-Testsubstanz-Mutterplatte in die Reihen 1-22 in einer Endkonzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Danach wurden 0,2 µl der Testsubstanzlösung auf eine 384-Wellplatte, in der 40 ml DMEM vorgelegt wurden, transferiert, so dass jede Substanz in einer Konzentration von 50 µM vorlag. Die Pipettierarbeiten wurden mit Hilfe eines Flüssigkeitstransferroboters durchgeführt, der mit einem 384-Kanal-Aufsatz mit festen Pipettenspitzen ausgestattet war. 10 µl von dieser Vorverdünnung wurden anschließend mit dem gleichen Gerät auf die Zellen gegeben und für 1 h inkubiert (Endkonzentration 10 µM; Testsubstanz in den Reihen 1-22). Diese Inkubation erfolgte, um zu gewährleisten, dass die Testsubstanz in die Zelle eindringen und mit den Komponenten des Sec61-Translokon-Pathways interagieren kann, bevor die Expression des

Sensorproteins induziert wurde. In einer weiteren 384-Well-Mikrotiterplatte wurde in den Reihen 1-23 Doxycyclin in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ in DMEM vorverdünnt (der Reihe 24 wurde kein Doxycyclin zugesetzt). 10 μl dieser Vorverdünnung wurden anschließend zu den Zellen gegeben. Damit lagen die Testsubstanzen in einer Endkonzentration von 10 μM in 50 μl Medium mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin vor. Durch die Anwendung dieses Schemas wurden auch die Kontrollen jeder 384-Wellplatten erzeugt. In Reihe 23 lagen induzierte Zellen vor, zu denen keine Testsubstanz zugegeben wurde und die dadurch das maximale Fluoreszenzsignal aufweisen sollten (Positivkontrolle). In Reihe 24 lagen nicht induzierte Zellen vor, welche das minimale Fluoreszenzsignal anzeigen (Negativkontrolle).

Im Anschluss folgte eine Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre. Um störenden Einflüssen der Eigenfluoreszenz des Mediums entgegenzuwirken, wurde das Medium der einzelnen Wells mit einem Mikroplatten-Waschroboter bis auf 10 μl abgesaugt. Die Auswertung wurde mit dem Plattenlesegeräts Safire2 durchgeführt. Die GFP-Fluoreszenz-Messungen erfolgten über den Plattenboden mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 498 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 512 \text{ nm}$ mit einem beidseitigen 5 nm Bandfilter. Die Wellenlängen wurden für die Messung der GFP-Fluoreszenz in DMEM optimiert, um die Einflüsse der Autofluoreszenz des Mediums weiter zu minimieren.

Mit dem Primärscreen wurden Testsubstanzen identifiziert, die einen Effekt auf die Transkription, Translation und den Sec61-Translokation-Pathway haben. Der Primärscreen wurde für alle 37312 Testsubstanzen auf insgesamt 106 384-Well-Zellkulturschalen durchgeführt.

Der folgende Sekundärscreen wurde mit den Hit-Substanzen des Primärscreens durchgeführt. Hierfür wurde anstelle des CRF₁R.GFP Fusionsproteins nur zytosolisch exprimiertes, unfusioniertes GFP verwendet, welches ebenfalls unter der Kontrolle eines Tet-On Promotors stand. Mit diesem Sekundärscreen war es möglich, alle Testsubstanzen des Primärscreens auszuschließen, die einen Effekt auf Transkription und Translation aufweisen. Der Sekundärscreen wurde auf die gleiche Weise wie der Primärscreen durchgeführt, jedoch erfolgte eine Messung in Triplikaten.

2.2.3.2 Ermittlung von Konzentration-Wirkungs-Kurven der Testsubstanzen

Zur Ableitung von Konzentration-Wirkungs-Kurven wurden von allen nach dem Sekundärscreen als inhibierend befundenen Testsubstanzen 5 µl einer 10 mM Testsubstanzlösung in die Reihen 1-12 einer 384-Wellplatte vorgelegt. Danach erfolgten Serienverdünnungen. Zu jeder Testsubstanzreihe wurden 5 µl DMSO zugegeben und 5 µl der so entstandenen Lösung anschließend in das benachbarte leere Well übertragen. Auf diese Weise entstanden 11 fortlaufende Serienverdünnungen. Die Verdünnungsreihe wurde mit einem Flüssigkeitstransferroboter angelegt, der mit einem 384-Kanal-Aufsatz mit wechselbaren Pipettierspitzen ausgestattet war. Die Pipettierspitzen wurden nach jedem Pipettiervorgang ausgetauscht, um die Fehlerfreiheit der Serienverdünnung sicherzustellen. Die weitere Verdünnung der Testsubstanzen erfolgte durch den Transfer von 1,6 µl der Testsubstanzlösung in Wells mit 80 µl DMEM. Von dieser wurden 10 µl der resultierenden Testsubstanzlösung in Wells mit Zellen in 30 µl DMEM überführt. Dadurch wurde eine Endkonzentration der Testsubstanzen im Zellmedium von 0,02 µM - 20 µM eingestellt. Die Proben wurden für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde mittels Doxycyclin die Expression des Zielgens induziert und die GFP-Fluoreszenz mittels Safire2 gemessen (siehe Hochdurchsatz-Screen 2.2.3.1).

2.2.3.3 Datenanalyse und statistische Auswertung des Hochdurchsatz-Screens

Für die Datenanalyse des Hochdurchsatz-Screens wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten anhand von Positivkontrollen (Median = 100% Wert) und Negativkontrollen (Median = 0%) einer Platte normalisiert und in Prozentwerte umgerechnet. Zusätzlich wurde zu jedem gemessenen Wert der zugehörige Z-Wert ermittelt (115), sowie die Z-Faktoren, der Positiv- und Negativkontrollen, die für jede einzelne Platte bestimmt wurden (116).

Z-Wert

Jede Messung wurde durch die Errechnung des statistisch robusten Schätzwertes normalisiert. Der Z-Wert ergibt sich durch

$$\text{Gl. 1:} \quad \text{Z-Wert} = \frac{X_i - \text{Median}}{\text{MAD} * 1.48258}$$

Der Z-Wert beschreibt in der Einheit Standardabweichung (σ) die Abweichung nach unten und nach oben vom Median. Dabei stellt Xi das Signal der einzelnen Proben dar. Der Median ist der Zentralwert aller Signale der auf der Platte vorhandenen Proben ohne Berücksichtigung

der Kontrollen. Der MAD ist die mittlere absolute Abweichung vom Median und wurde für jeden einzelnen Messwert jeder Platte errechnet (116). Der Korrekturfaktor 1.4826 wird angewendet, da die originale Definition des Z-Werts auf den nicht statistisch robusten Parametern Mittelwert und Standardabweichung basiert und die Standardabweichung einen größeren Wert aufzeigt als der MAD.

Z-Faktor

Es wurde zusätzlich der Z-Faktor für jede gemessene Platte errechnet. Dieser ergibt sich aus

$$\text{Gl. 2:} \quad \text{Z-Faktor} = 1 - \frac{3 \cdot (\sigma^P + \sigma^N)}{|\mu^P - \mu^N|}$$

Der Z-Faktor ist ein Maß für die Signalbandbreite bzw. die Stabilität des Messfensters während eines Screens. Er wird für jede Platte separat über die Positiv- und Negativkontrollen berechnet und stellt eine metrische Qualitätskontrolle dar. σ^P und σ^N sind die Standardabweichungen der Positiv- und Negativkontrollen jeder Platte. μ^P und μ^N bezeichnen die Durchschnittswerte der Positiv- und Negativkontrollen der Platten (116).

Eine erste Qualitätskontrolle und eine weitere Normalisierung der Daten erfolgte über eine haus eigene Software der Screening Unit des FMP. Die Zusammenfassungen der chemischen Strukturen der Testsubstanzen und die Berechnung der molekularen Eigenschaften wurde mittels der Pipeline Pilot Software (BIOVIA, USA) durchgeführt.

Um aus den Dosis-Wirkungs-Kurven die IC_{50} -Werte zu bestimmen, wurde die Vier-Parameter log-Logistig Funktion des „drc“ R-Packets angewendet (117). Unter Nutzung des R-Statistik Systems (R Foundation for Statistical Computing, AUT) wurden zur grafischen Darstellung die Prozentwerte der Aktivität gegen die Konzentrationen aufgetragen.

2.2.3.4 Zellfreies Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassay (87)

Die Signalsequenz des Screening-Targets CRF_1R wurde an den N-Terminus des bovinen Pre-Pro lactins (pPL) als Markerprotein fusioniert ($CRF_1R.pPL$), um im Experiment eine 78 Aminosäurereste lange naszierende Kette zu erzeugen. Diese weist jedoch kein Stoppcodon auf, um die naszierende Kette im Sec61-Komplex zunächst über die noch gebundene tRNA fixieren zu können. Die Erzeugung der naszierenden Kette erfolgte, indem zunächst ein entsprechendes PCR Fragment erzeugt wurde, welche anschließend, mittels T7 RNA Polymerase (Promega, USA), *in vitro* transkribiert wurde. Die aufgereinigte RNA wurde mittels caninem Retikolozytenlysate (Promega, USA) in Anwesenheit von L-[^{35}S]-Methionin

(PerkinElmer, USA) translatiert und markiert (20min). Im Folgenden wurden pankreatische mikrosomale Membranen mit Testsubstanzen oder DMSO (Kontrolle) vorinkubiert (15 min) und dem Gemisch zugegeben. Anschließend wurde erst für 10 min auf Eis und dann für 10 min bei RT inkubiert. Das Entlassen, der an das Ribosom über die Aminoacyl-tRNA, gebundenen naszierenden Kette aus dem Sec61-Komplex (kein Stoppcodon, s.o.), erfolgte durch die Zugabe von 2 mM Puromycin für 7 min (Puromycin ist eine Substanz, die die Akzeptorstelle im Ribosom besetzt und eine Aminoacyl-rRNA simuliert). Da zusätzlich ein Protease-Protectionassay in dieses Experiment integriert wurde, erfolgte für eine äquivalente Menge der Proben eine 30 min Behandlung auf Eis mit Proteinkinase K (PK; Roche, CH; oder blieb unbehandelt. In diesem Fall wurde die Reaktion durch die Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (Thermo Fisher Scientific, USA) beendet. 10 µl des Reaktionsansatzes wurden im Anschluss mit 300 µl Niedrig-Salz-Puffer (80 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 50 mM HEPES, pH 7.6) gemischt und für 10 min bei 4 °C mit 21382 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 30 µl Laemmli-Proben-Puffer für die SDS-PAGE aufgenommen (siehe 2.2.2.7). Der Rest der *in vitro* Translation wurde jeweils in 4 Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot erhielt mit Testsubstanz behandelte Mikrosomen, die drei anderen DMSO behandelte Mikrosomen. Es folgten weitere Inkubationen für 10 min auf Eis und für 5 min bei RT. Von den drei Aliquots der mit DMSO behandelten Mikrosomen wurde nun einem noch einmal DMSO zugeführt und einem zweiten noch einmal Testsubstanz. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 5 min bei RT und die Behandlung mit Puromycin. Die naszierenden Ketten wurden durch Zentrifugation isoliert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die SDS-PAGE wurde, wie in 2.2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung der Proteingele erfolgt mittels Autoradiographie. Die Experimente des zellfreien Assays wurden in Kooperation mit Kurt Vermeire (Katholische Universität Leuven, Belgien) durchgeführt.

2.2.3.5 Strukturbasiertes Screening und Identifikation von FMP-401319 Analoga

Die gefundenen Hit-Substanzen wurden mittels des Tanimoto Molekular Similarity Werkzeugs in Verbindung mit Pipeline Pilot und unserer hausinternen Datenbank (DACS) strukturell erfasst. Die DACS umfasst ca. 38 Millionen chemische Strukturen, die von 43 Anbietern zur Verfügung gestellt wurden (<http://www.open-dacs.de/>). Übereinstimmend mit dem Tanimoto-Grenzwert von 0,6 wurden 45 Analoga der Hit-Substanz FMP-401319 gefunden und für eine weitere Analyse der Struktur-Wirkungs-Eigenschaften ausgewählt. Die

Substanzen wurden von kommerziellen Anbietern bezogen und für die weiteren Experimente (zelluläres Biosyntheseassay und zellfreies Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassay) in DMSO gelöst.

2.2.4 Statistik

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle statistischen Analysen mittels der GraphPad Software durchgeführt. Weiterhin wurden Werte (*p values*), die kleiner als 0,001 waren, als statistisch signifikant erachtet.

ERGEBNISSE

Für einen der wichtigsten Transportmechanismen des sekretorischen Wegs, der Translokation von Proteinen mit Hilfe des Sec61-Komplexes, existierte bis zur Entdeckung von Hun-7293 kein Inhibitor (92). Es wurde postuliert, dass Hun-7293 in einem Signalsequenz-abhängigen Mechanismus den Sec61-Komplex inhibiert und damit die Proteinbiosynthese einer kleinen Anzahl von Proteinen reduziert. Erst mit der Einführung des Hun-7293-Derivats CT, das aus proteinogenen Aminosäuren besteht und durch eine Festphasensynthese hergestellt werden konnte, erschien es möglich, aus einem Signalsequenz-selektiven Molekül (gemischter Typ 1- / Typ 2-Inhibitor), durch Derivatisierung, ein Signalsequenz-spezifisches Cyclodepsipeptid herzustellen. Diese Hoffnung erfüllte sich nicht. Umfangreiche Derivatisierungsstudien mit Cotransin zeigten, dass weder die Selektivität noch die pharmakologische Potenz geändert werden konnte (M. Beyermann, I. Coin, C. Westendorf, R. Schülein; FMP Berlin; unpublizierte Daten). Es zeigte sich, dass CT die Proteinbiosynthese weiterer Proteine inhibiert und daher weniger selektiv war, als bisher angenommen (104, 105, 109). Es stellte sich aufgrund dessen die Frage, wie selektiv CT tatsächlich ist.

Um dies zu untersuchen, wurde in der AG Protein Trafficking (R. Schülein, FMP Berlin) in Kooperation mit der AG Massenspektrometrie (E. Krause, FMP, Berlin) eine *SILAC*-basierte *Proteomics*-Analyse durchgeführt. Ziel dieser Studie war nicht nur die Bestimmung der tatsächlichen Cotransin-Selektivität, sondern auch die Identifizierung möglicher Konsensusmotive in den Signalsequenzen der cotransinsensitiven Proteine. In der durchgeführten *SILAC*-Methodik wurden Hep G2-Hepatocyten für 17 h mit 30 μ M CT (sättigende Konzentration) oder DMSO inkubiert. Bei der darauf folgenden massenspektrometrischen Analyse wurden insgesamt 217 Proteine detektiert; 53 sekretorische Proteine, die alle ein SP aufweisen und von denen 50 eine CT-Sensitivität zeigten, ferner 164 integrale Membranproteine, von denen nur 21 signifikant in ihrer Proteinbiosynthese durch CT beeinflusst wurden. 12 dieser 21 integralen Membranproteine verfügten über eine SAS, acht der neun restlichen integralen Membranproteine über ein SP (siehe Tabelle:3) (110).

Tabelle 3: Ergebnisse der *Proteomics*-Analyse

	Detektiert	Sensitiv	Sen. SP	Sen. SAS	Unbestimmt
Integrale Membranproteine	164	21	8	12	1
Sekretorische Proteine	53	50	50	0	0

Bei einem Protein ließ sich nicht eindeutig bestimmen, ob ein SP oder eine SAS vorhanden ist. Von den 143 identifizierten integralen Membranproteinen, die keinen Effekt gegenüber CT zeigten, wiesen 47 ein SP und 94 eine SAS auf. Bei zwei Proteinen war keine Bestimmung der Art der Signalsequenz möglich. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass Cotransin weitaus weniger selektiv ist, als bisher angenommen. Bei einer sättigenden Cotransinkonzentration waren fast alle sekretorischen Proteine cotransinsensitiv, die Mehrzahl der Membranproteine dagegen cotransinresistent. Die Sensitivität gegenüber CT und somit das Ausmaß der Inhibition der Proteinbiosynthese variierte dabei bei den einzelnen Signalsequenzen stark. Die Ergebnisse des SILAC-Experiments wurden für ausgewählte Proteine auch mittels Immunoblot verifiziert (Anhang A. 1).

3.1 Bioinformatische Analyse der Ergebnisse der *Proteomics*-Studie

Bis heute ist es nicht gelungen eine Konsensussequenz zu identifizieren, die eine CT-Sensitivität vermittelt. Dies lag zum einen an der Annahme, dass nur wenige Proteine cotransinsensitiv sind und somit nur wenige Signalsequenzen zur Analyse zur Verfügung standen. Zum anderen ist der genaue Wirkungsmechanismus von CT am Sec61-Komplex noch nicht aufgeklärt. In einigen Fällen konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Sensitivität gegenüber CT oder anderen Derivaten von Hun-7293, wie CAM741 oder NF1028, verantwortlich waren, jedoch konnten keinerlei Übereinstimmungen oder ein Konsensusmotiv gefunden werden (19, 47, 105, 107).

In dieser Arbeit wurden daher zunächst die durch die SILAC-Methodik erhaltenen Daten analysiert, um erstmals Eigenschaften von Signalsequenzen zu identifizieren, die für die CT-Sensitivität verantwortlich sein könnten.

3.1.1 Analyse der Signalsequenzhydrophobizität

Der erste bioinformatische Ansatz, der verfolgt wurde, beruhte auf der Hypothese, dass die Öffnung des proteinleitenden Kanals des Sec61-Komplexes allein auf der Hydrophobizität der Signalsequenzen beruht. Dies würde die stark erhöhte Anzahl sensibler SP gegenüber SAS erklären, da SP im Durchschnitt eine geringere Hydrophobizität aufweisen als SAS. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Proteine in sekretorische und integrale Membranproteine

unterteilt. Weiterhin fand die Unterscheidung zwischen CT-sensitiven und CT-resistenten sekretorischen und integralen Membranproteinen statt. Die Proteingruppen, die sich daraus ableiteten waren: CT-resistente integrale Membranproteine (143), CT-sensitive integrale Membranproteine (21) und CT-sensitive sekretorische Proteine (50). Es konnte keine CT-resistente Gruppe von sekretorischen Proteinen gebildet werden, da nur zwei entsprechende Proteine identifiziert werden konnten. Die grafische Darstellung erfolgte durch das Auftragen der signalsequenzspezifischen Hydrophobizität, die in Klassen von Viererschritten unterteilt wurden, gegen die Gesamthydrophobizität. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, konnte eine Korrelation zwischen der Hydrophobizität einer Signalsequenz und ihrer CT-Sensitivität nicht verifiziert werden.

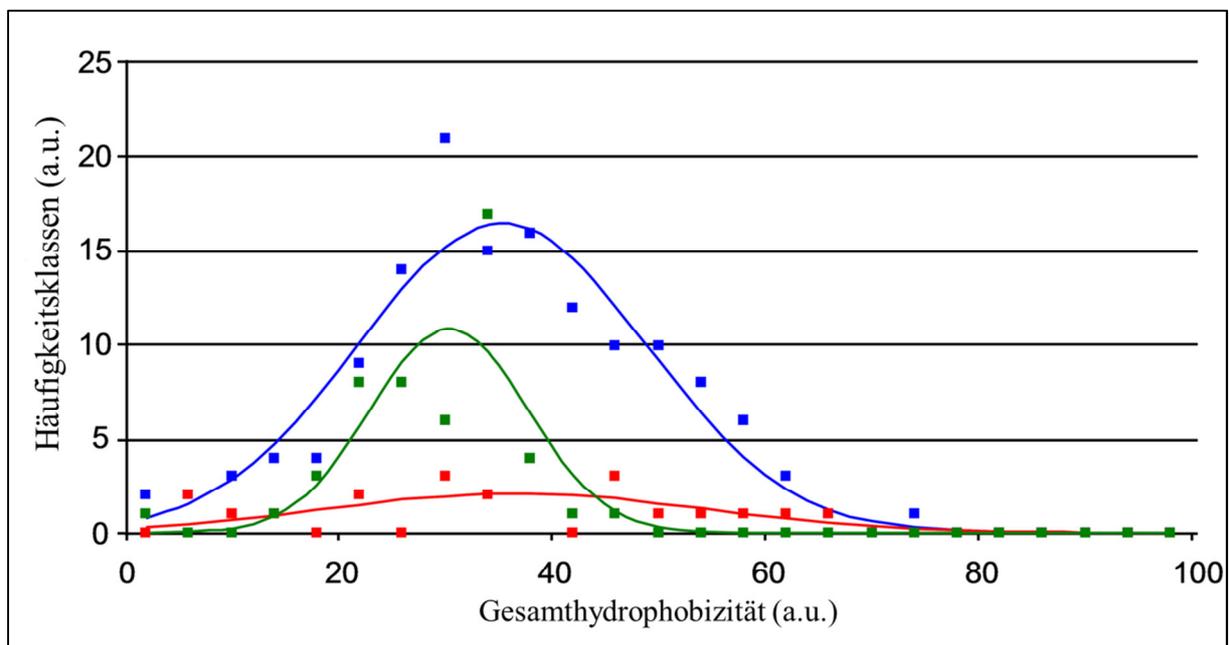


Abb. 11: Darstellung des Einflusses der Signalsequenzhydrophobizität auf die Cotransin-Sensitivität. Die blaue Kurve repräsentiert 143 CT-resistente integrale Membranproteine. Die rote Kurve zeigt 21 CT-sensitive integrale Membranproteine und die grüne Kurve repräsentiert 50 CT-sensitive sekretorische Proteine. Die Häufigkeit der Signalsequenzhydrophobizität (eingeteilt in Hydrophobizitätsklassen von 0-100 in Viererschritten auf einer Skala von 0-25) wurde gegen die Gesamthydrophobizität der Signalsequenzen (von 0-100) aufgetragen.

Man sieht eine Verteilung der Signalsequenzhydrophobizitäten über den gesamten Bereich der Hydrophobizitätsskala, sowohl für die CT-sensitiven als auch für die CT-resistenten Signalsequenzen. Es sind auch keine wesentlichen Unterschiede zwischen sekretorischen und integralen Membranproteinen auffällig.

3.1.2 Längenanalyse der Signalsequenzen

Eine weitere Möglichkeit für eine erhöhte CT-Sensitivität könnte in der Signalsequenzlänge liegen. Um dies zu untersuchen, wurden die Signalsequenzlängen von 0-50 in Klassen unterteilt, in der jede Klasse einem 4er Schritt entspricht und in einer Skala von 0-100 gegen die Gesamtlänge der Signalsequenzen aufgetragen ist. Wie in Abbildung 12 deutlich wird, zeigte sich auch hier kein Zusammenhang zwischen der Signalsequenzlänge und der CT-Sensitivität.

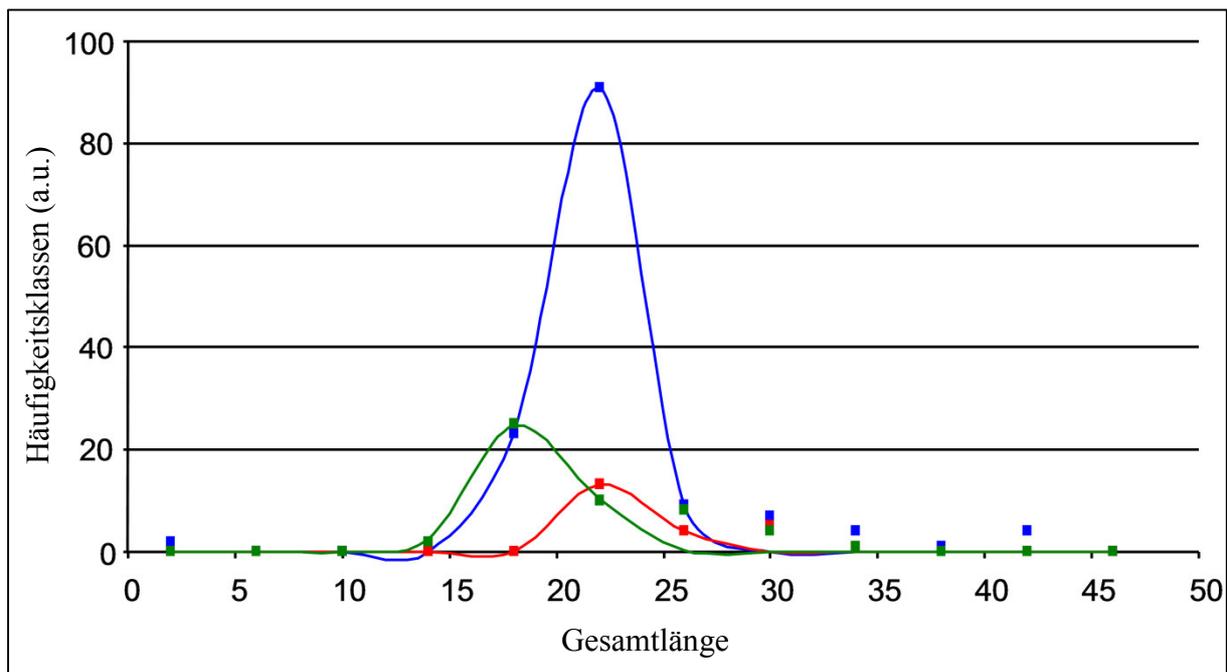


Abb. 12: Darstellung des Einflusses der Signalsequenzlänge auf die Cotransin-Sensitivität. Die Kurven zeigen 143 CT-resistente integrale Membranproteine (blau), 21 CT-sensitive integrale Membranproteine (rot) und 50 CT-sensitive sekretorische Proteine (grün). Die Häufigkeit der Signalsequenzlänge (eingeteilt in Klassen von 0-50 AS in Vierschritten auf einer Skala von 0-100) wurde gegen die Gesamtlänge der Signalsequenzen aufgetragen.

3.1.3 Analyse der strukturellen und sterischen Eigenschaften der Signalsequenzen

Ein weiterer Schritt der bioinformatischen Analyse der SILAC-Ergebnisse war der Sequenzvergleich aller CT-sensitiven und -resistenten Signalsequenzen. Die Alignments wurden mit der ClustalW-Software durchgeführt, mit dem Ziel ein Konsensusmotiv für die CT-Sensitivität zu identifizieren. Es ist jedoch nicht gelungen, anhand der Sequenzalignments ein solches Motiv zu erkennen. Um die Ebene struktureller und sterischer Eigenschaften der

Signalsequenzen in die Analyse einzubeziehen, wurden mit dem Programm PyMol dreidimensionale *in silico*-Modelle der Signalsequenzen erzeugt und miteinander verglichen.

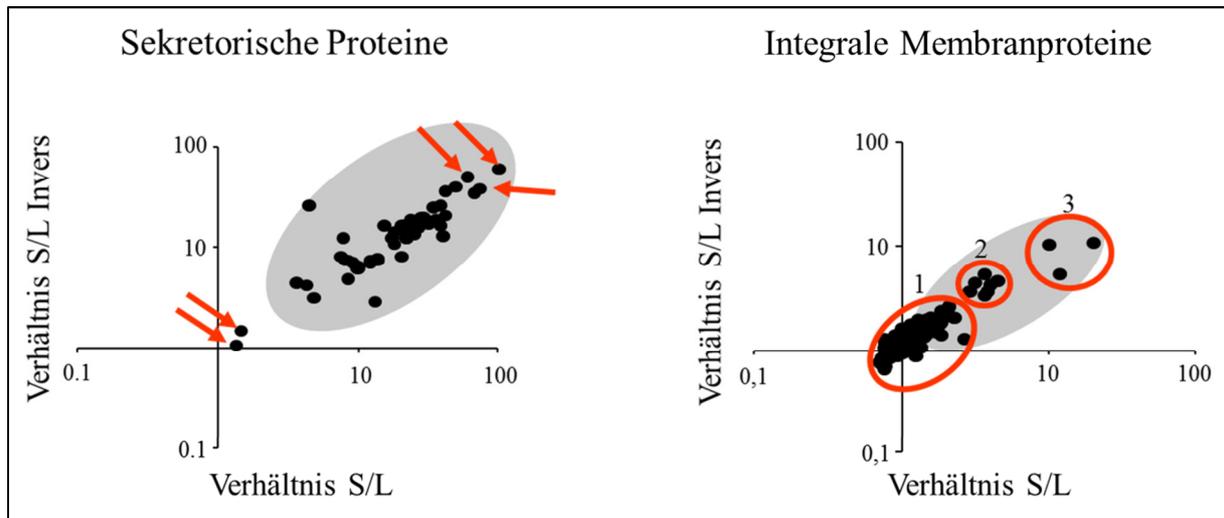


Abb. 13: Cotransin-Sensitivität von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen (SILAC-Experiment). Die Graphen zeigen Dotplots für sekretorische (links) und für integrale Membranproteine (rechts), die durch LCMS/ MS-Analysen identifiziert und quantifiziert wurden. Die Verhältnisse der Proteinexpressionen nach DMSO oder Cotransinbehandlung der Vorwärtsreaktion (schwer/ leicht, SL) und der inversen Reaktion (leicht/ schwer, HL) wurden gegeneinander aufgetragen. Die schwarzen Punkte stellen einzelne Proteine dar. Die grau unterlegten Bereiche zeigen an, welche Proteine signifikant in ihrer Proteinbiosynthese beeinträchtigt wurden. Die roten Kreise 1, 2 und 3 in der Grafik der integralen Membranproteine zeigen die Einteilung der Proteine in die Gruppen: 1) gering sensitive bis CT-resistente Signalsequenzen, 2) CT-sensitive Signalsequenzen und 3) CT-hochsensitive Signalsequenzen. Die roten Pfeile in der Grafik der sekretorischen Proteine zeigen die Proteine an, die für die *in silico*-Darstellung verwendet wurden.

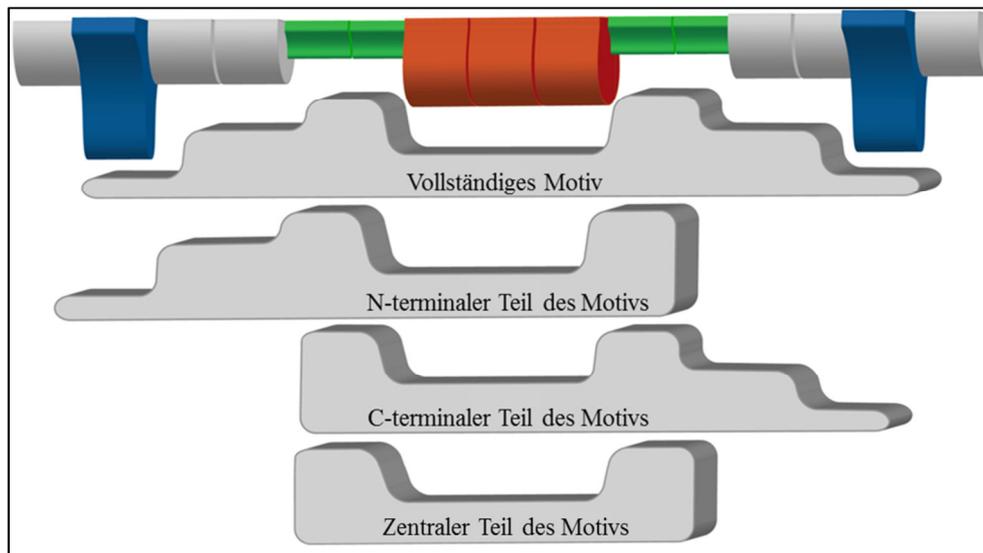
Hierzu mussten Gruppen bestimmt werden, die sich in ihrer CT-Sensitivität stark voneinander unterscheiden. Die Signalsequenzen der integralen Membranproteine wurden in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: hochsensitive Signalsequenzen, sensitive Signalsequenzen und gering sensitive bis CT-resistente Signalsequenzen. Da bei der SILAC-Methode nahezu alle sekretorischen Proteine eine CT-Sensitivität zeigten, wurden die drei am stärksten sensitiven sekretorischen Proteine ausgewählt, die der Gruppe der hochsensitiven Signalsequenzen zugeordnet sind. Die nicht sensitiven sekretorischen Proteine wurden der Gruppe der gering sensitiven bis CT-resistenten Signalsequenzen zugeordnet (Abb. 13).

Durch den visuellen Abgleich der dreidimensionalen Signalsequenzmodelle konnten Auffälligkeiten einzelner Signalsequenzen oder Signalsequenzgruppen festgestellt werden. Durch sich anschließende Alignments mit der ClustalW-Software und visuellen Anpassungen der Ergebnisse konnte ein potentiell strukturelles Konsensusmotiv gefunden werden, das in allen 12 integralen Membranproteinen mit CT-sensitiver SAS vorhanden war (Abb. 14A).

A

Nc	IMP2C	LLTPAREEQPPQHRSKRGGSVGGVQYLSMGMVLLMGLVFASVYIYRYFFL
Nc	IMP2B	QRRAWCWCFCGLAFMLAGVILGGAYLYKYFALQPDDVYYCGIKYIKDDVI
Nc	HLA II	LPMLGRRPGAPESKCSRGCALYTCESILVTLLLAGQATTAYFLYQQQGRLDK
Nc	TMEM230	IALATVLFLLIGAFLLIIGSLLLSGYISKGGADRAVPVLIIGILVFLPGFYH
n/s	MHC I	PIVGI IAGLVLF GAVITGAVVAAVWRRKSSGGEGVKG
Nc	ECE-1	ARTQVEKRLVVLVLLAAGLVACLAALGIQYQTRSPSVCLSEACVSVTSSI
Nc	Acyl-CoA	KVEYVWRNIILMSLHLGALYGITLIP TCKFYTWLWGVFYFVSALGITAG
Ne	TM Prot2	AITSFSFFIALAII LGIS SKYAEDENCPDQNPRLRNWDPGQDSAKQVVIKE
Nc	Erlin1	MTQARVLA AVVGLVAVLLYASIHKIEEGHLAVYYRGGALLT
Nc	LIMP2	MGRCCFYTAGTLLSLLLVT SVTLLVARVFQKAVDQSIEKKIV
Nc	Erlin2	MAQLGAVVA VASSFFCASLFS AVHKIEEGHIGVYYRGGALLTSTS
Nc	AGRP1	LLSLGLSLLL LVVVCVIGS QNSQLQEEELRGLRETF SNFTASTEAVKGLST
<hr/>		
Nc	TNF- α	RRCLFSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVR

B



C

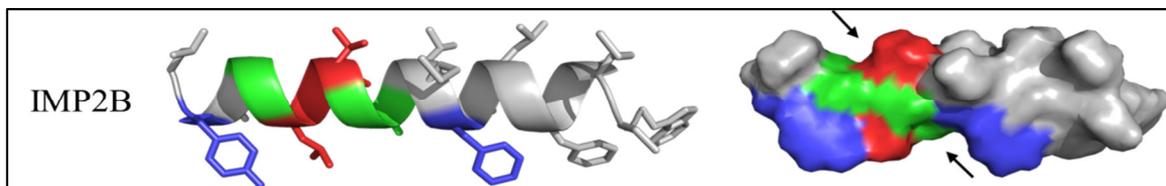


Abb. 14: Sequenzalignment der 12 integralen Membranproteine mit cotransinsensitiver Signalankersequenz (SAS) und schematische Darstellung des identifizierten Konsensusmotivs. (A) In der Grafik sind die 12 SAS-tragenden Proteine in der Stärke der Inhibition ihrer Proteinbiosynthese durch CT absteigend aufgelistet. Folgende Proteine sind gezeigt: IMP2C, *integral membrane protein 2 C*; IMP2B, *integral membrane protein 2 B*; HLA II, *HLA class II histocompatibility antigen gamma chain*; TMEM230, *transmembrane protein 230*; MHC I, *major histocompatibility complex class I antigen*; ECE-1, *endothelin-converting enzyme 1*; Acyl-CoA, *Acyl-CoA desaturase*; TM Prot2, *transmembrane protein 2*; Erlin1, *Erlin-1*;

LIMP2, *lysosome membrane protein 2*; Erlin2, Erlin-2; AGPR1, *asialoglycoprotein receptor 1*; TNF- α , *tumor necrosis factor- α* . Die Bezeichnung Nc steht für einen zytosolischen und Ne für einen extrazellulären N-Terminus (n/s = Orientierung unbestimmt). Die SAS der Proteine ist in Grau unterlegt. TNF- α wurde in unserem SILAC-Experiment nicht identifiziert, wird aber dennoch aufgeführt, da die CT-Sensitivität der SAS anderweitig gezeigt wurde (105). Das strukturelle Konsensusmotiv besteht aus zwei Gruppen mit einer oder zwei kleinen AS (Gly, Ala, Ser oder Thr, Cys, schwarz unterlegt), die von einer Gruppe, bestehend aus zwei oder drei größeren AS (mittlerer Teil), getrennt werden. Flankiert werden diese AS-Gruppen von großen geladenen, großen polaren oder großen aromatischen AS (schwarzer Rahmen), die in einem Abstand von 0-3 AS von den kleinen AS lokalisiert sind. **(B)** Schema des Konsensusmotivs. Dargestellt sind verschiedene Varianten des Konsensusmotivs, die in den Signalsequenzen vorkommen. Die zwei Gruppen von kleinen AS sind in Grün dargestellt, die großen, trennenden AS in Rot und die flankierenden AS in Blau. **(C)** Das dreidimensionale Modell der α -helikalen Struktur (links) und der lösemittelzugänglichen Oberfläche (rechts) der SAS von IMP2B ist exemplarisch dargestellt. Die zwei Gruppen von kleinen AS sind in Grün dargestellt, die großen, trennenden AS in Rot und die flankierenden AS in Blau. Die Pfeile zeigen die Vertiefungen in der Helix an.

10 dieser sensitiven Signalsequenzen haben einen zytosolischen N-Terminus, eine Signalsequenz weist einen extrazellulären N-Terminus auf und einer Signalsequenz konnte im Vorhersageprogramm keine Orientierung zugewiesen werden.

Das strukturelle Konsensusmotiv (Abb. 14B) enthält zwei Gruppen kleiner AS (Gly, Ala, Ser, Thr, Cys), von denen die erste aus zwei AS und die zweite aus einer oder zwei AS besteht. Diese zwei Gruppen werden von zwei bis drei größeren AS im Zentrum des Motivs getrennt. Diese zentralen Bestandteile werden noch von großen geladenen, polaren oder aromatischen AS in einem Abstand von 0-3 AS flankiert.

Geht man von einer strikt α -helikalen Struktur der SAS aus (3,6 AS/ Windung, 0,54nm 5,4 Å/ Windung), wird deutlich, dass das Konsensusmotiv im räumlichen Erscheinungsbild der Helix eine Auffälligkeit erzeugt. Wie schematisch in Abbildung 14C dargestellt, entstehen durch die zwei Gruppen von kleinen AS zwei Vertiefungen innerhalb der Helixoberfläche, die durch die größeren AS, die im Zentrum des Motivs liegen, um eine Windung voneinander separiert werden. Die großen geladenen, polaren oder aromatischen AS, die das Motiv flankieren, sind durch die helikale Struktur entweder direkt auf eine Seite der Helix ausgerichtet oder durch Freiheitsgrade der Aminosäureseitenketten mit einer Drehung zueinander ausrichtbar.

Bei den 143 integralen Membranproteinen, die keine Sensitivität gegenüber CT zeigten, wiesen nur fünf Proteine ein ähnliches Konsensusmotiv auf. Dies zeigt eine hochsignifikante Korrelation (p-Wert < 0,0001 nach dem Fischer Exakt Test (118)) zwischen der CT-Sensitivität und dem identifizierten Konsensusmotiv bei SAS. Bei den CT-sensitiven sekretorischen Proteinen, welche ausschließlich SP ausbilden, wurde ebenfalls überprüft, ob sie das Motiv aufweisen. Ein ähnliches Motiv kommt aber in keinem der 50 CT-sensitiven SP

vor. Von den neun CT-sensitiven integralen Membranproteinen, welche ein SP tragen, konnte das Konsensusmotiv nur bei zwei SP gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten an, dass das identifizierte Konsensusmotiv nur in SAS eine CT-Sensitivität vermittelt. Die meisten SP enthalten das Motiv nicht. Hier scheinen andere mit den bisherigen Methoden nicht identifizierbare Eigenschaften zur CT-Sensitivität zu führen. Da in der SILAC-Analyse aber nur insgesamt 50 sekretorische Proteine identifiziert wurden, stellt sich die Frage, ob es nicht doch SP geben könnte, die das Motiv enthalten und die in der SILAC-Analyse unter der Detektionsgrenze lagen.

3.1.4 Bioinformatische Identifikation des Konsensusmotivs in GPCR-Signalpeptiden

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Signalsequenz-Datenbank auf mögliche weitere SP hin durchsucht, die das Motiv aufweisen könnten. Hierfür wurde die Proteinfamilie der GPCR gewählt. GPCR werden meist nur in geringen Mengen exprimiert und könnten deshalb in der SILAC-Methodik unter die Nachweisgrenze gefallen sein. Der Vorteil dieser Proteinfamilie ist, dass relativ viele GPCR ein SP haben.

Für die Suche nach GPCR-SP wurde die „Signal Peptide Database“ (<http://www.signalpeptide.de>) verwendet. Die SP, welche das Konsensusmotiv beinhalten, wurden mittels der EMBOSS-Anwendung *fuzzpro* (119) und *Geneious Pro 5.4.6* sowie manuellen Anpassungen bestimmt. Die Datenbanksuche wurde mit dem Gesamtmotiv und drei verkürzten Varianten (N-terminaler, C-terminaler und zentraler Teil) des Motivs (siehe Abb. 14B) durchgeführt.

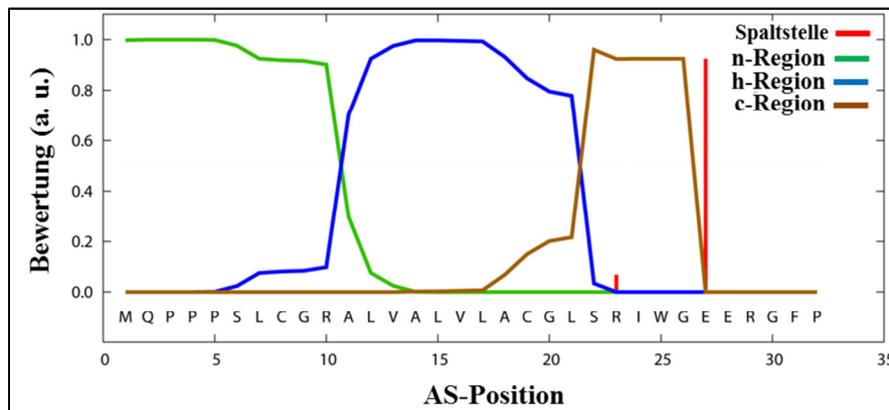
Tabelle 3.1.4: GPCR mit Signalpeptid und gesamtem Konsensusmotiv.

Datenbank-Suche mit Gesamtmotiv		
Motivtragende SP gefunden: 119	GPCR-SP: 5	
P24530	G protein-coupled receptor	Endothelin B receptor
P25101	G protein-coupled receptor	Endothelin A receptor
Q9HBX8	G protein-coupled receptor	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6
P32241	GPCR, family 2	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1
Q14831	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 7

Bei dieser Suche wurden fünf GPCR identifiziert, die das vollständige Konsensusmotiv aufwiesen (Tabelle 3.1.4 weitere Tabellen für die Suchergebnisse mit den Motivvarianten sind

im Anhang aufgelistet, Anhang A. 2). Einer dieser GPCR war der ET_BR, der bereits zuvor von unserer Arbeitsgruppe als CT-sensitiv beschrieben wurde (104).

A



B

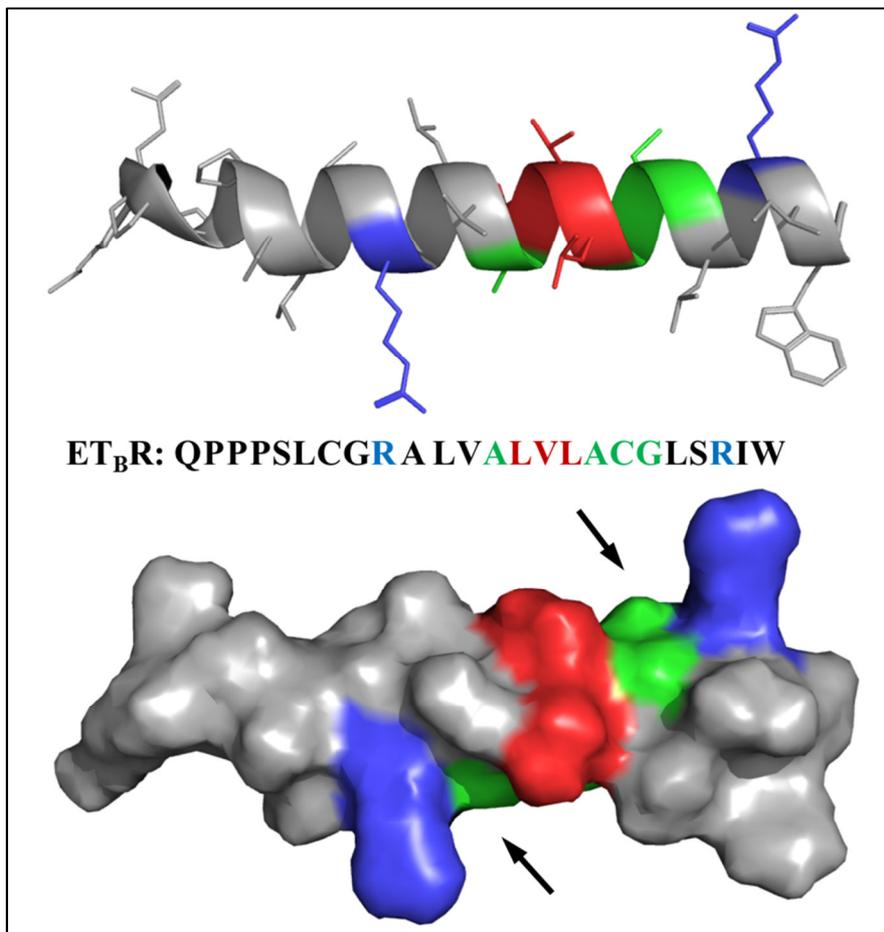


Abb. 15: Signalpeptid des ET_BR mit dem Konsensusmotiv. (A) Sequenz des SP und Analyse durch das Programm *SignalP* (23, 120, 121). Dargestellt sind die n-Region in Grün, die h-Region in Blau und die c-Region in Braun. Die Spaltstelle ist in Rot an Position -1 gekennzeichnet. (B) Konformation des ET_BR-Signalpeptids. Im oberen Teil ist die α -Helix und im unteren Teil die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des ET_BR-SP zu sehen. In Grün sind die beiden Vertiefungen der Helix (schwarze Pfeile) dargestellt, die durch die zwei Gruppen kleiner AS entstehen. Die größeren AS sind in Rot, die flankierenden AS in Blau dargestellt.

Der ET_BR wird in Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen in der Plasmamembran exprimiert. Als GPCR weist er 7 TM auf, die C-terminal auf das SP folgen (104). Das SP des ET_BR weist die typische Aufteilung in die drei Bereiche n-Region, h-Region und c-Region auf (Abb. 15A und Abb. 3). Das Konsensusmotiv besteht in diesem Fall aus den beiden Gruppen der kleinen AS, A¹⁴ und A¹⁸, C¹⁹ und G²⁰ (Abb. 15B in Grün dargestellt). Diese werden durch die größeren AS L¹⁵, V¹⁶ und L¹⁷ (Abb. 15B in Rot dargestellt) getrennt und von den positiv geladenen AS R¹⁰ und R²³ (Abb. 15B in Blau dargestellt) flankiert.

3.2 Experimenteller Nachweis der Korrelation zwischen der CT-Sensitivität einer SAS und dem identifizierten Konsensusmotiv

Das Konsensusmotiv wurde sowohl in SAS als auch in SP identifiziert. Im Folgenden sollte gezeigt werden, dass dieses Motiv auch tatsächlich die Cotransin-Sensitivität vermittelt. Um dies zuerst für SAS zu bestätigen, wurde die SAS des CT-resistenten Proteins Aquaporin 2 (WT.AQP2) verwendet. AQP2 ist ein hexahelikales integrales Membranprotein, welches einen Wasserkanal ausbildet, der in apikalen Membranen von Nierenzellen exprimiert wird (122). Der N- und der C-Terminus des Proteins liegen, nach der Einbettung in die Zellmembran, im Zytosol der Zelle vor. Die SAS von AQP2 weist keine Sensitivität gegenüber CT auf. Um die Funktionalität des Konsensusmotivs zu überprüfen, wurde es mit Hilfe von gerichteten Mutagenesen in die SAS des AQP2 eingeführt.

Die daraus resultierende AQP2-Mutante (CM.AQP2) enthielt vier Punktmutationen in ihrer SAS, um das Motiv auszubilden: F25G, F26G, G27L und Q33K (Abb. 16).

Nc	WT.AQP2	FLATLLFVFFGLGSALQWASSPPSVLQIAVAFG
Nc	CM.AQP2	FLATLLFVGGLLGSALKWASSPPSVLQIAVAFG

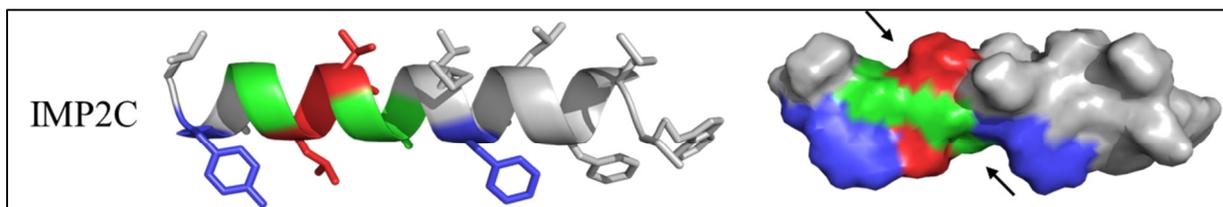
★★★ ★

Abb. 16: Sequenzvergleich der SAS des wildtypischen AQP2 (WT.AQP2) mit der Mutante CM.AQP2. Die SAS ist in Grau hinterlegt. Das eingebrachte Konsensusmotiv ist in Schwarz (kleine AS) und in Weiß mit schwarzem Rand (flankierende AS) dargestellt. Die größeren AS liegen zwischen den schwarz markierten AS. Nc beschreibt einen zytosolischen N-Terminus. Durch Mutation veränderte AS sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Proteinbiosynthese des IMP2B-Proteins wurde im SILAC-Experiment am stärksten inhibiert und zeigt das Konsensusmotiv in sehr ausgeprägter Form. In Abbildung 17A sind die Helix (links) der SAS von IMP2B sowie deren lösungsmittelzugängliche Oberfläche (rechts) zu sehen. Die Vertiefungen in der Sekundärstruktur sind mit Pfeilen markiert, die beiden

Gruppen kleiner AS sind in Grün, die trennenden AS in Rot und die flankierenden AS in Blau dargestellt. Die SAS von AQP2 ist in Abbildung 17B im oberen Bild zum Vergleich gezeigt, sie enthält das Motiv nicht. Im unteren Teil des Bildes ist die SAS von AQP2 zu sehen, in die die vier Punktmutationen eingebracht wurden. Dies führte zur Ausbildung des Konsensusmotivs.

A



B

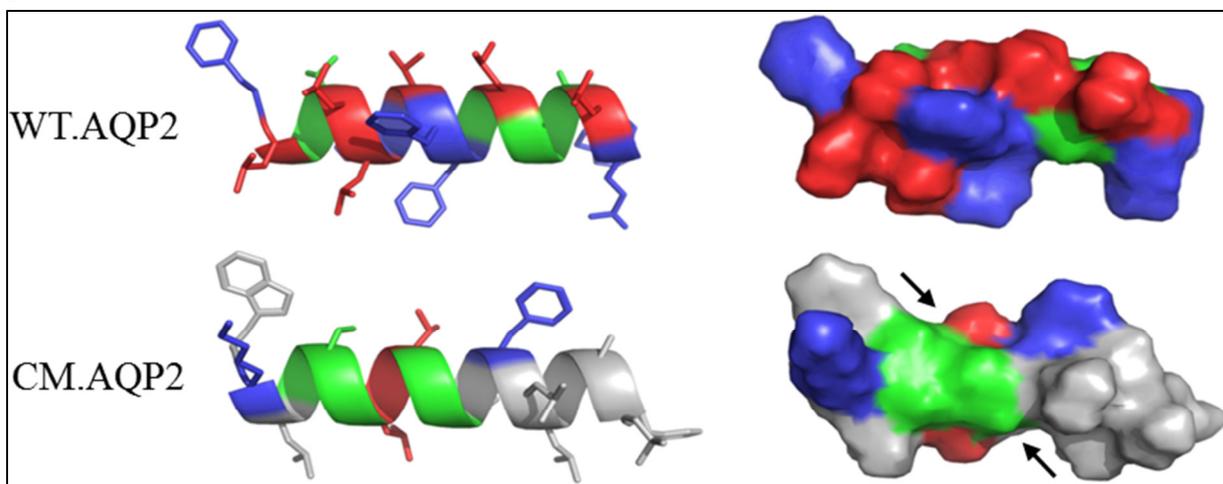
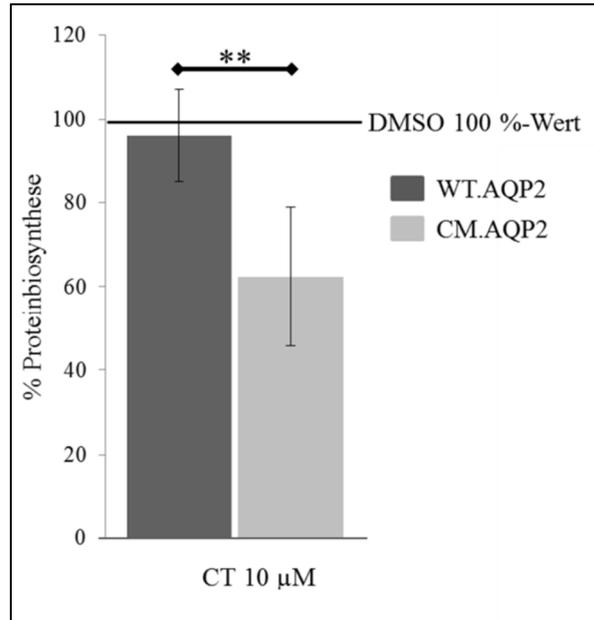


Abb. 17: Darstellung der SAS von IMP2C (A), WT.AQP2 (B) und CM.AQP2 (C). Der linke Teil der Abbildung zeigt die Helixdarstellungen, der rechte Teil die lösungsmittelzugänglichen Oberflächen. Die zwei Gruppen aus kleinen AS sind in Grün, die trennenden AS in Rot und die flankierenden AS in Blau dargestellt. Die Vertiefungen durch die kleinen AS sind mit Pfeilen markiert. Bei CM.AQP2 wird im Gegensatz zu WT.AQP2 das Konsensusmotiv durch die eingefügte Punktmutation ausgebildet.

3.2.1 Durchflusszytometrische Qualifizierung der Expression der AQP2-Konstrukte nach Cotransinbehandlung

Um den Effekt der Mutation zu überprüfen, wurden WT.AQP2 und CM.AQP2 C-terminal mit GFP fusioniert. Die Konstrukte wurden transient in HEK293-Zellen exprimiert und die GFP-Gesamtfluoreszenzintensität mit und ohne Cotransinbehandlung als direktes Maß für die Proteinbiosynthese des transfizierten Konstrukts verwendet.

A



B

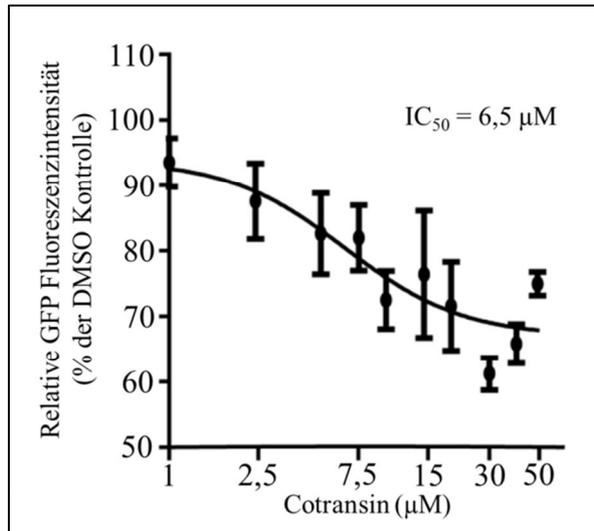


Abb. 18: Inhibition der Expression von CM.AQP2 durch Cotransin. (A) Der DMSO-Wert stellt den 100%-Wert der Expression der beiden Konstrukte dar. Die Zellen wurden 19 h mit CT (10 µM Endkonzentration) behandelt und die GFP-Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch bestimmt. Die Säulen entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten ± SD. (B) Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die cotransinvermittelte Inhibition der Expression von CM.AQP2. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert der GFP-Fluoreszenzsignale von drei unabhängigen Experimenten ± SD dar. Die Messungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie (s.o.). Die DMSO-Kontrollen (1,5% DMSO Endvolumen) ergeben die 100%-Werte der Proteinbiosynthese des jeweiligen Konstrukts. Der IC_{50} -Wert ist angegeben. Die CT-Behandlung wurde für 19 h mit steigenden CT-Konzentrationen (1-50 µM) durchgeführt. Bei den oben dargestellten Versuchen wurde das vollständige, C-terminal mit GFP fusionierte AQP2 verwendet. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die cotransinvermittelte Inhibition der Expression WT.AQP2 (nicht gezeigt) zeigte keine signifikante Beeinflussung der Expression.

Die für die Negativkontrollen ermittelte Gesamtfluoreszenzintensität wurde als 100%-Wert der Proteinbiosynthese des jeweiligen Konstrukts angesehen und mit den Messwerten der CT-behandelten Zellen verglichen. Bei der CM.AQP2 Mutante konnte, nach Behandlung mit CT, eine signifikante Reduktion der GFP-Gesamtfluoreszenzintensität gegenüber dem WT festgestellt werden (Abb.18A). Die Steigerung der CT-Sensitivität von CM.AQP2 im Vergleich zu WT.AQP2 ist ein Hinweis dafür, dass das Konsensusmotiv tatsächlich die Cotransin-Sensitivität einer SAS vermitteln kann.

Durch die Variation der CT-Konzentrationen konnte bei gleichem Versuchsaufbau eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Inhibition der Proteinbiosynthese von CM.AQP2 durch CT erstellt werden (Abb. 18B). Der errechnete IC_{50} -Wert von $6,5 \mu\text{M}$ ist vergleichbar mit Werten aus der Literatur (z.B. ET_{BR} : IC_{50} der Biosyntheseinhibition durch Cotransin= $5,4 \mu\text{M}$) (104).

3.2.2 Mikroskopische Funktionsanalyse der SAS der AQP2-Konstrukte

Das obige Experiment deutete an, dass die Einführung der Punktmutationen die Cotransin-Sensitivität der SAS von CM.AQP vermittelt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die eingeführten Punktmutationen die Funktion der SAS gänzlich außer Kraft gesetzt haben. In diesem Fall wäre es denkbar, dass eine der weiter C-terminal positionierten TM die Funktion der SAS übernommen hat (123). Diese könnte dann für die erhöhte CT-Sensitivität von CM.AQP2 im Vergleich zu WT.AQP2 verantwortlich gewesen sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden verkürzte, mit GFP fusionierte Konstrukte von WT.AQP2 und CM.AQP2 erzeugt, die nur den N-Terminus und die erste TM bis hin zur ersten intrazellulären Schleife des Proteins kodieren (Abb. 19A) (die Fusion von GFP folgte unmittelbar C-terminal dieser ersten zytosolischen Schleife). Die resultierenden Konstrukte WT.AQP2.NT und CM.AQP2.NT besitzen damit nur eine TM und nur diese können als SAS funktionieren. Wenn das Konstrukt eine funktionale SAS aufweist, durchläuft es den Sec61-Translokation-Pathway und die GFP-Fluoreszenz würde in der mikroskopischen Analyse das für die ER-Membran typische retikuläre Muster aufweisen. Der Nukleus der Zelle bleibt dabei frei von GFP-Fluoreszenz. Falls die mutierte TM des CM.AQP2.NT-Konstrukts die Funktionen einer SAS nicht mehr erfüllen könnte, würde das GFP-Konstrukt im Zytosol exprimiert und zu einer diffusen Fluoreszenz führen, die nahezu die ganze Zelle ausfüllt. Durch das Kernlokalisierungssignal von GFP (124) ist in diesem Fall auch im Nukleus der Zelle GFP-Fluoreszenz nachweisbar.

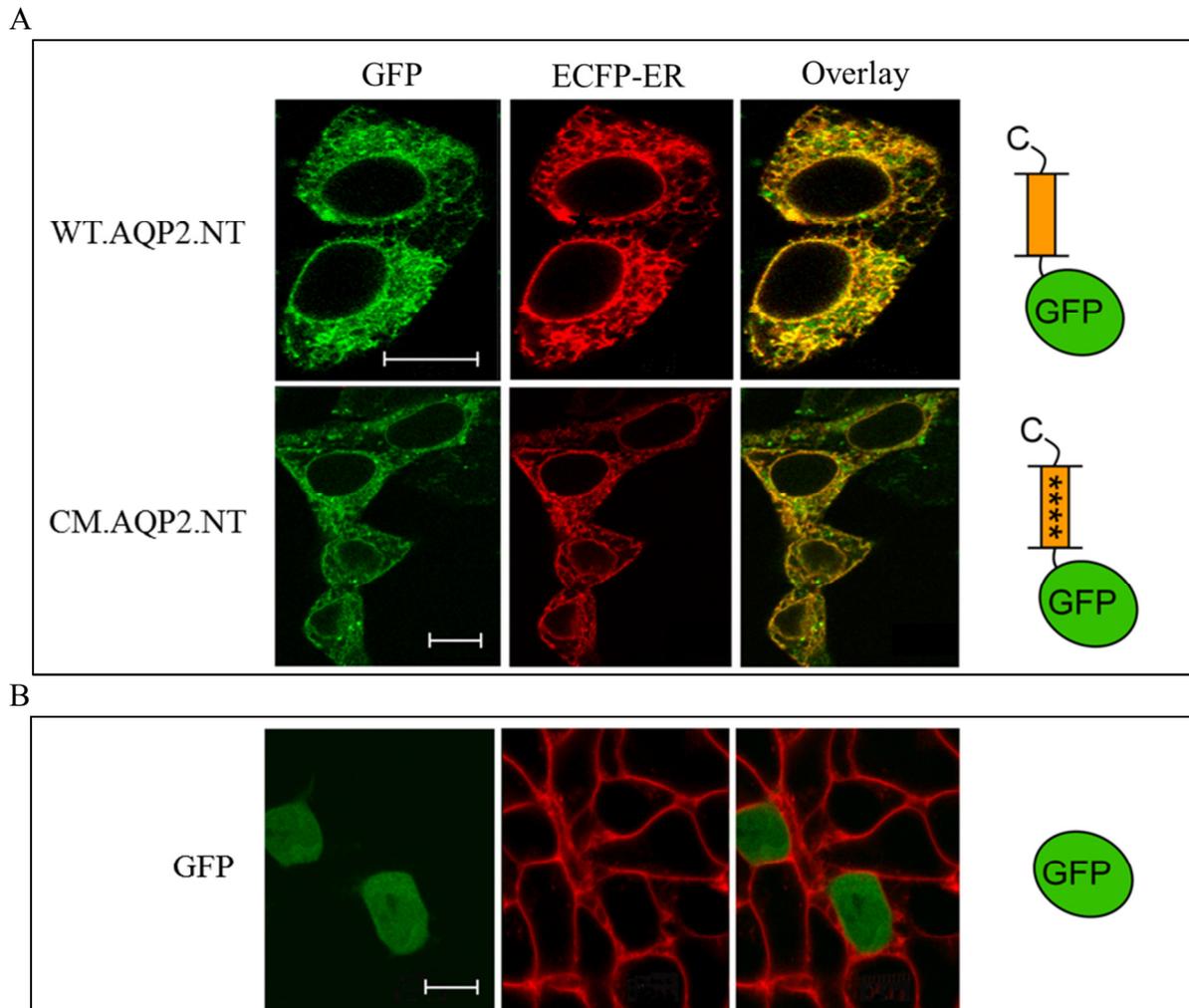


Abb. 19: Mikroskopische Analyse der SAS-Funktion von CM.AQP2.NT. (A) Co-Lokalisation der GFP-Fluoreszenz der verkürzten Konstrukte WT.AQP2.NT und CM.AQP2.NT mit dem ER-Marker ECFP-ER. Die GFP-Fluoreszenz der Konstrukte ist in den Bildern links in Grün dargestellt. In den Bildern in der Mitte ist in Rot der co-transfizierte ER-Marker ECFP-ER gezeigt und in den rechten Bildern die Überlagerung. Die Bilder wurden mit einem CLSM aufgenommen und mit dem Zeiss LSM *Image Browser* prozessiert und übereinander gelagert. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Auf der rechten Seite der Aufnahmen ist eine schematische Darstellung des jeweiligen Konstrukts zu sehen. Die SAS von CM.AQP2.NT mit den vier enthaltenen Punktmutationen wird dabei durch vier Sterne in der TM (***) symbolisiert. (B) Lokalisation des unfusionierten, löslichen GFP-Proteins (d.h. ohne SAS oder SP). Die GFP-Fluoreszenz ist links in Grün zu sehen. Die Plasmamembran wurde mit Trypanblau gefärbt (Mitte in Rot). Das rechte Bild zeigt die Überlagerung. Bei dieser Vitalfärbung weisen alle Zellen im Sichtfeld eine Trypanblaufärbung auf. Eine GFP-Fluoreszenz zeigen dagegen nur die transfizierten Zellen. Für die Aufnahmen wurden jeweils repräsentative Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählt.

Für diesen Versuch wurden HEK293-Zellen mit den Konstrukten AQP2.NT und CM.AQP2.NT sowie dem ER-Marker ECFP-ER transient co-transfiziert und die Expression mikroskopisch analysiert. In Abbildung 19A ist zu sehen, dass beide Konstrukte,

WT.AQP2.NT und CM.AQP2.NT, ein retikuläres Fluoreszenzmuster und eine Co-Lokalisation mit dem ER-Marker zeigen.

Weiterhin wurde unfusioniertes, lösliches GFP, welches keine TM aufweist, als Negativkontrolle verwendet. Hier zeigt sich ein typisches, diffus die gesamte Zelle erfassendes Fluoreszenzmuster, das auch im Kern zu sehen war (Abb. 19B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die TM des CM.AQP2.NT-Konstrukts trotz der vier Punktmutationen als SAS funktionell ist. Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass das eingeführte Konsensusmotiv tatsächlich die CT-resistente SAS von AQP2 in eine CT-sensitive SAS überführt hat.

3.3 Nachweis der Verantwortlichkeit des Konsensusmotivs für die CT-Sensitivität des SP des ET_BR

Obige Versuche zeigen, dass das Konsensusmotiv die CT-Sensitivität einer SAS bestimmen kann. In SP kommt das Motiv dagegen nur sehr selten vor. Es stellte sich daher die Frage, ob das Motiv, wenn es in SP vorhanden ist, auch hier eine CT-Sensitivität hervorruft. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Alaninscan am sensitiven SP des ET_BR durchgeführt.

3.3.1 Alaninscan des ET_BR-SP

Das SP des ET_BR enthält nach Datenbankanalyse das Konsensusmotiv (siehe 3.1.4). Ferner wurde der ET_BR bereits in der Literatur als CT-sensitiv beschrieben (104). Um zu zeigen, dass das Konsensusmotiv hierfür verantwortlich ist, wurde der ET_BR C-terminal mit GFP fusioniert. Anschließend wurden, mittels gerichteter Mutagenese, alle AS einzeln durch Alanin ersetzt (Glycine und Alanine wurden durch Leucin ersetzt). Für die Bewertung des Einflusses dieser Mutationen auf die CT-Sensitivität wurden HEK293-Zellen transient mit den Konstrukten transfiziert (siehe 2.2.2.3) und die GFP-Gesamtfluoreszenzintensität der so erzeugten 24 ET_BR-Mutanten (Konstrukte ET_BR.Q2A.GFP – ET_BR.G26L.GFP, siehe Tabelle 2.1.5.2), in gleicher Vorgehensweise wie bei den AQP2-Konstrukten, durchflusszytometrisch bestimmt. Die Behandlung mit CT (10 µM) erfolgte für 19 h (siehe 2.2.2.6). Als Negativkontrolle wurde DMSO (1% Endvolumen) und Cycloheximid (20 mg/ml Endkonzentration) verwendet. Um Fehler durch Proteine zu vermeiden, die zum Zeitpunkt t_0 des Experimentes bereits synthetisiert in der Zelle vorlagen, wurde die gemessene GFP-Fluoreszenzintensität von den Cycloheximid-Proben subtrahiert. Sollte das Konsensusmotiv

für die CT-Sensitivität des SP verantwortlich sein, sollte sich bei den entsprechenden Punktmutationen eine Reduzierung der CT-Sensitivität zeigen.

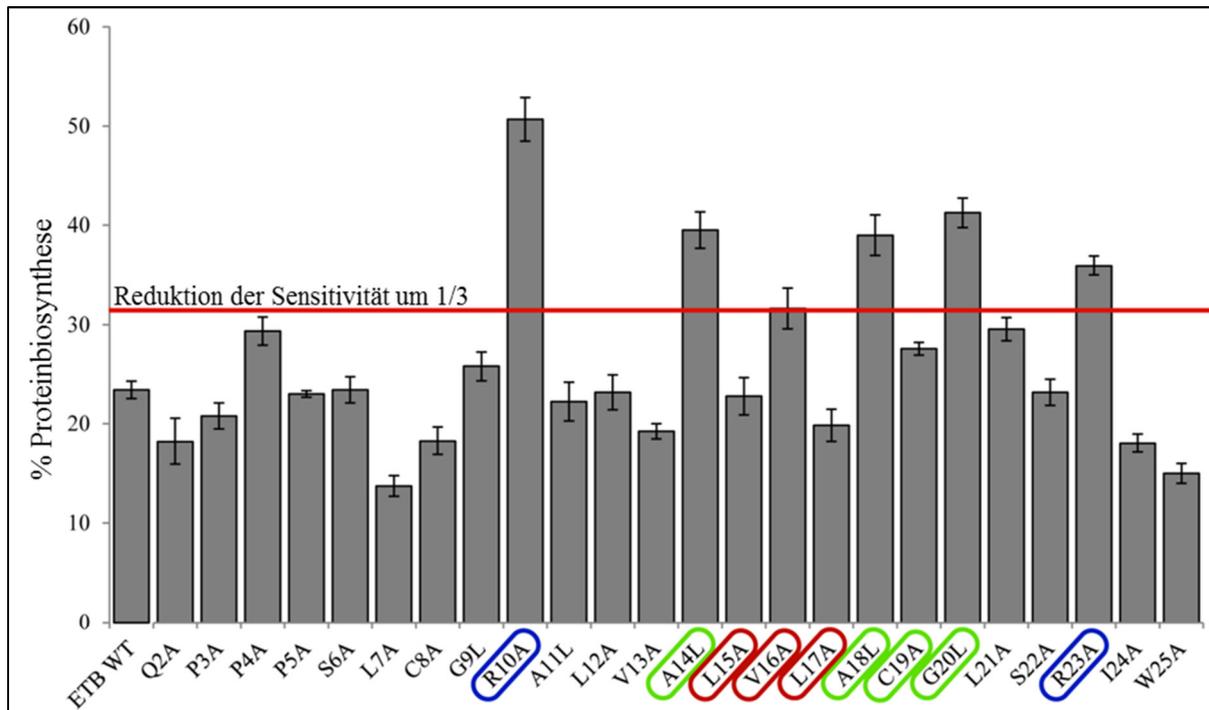


Abb. 20: Cotransin-Sensitivität des wildtypischen ET_BR im Vergleich zu den erzeugten SP-Mutanten. Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Proteinbiosynthese aller ET_BR-Konstrukte (ET_BR.Q2A.GFP - ET_BR.W25A.GFP) nach einer 19 h Inkubation mit CT (10 µM). Die jeweiligen Säulen des Diagramms repräsentieren den Mittelwert ± SD der GFP-Gesamtfluoreszenz von drei unabhängigen Experimenten, in denen 1 x 10⁴ Zellen der Proben gemessen wurden. Normalisiert wurde auf die DMSO Negativkontrolle (=100%-Biosynthese). Die Konsensusmotiv-bildenden AS sind mit Grün (kleine AS), Rot (raumfüllende, trennende AS) und Blau (flankierende AS) hervorgehoben.

Der wildtypische ET_BR zeigte in den Versuchen eine Inhibition seiner Proteinbiosynthese durch CT von ungefähr 75% (Abb. 20). Diese Ergebnisse entsprechen den Literaturwerten (104). Im Gegensatz dazu, weisen die Mutanten ET_BR.R10A.GFP, ET_BR.A14L.GFP, ET_BR.V16A.GFP, ET_BR.A18L.GFP, ET_BR.G20L.GFP und ET_BR.R23A.GFP (in Abb. 20 farblich hervorgehoben) einen signifikanten Verlust ihrer CT-Sensitivität auf (wenn man als Schwellenwert eine 1/3 Reduktion festsetzt).

Die Werte in Abb. 20 wurden nur auf die unbehandelten Kontrollen normalisiert und lassen daher keinen Schluss auf die Gesamtexpression des ET_BR-WT und den SP-Mutanten zu. Der Vergleich der GFP-Gesamtfluoreszenzen des ET_BR-WT und der SP-Mutanten zeigte in den durchflusszytometrischen Untersuchungen (siehe 2.2.2.6) keine größeren Unterschiede (Abb.

21). Daher ist sichergestellt, dass der Verlust der CT-Sensitivität der betroffenen Mutanten nicht auf z.B. einer erhöhten Expression durch die Veränderung des SP beruht.

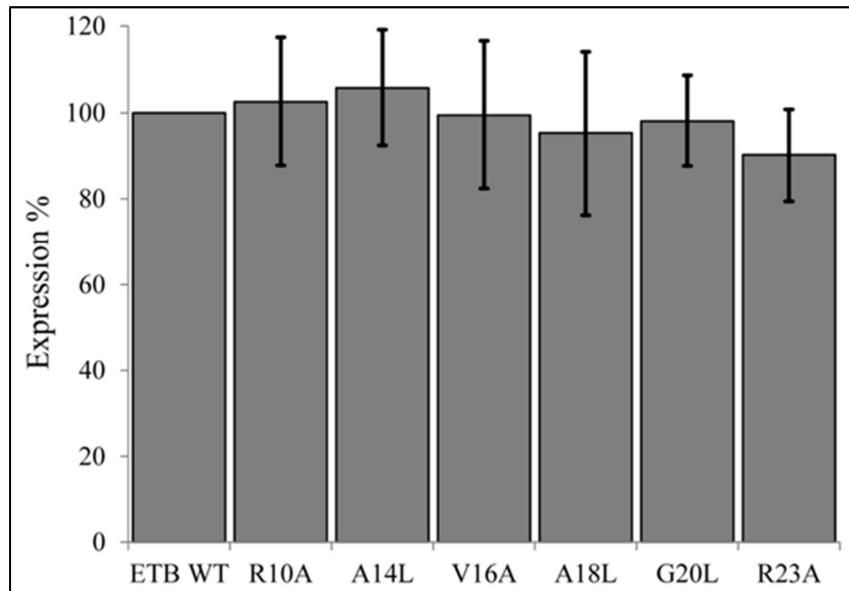
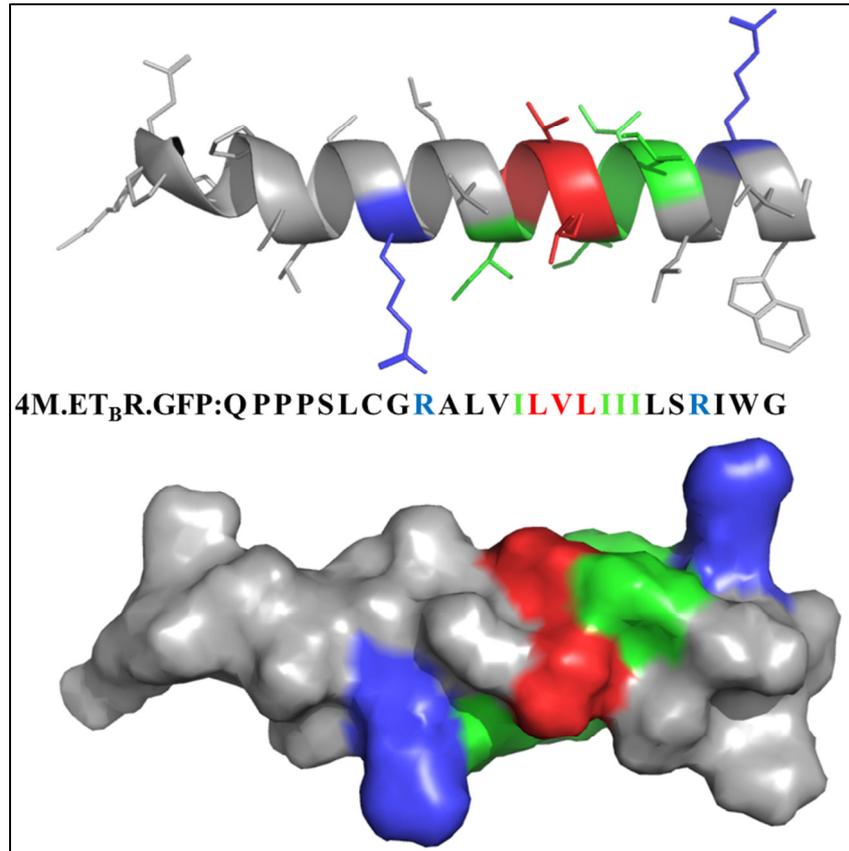


Abb. 21: Expression des wildtypischen $ET_B R$ und der Mutanten $ET_B R.R10A.GFP$, $ET_B R.A14L.GFP$, $ET_B R.V16A.GFP$, $ET_B R.A18L.GFP$, $ET_B R.G20L.GFP$ und $ET_B R.R23A.GFP$. Die Säulen des Diagramms zeigen die Mittelwerte der GFP-Gesamtfluoreszenzen von drei unabhängigen Messreihen \pm SD. Die Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer durchgeführt und mit der Expression des wildtypischen $ET_B R$ normalisiert (=100%).

3.3.2 Analyse möglicher additiver Effekte der Punktmutationen

Ein weiterer Schritt war die Untersuchung möglicher additiver Effekte der Punktmutationen, die in das SP des $ET_B R$ eingeführt wurden. Hierfür wurde die Mutante $4M.ET_B R.GFP$ erzeugt, bei der vier AS innerhalb des SP ausgetauscht wurden: A14I, A18I, C19I und G20I. Die beiden Vertiefungen der Helix-Oberfläche, die durch die beiden Gruppen von kleinen AS entstehen, wurden durch größere Isoleucine ersetzt, welche die Lücken ausfüllen (Abb. 22A). Es wurden, wie oben beschrieben, wieder durchflusszytometrische Messungen an CT-behandelten transient transfizierten HEK293-Zellen vorgenommen, um das Ausmaß der Inhibition der Proteinbiosynthese des Konstrukts durch CT zu quantifizieren. Die Mutante $4M.ET_B R.GFP$ wies zwar wieder eine signifikante Reduktion der CT-Sensitivität im Vergleich zum wildtypischen $ET_B R$ auf (Abb. 22B). Es zeigte sich jedoch kein weiterer additiver Effekt der Mehrfach- im Vergleich zu den Einzelmutationen.

A



B

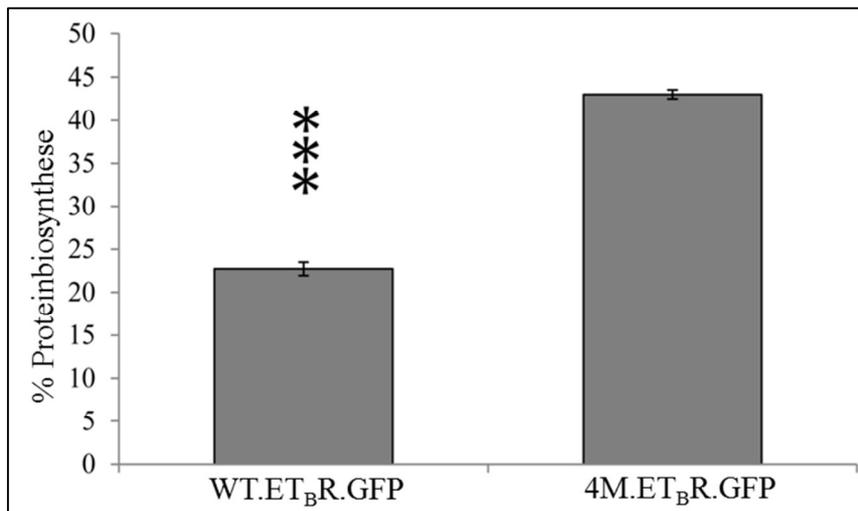


Abb. 22: Cotransin-Sensitivität des 4M.ET_B.GFP-Konstrukts. (A) Modell der α -helikalen Struktur (oberes Bild) und der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (unteres Bild) des SP des 4M.ET_B.GFP-Konstrukts. In Grün sind die vier Isoleucine, die die zwei Gruppen von kleinen AS des Motivs ersetzen, hervorgehoben (zum Vergleich, siehe Abb. 15B). In Rot sind die raumfüllenden AS und in Blau die flankierenden AS des Konsensusmotivs gezeigt. (B) Durchflusszytometrische Messung der Proteinbiosynthese in HEK293-Zellen, die transient mit der 4M.ET_B.GFP-Mutante und dem WT transfiziert wurden. Die Zellen wurden für 19 h mit CT (10 μ M) oder DMSO behandelt. Die Säulen zeigen jeweils den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente \pm SD und wurden auf die DMSO-Kontrolle normalisiert (=100%).

3.3.3 Hydrophobizitätsanalyse der erzeugten ET_BR SP-Mutanten

Das Ausmaß der Gesamthydrophobizität eines SP spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der CT-Sensitivität. Aufgrund dessen wurden die Veränderungen in der Gesamthydrophobizität des ET_BR-SP (24 einzelne Punktmutationen) mittels der GRAVY Software errechnet und mit dem WT verglichen (Abb. 23). Bei den sechs Mutationen, die eine signifikante Reduktion der CT-Sensitivität hervorriefen, zeigten fünf (R10A, A14L, A18L, G20L und R24A) eine Erhöhung der Hydrophobizität (Abb. 23). Bei der Mutante V16A verringert sich jedoch die Gesamthydrophobizität des SP stark (Abb. 23). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Gesamthydrophobizität eines SP nicht der alleinige Faktor für dessen CT-Sensitivität ist, sondern dass wahrscheinlich auch strukturelle Eigenschaften der Helix des SP von entscheidender Bedeutung sind. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen der Hydrophobizitätsanalyse der CT-sensitiven SP aus dem SILAC-Experiment (siehe Abb. 11).

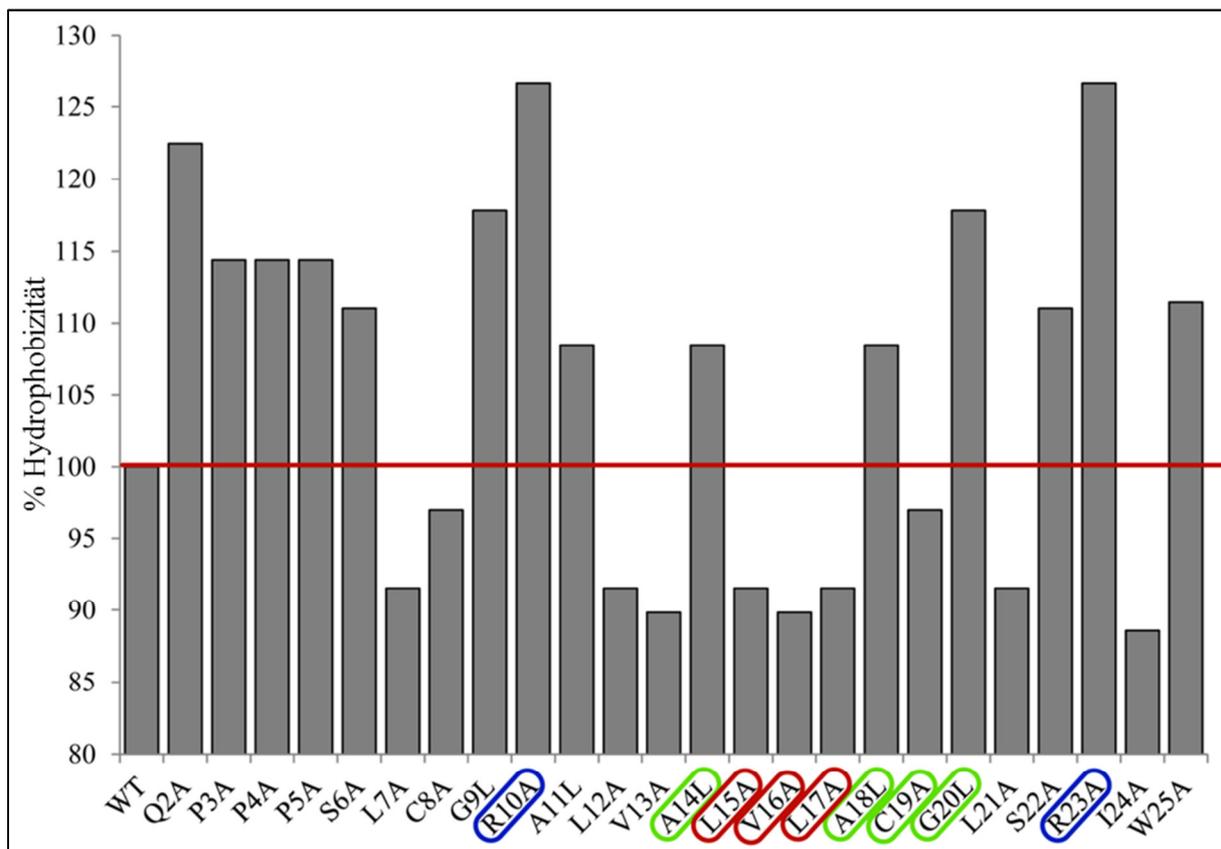
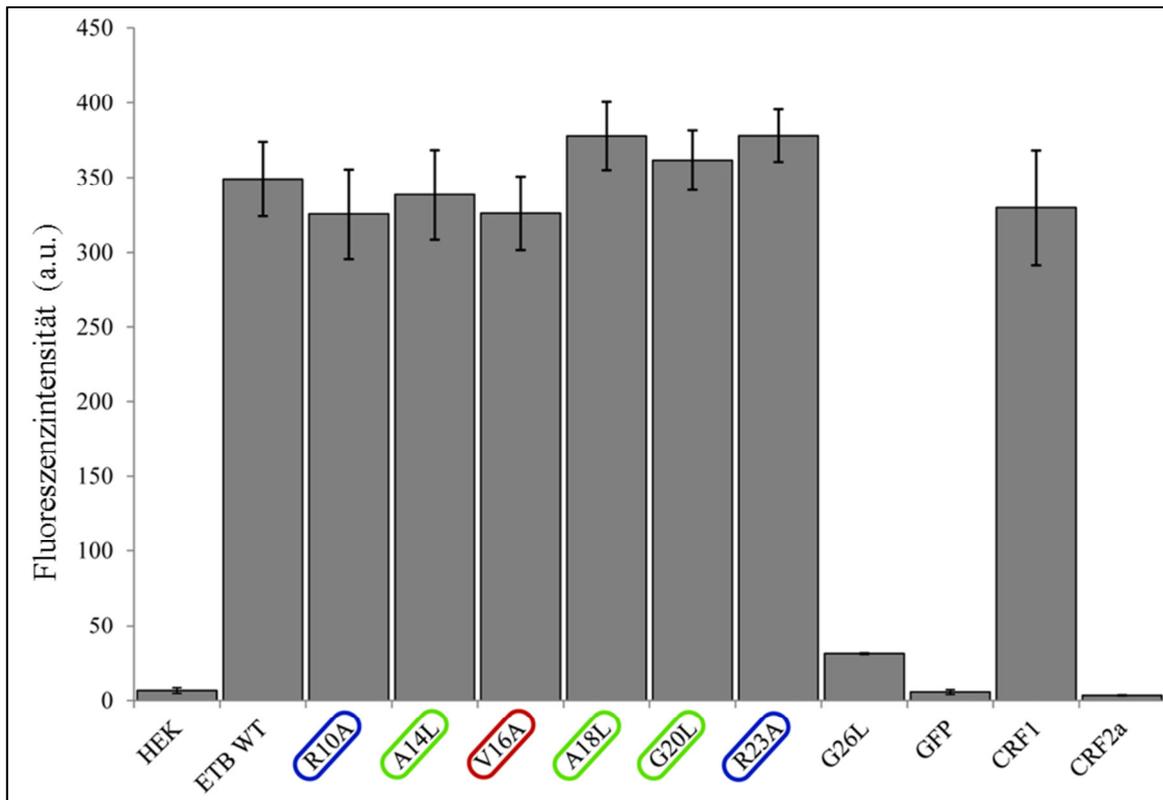


Abb. 23: Hydrophobizitätsanalyse der ET_BR-Signalpeptid-Einzelmutanten im Vergleich zum wildtypischen SP des ET_BR. Die Gesamthydrophobizität des jeweiligen SP der Mutanten wurde mit der GRAVY Software errechnet und mit dem wildtypischen Wert (=100%) normalisiert. Die AS, die das Konsensusmotiv ausbilden, sind farblich umrandet. In Grün sind die kleinen AS markiert, in Rot die raumfüllenden, trennenden AS und in Blau die flankierenden AS.

3.3.4 Funktionsanalyse der SP der relevanten ET_BR-Konstrukte

Bei integralen Membranproteinen besteht die Möglichkeit, dass bei einem Funktionsverlust des SP eine TM, die in der Sequenz des Proteins weiter C-terminal positioniert ist, die Aufgaben des SP übernimmt. Falls diese TM im Gegensatz zum ursprünglichen SP eine veränderte Sensitivität gegenüber CT aufweist, könnte es zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse kommen. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wurde die Funktionalität der mutierten SP überprüft. Dafür wurden die SP des wildtypischen ET_BR und der sechs mutierten Varianten an ein lösliches GFP mit His-Tag fusioniert (Abb. 24) (Konstrukte WT.ET_BR.SP.NT.GFP und ET_BR.R10A.SP.NT.GFP bis ET_BR.R23A.SP.NT.GFP). Im Fall eines funktionalen SP würde das zytosolisch exprimierte GFP durch die Fusion des SP in ein sekretorisches Protein umgewandelt und in das Zellkulturmedium sekretiert. Im Gegensatz dazu würde ein nicht-funktionales SP zur zytosolischen Expression von GFP führen und wäre im Medium nicht nachweisbar. Als Kontrolle für eine erfolgte Abspaltung des SP wurde auch eine Mutante der Spaltstelle für die Signalpeptidase konstruiert. Hier sollte GFP ebenfalls nicht sekretiert werden (ET_BR.G26L.SP.NT.GFP). Weitere Kontrollen stellten die Konstrukte CRF₁R.SP.NT.GFP (funktionelles SP des CRF₁R an GFP fusioniert) und CRF_{2a}R.SP.NT.GFP (nicht funktionelles PSP des CRF_{2a}R an GFP fusioniert) dar. Für die experimentelle Durchführung wurden HEK293-Zellen transient mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Es folgte eine fluorimetrische Messung der GFP-Fluoreszenz des Mediums (Abb. 24A). Anschließend wurde sekretiertes GFP aus dem Medium mit Hilfe des His-Tags aufgereinigt und auf einem Immunoblot detektiert (Abb. 24B). Die Abbildung zeigt, dass es im Vergleich zum wildtypischen SP bei keiner der SP-Mutanten des ET_BR zu einer Beeinträchtigung oder einem Verlust der SP-Funktion kam. Die Positivkontrolle CRF₁R.SP.NT.GFP wurde ebenfalls sekretiert (Abb. 24A). Im Gegensatz dazu konnten die Negativkontrollen CRF_{2a}R.SP.NT.GFP und ET_BR.G26L.SP.NT.GFP nicht im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Ein nicht mit einem SP fusioniertes GFP konnte, wie erwartet, ebenfalls nicht im Medium detektiert werden (Abb. 24A). Die fluorimetrischen Messwerte werden durch die vergleichbaren Ergebnisse des Immunoblots unterstützt (Abb. 24B).

A



B

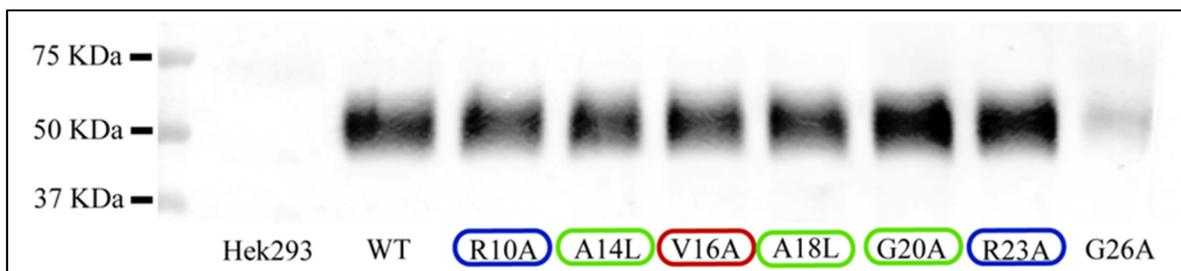


Abb. 24: Sekretionsanalyse der SP-Mutanten der ET_BR-GFP-Fusionen. HEK293-Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten transient transfiziert und nach 24 h Inkubation das verwendete Zellkulturmedium gesammelt. **(A)** Die GFP-Fluoreszenz wurde im Medium fluorometrisch gemessen. Jede Säule stellt den Mittelwert der GFP-Fluoreszenzintensität von drei unabhängigen Experimenten \pm SD dar (12×10^6 Zellen). **(B)** Immunoblot der mittels des His-Tags aufgereinigten, ins Zellkulturmedium sekretierten Proteine. Zur Visualisierung wurden ein monoklonaler anti-GFP-Antikörper und alkalische Phosphatase-konjugiertes anti-Maus IgG genutzt. Jede Probe enthielt das isoliertes Protein von 2×10^6 Zellen. Die Positivkontrollen (bei A WT.ET_BR.SP.NT.GFP und CRF₁R.SP.NT.GFP, bei B nur WT.ET_BR.SP.NT.GFP) zeigen in beiden Versuchen eine normale Sekretion, die Negativkontrollen (bei A CRF_{2a}R.SP.NT.GFP und ET_BR.G26L.SP.NT.GFP, bei B nur ET_BR.G26L.SP.NT.GFP) zeigt keinerlei Sekretion.

Die Resultate zeigen, dass eine Auswirkung der Punktmutationen auf die Funktion des ET_BR-SP ausgeschlossen werden kann. Dies bekräftigt die Resultate der durchflusszytometrischen Messungen der Einzel- und Mehrfachmutanten (siehe Abb. 20, 21 22). Das Konsensusmotiv im SP des ET_BR ist daher tatsächlich für dessen CT-Sensitivität verantwortlich.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Konsensusmotiv in SAS identifiziert werden, dass deren CT-Sensitivität vermittelt. Welche Faktoren dagegen die CT-Sensitivität der Mehrzahl von SP bestimmt, die dieses Motiv nicht enthalten, ist weiterhin unklar. Jedoch konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass in den seltenen Fällen, in denen das Motiv in SP zu finden ist (ET_BR-SP), es auch hier für die CT-Sensitivität verantwortlich zu sein scheint.

3.4 Entwicklung und Etablierung eines Hochdurchsatz-Screens zur Identifizierung von kleinen Molekülen, die den Sec61-Komplex inhibieren

Inhibitoren des Sec61-Komplexes wären für die Pharmakologie aus zwei verschiedenen Gesichtspunkten von großem Interesse. Eine Variante wären Inhibitoren, die den Sec61-Komplex generell inhibieren und so die Proteinbiosynthese aller Proteine unterbinden, die den sekretorischen Weg nutzen (Typ 1-Inhibitoren). Eine andere Möglichkeit stellen jene Inhibitoren dar, die in Abhängigkeit von einer Signalsequenz nur die Biosynthese eines spezifischen Proteins am Sec61-Komplex blockieren (Typ 2-Inhibitoren). Reine Typ 1-Inhibitoren sind bisher unbekannt. Ein Beispiel für einen Typ 2-Inhibitor ist CADA, das den Sec61-Komplex nur blockiert, wenn das SP des CD4-Proteins vorhanden ist (87). Alle anderen bisher gefundenen Inhibitoren – so auch CT – stellen gemischte Typ 1-/ Typ 2-Inhibitoren dar. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, einen reinen Typ1-Inhibitor für den Sec61-Komplex zu finden. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Screening-Assay (Schema: Abb. 25) sollten somit sowohl Typ 1-Inhibitoren als auch Typ 2-Inhibitoren für das Screening-Target gefunden werden. Es ist ferner die Identifizierung von Inhibitoren für die frühen Schritte des Sec61-Translokation-Pathways möglich, so z.B. für Inhibitoren des SRP oder des SRP-Rezeptors.

Der Aufbau des Hochdurchsatz-Screens zur Identifizierung von kleinen Molekülen, die den Sec61-Komplex inhibieren, war aus mehreren Gründen schwierig: Der Sec61-Komplex weist selbst keine enzymatische Aktivität auf und wird nur intrazellulär in der ER-Membran exprimiert. Auch seine Isolierung und funktionelle Rekonstitution ist in größeren Mengen schwierig. Aufgrund der oben genannten Hindernisse wurde in Zusammenarbeit mit der *Screening Unit* (Jens-Peter von Kries, FMP) ein zweistufiger, zellbasierter *in vitro* Screen

etabliert, der im Primärscreen alle Substanzen selektiert, die Einfluss auf die Transkription, Translation und den Sec61-Translokation-Pathway nehmen. In einem Sekundärscreen wurden dann alle Substanzen aussortiert, welche sich nur auf die Transkription und Translation auswirken. Substanzen, die im Primärscreen nicht aber im Sekundärscreen inhibieren, sollten dann den Sec61-Translokation-Pathway alleine blockieren (Abb. 25).

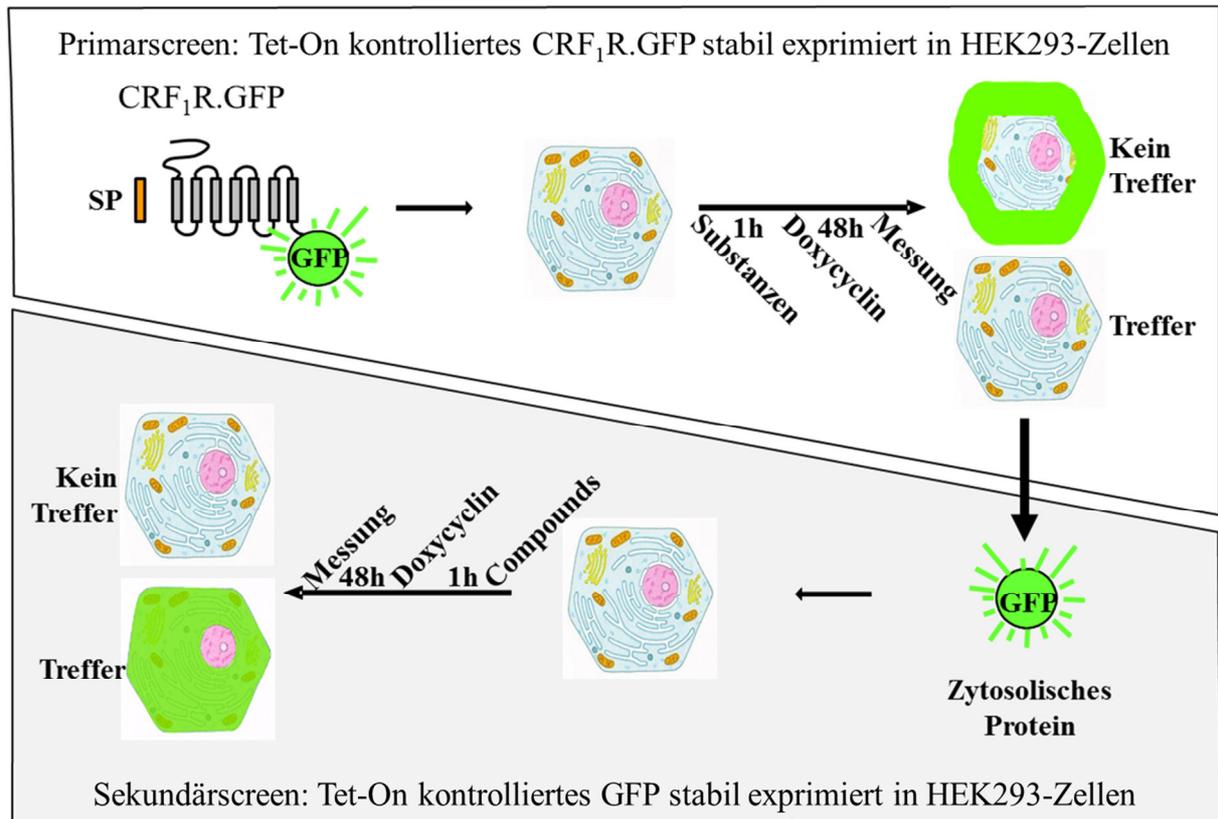


Abb. 25: Übersicht des Primär- und Sekundärscreens. In der oberen Box ist ein Schema des Primärscreens gezeigt. Dafür wurde der mit GFP markierte CRF₁R (CRF₁R.GFP) als primäres Screening-Target unter der Kontrolle eines Tet-On Promotors stabil in HEK293-Zellen exprimiert. Dieser Rezeptor enthält ein SP und nutzt daher den Sec61-Translokation-Pathway. Mit dem Primärscreen wurden Substanzen gesucht, die die Biosynthese von CRF₁R.GFP inhibieren. Das untere Bild zeigt das Schema des Sekundärscreens. Dafür wurden die inhibitorischen Substanzen des Primärscreens verwendet und mit einem ähnlichen Versuchsaufbau überprüft, ob diese auch die Biosynthese von unfusioniertem, zytosolischem GFP inhibieren.

3.4.1 Aufbau und Durchführung des Primärscreens

Für den Primärscreen wurde ein Fusionsprotein aus dem CRF₁R und GFP verwendet. CRF₁R.GFP enthält ein abspaltbares SP und wird über den sekretorischen Weg initial in die ER-Membran integriert (114, 125). Das Konstrukt wurde stabil unter der Kontrolle eines Tet-On Promotors in HEK293-Zellen exprimiert. Nach der Aussaat der Zellen in 384-Wellplatten erfolgte eine Inkubation mit den Testsubstanzen (jeweils 10 µM) für 1 h, bevor die Expression des CRF₁R-Konstrukts durch die Zugabe von Doxycyclin induziert wurde. Die

verwendete Bibliothek (insgesamt 37312 Substanzen) enthielt 32736 ausgewählte Substanzen, die aus pharmakologisch aktiven Verbindungen des World-Drug-Index (WDI) abgeleitet wurden (114). Die anderen 4776 Substanzen wurden aus der akademischen Forschung zur Verfügung gestellt. Die Auswertung erfolgte 48 h nach der Induktion mit einem Safire2 Plattenlesegerät über die Messung der GFP-Fluoreszenzintensität. Der Mittelwert aller Z-Faktoren der 106 gemessenen 384-Well-Zellkulturplatten betrug $0,69 \pm 0,089$ und war bei jeder einzelnen Platte im akzeptablen Bereich. Die Resultate des Primärscreens zeigten, dass 1075 Testsubstanzen die GFP-Fluoreszenzintensität von CRF₁R signifikant reduzierten (Z-Wert < -3). Wie oben ausgeführt sind in diesem Substanzkollektiv nicht nur Inhibitoren des Sec61-Translokation-Pathways sondern auch Inhibitoren der Transkription, Translation, GFP-fluoreszenzverringende und stochastisch falschpositive Substanzen enthalten. Von diesen 1075 Substanzen wurden die 1052 aktivsten Verbindungen auf eine neue Testsubstanzmutterplatte überführt.

3.4.2 Etablierung ,Validierung und Durchführung des Sekundärscreens

Um in dem Substanzkollektiv des Primärscreens Inhibitoren zu finden, die selektiv für den Sec61-Translokation-Pathway sind, wurde der Sekundärscreen durchgeführt. Hierfür wurde ein in HEK293-Zellen stabil exprimiertes, unfusioniertes GFP unter der Kontrolle eines Tet-On Promotors verwendet. Dieses Protein durchläuft nicht den sekretorischen Weg und wird nur im Zytosol exprimiert.

Der Sekundärscreen wurde mit den 1052 gewählten Testsubstanzen in Triplikaten unter Auswahlbedingungen (d.h. identisch zum Primärscreen mit CRF₁R.GFP (10µM)) und unter Ausschlussbedingungen (Sekundärscreen mit zytosolisch exprimiertem GFP (10 µM)) durchgeführt. Die Z-Faktoren aller im Sekundärscreen gemessenen 384-Well-Zellkulturschalen lagen im akzeptablen Bereich und hatten einen Mittelwert von $0,65 \pm 0,112$. Die Auswertung des Screens zeigte, dass 29 Substanzen eine reproduzierbare Inhibition der GFP-Fluoreszenzintensität im Primärscreen hervorriefen, jedoch keine Auswirkungen auf den Sekundärscreen unter Ausschlussbedingungen aufwiesen (nicht gezeigt).

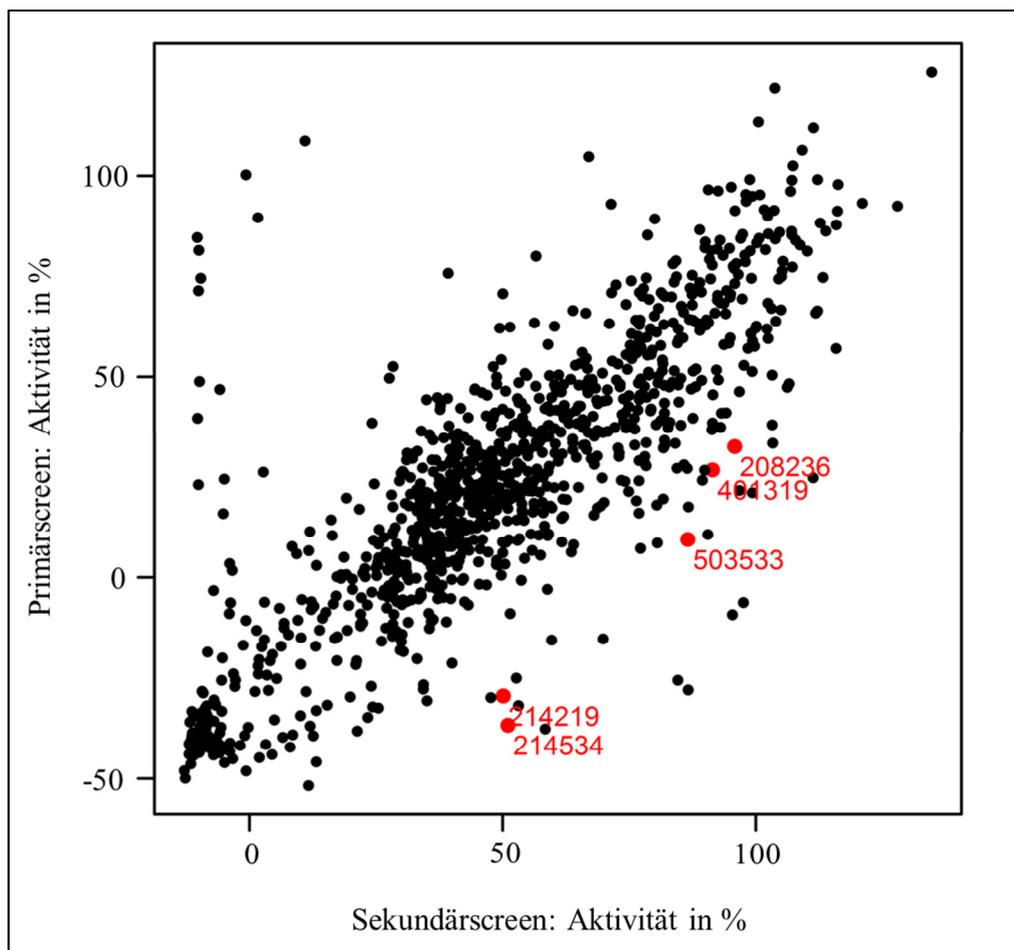


Abb. 26: Schematische Darstellung der Ergebnisse des Sekundärscreens. Die Grafik zeigt die Mittelwerte (ohne SD, aus Gründen der Übersicht) der drei Messungen unter Auswahlbedingungen (Primärscreen-Aktivität), die gegen die Mittelwerte (s.o.) der Dreifachbestimmung unter Ausschlussbedingungen (Sekundärscreen-Aktivität) aufgetragen wurden. Die fünf Substanzen, die für die weitere Analyse verwendet wurden (siehe unten), sind in Rot hervorgehoben.

3.4.3 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Jede der 29 identifizierten Testsubstanzen wurde mittels LC-MS Experimenten auf eine Reinheit von $> 90\%$ geprüft, um anschließend eine IC_{50} -Bestimmung durchführen zu können. Die Experimente wurden, wie beim Primärscreen beschrieben, durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Zugabe der Testsubstanzen in einer seriellen Verdünnungsreihe von 0-15 μM stattfand. Die IC_{50} -Werte der gefundenen 29 Substanzen lagen in diesen Versuchen zwischen 0,85 und 10,6 μm (nicht gezeigt).

3.4.4 Auswahl der zur weiteren Analyse verwendeten Substanzen

Für die weitere Analyse wurden in Zusammenarbeit mit der AG *Medicinal Chemistry* (Marc Nazaré, FMP) fünf Substanzen selektiert (Strukturen: Abb. 27 links). Die Auswahl beruhte

auf verschiedenen Kriterien. In erster Linie wurden die Ergebnisse des Primär- und Sekundärscreens berücksichtigt (Abb. 26), ferner die ermittelten IC_{50} -Werte der Substanzen für die Inhibition der Biosynthese des Screening-Targets $CRF_1R.GFP$ (Abb. 27 rechts). Ausgeschlossen wurden Substanzen, die in der FMP-internen Datenbank oder anderen offen zugänglichen Datenbanken häufiger als Effektoren in einem Screen identifiziert wurden. „Häufige Effektoren“ zeigen erfahrungsgemäß variable Effekte in Zellen, die später nicht einem spezifischen Wirkungsmechanismus zugeordnet werden können. Für die Auswahl wurden v.a. Eigenschaften berücksichtigt, die für die Ansprüche an Arzneimittel wesentlich sind, sowie die Erfüllung der Lipinskis *“rule of five”*. Diese besagt, dass die molekulare Masse der Testsubstanz nicht größer als 500 sein sollte und nicht mehr als fünf Wasserstoffdonatoren oder -akzeptoren vorhanden sein sollten. Die Hydrophobizität sollte fünf (a.u.) nicht übersteigen (126) und der polare Oberflächenbereich des Moleküls sollte nicht größer als 140 \AA^2 sein (127). Die fünf ausgewählten Substanzen erfüllten diese Kriterien (Abb. 27 Mitte).

Zusätzlich erfolgte eine Suche nach Grundstrukturen der Moleküle in den Datenbanken ChEMBL, *Chemical Abstract Service* und der internen Datenbank des FMP, um eine potentielle biologische Aktivität der Testsubstanzen zu entdecken. Für alle überprüften Substanzen konnten dabei keine Daten gefunden werden. Die unter Berücksichtigung all dieser Faktoren ausgewählten fünf Substanzen, weisen, wie in Abb. 27 zusammengefasst, alle unterschiedliche Grundstrukturen auf (FMP-503533, FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219; siehe auch Abb. 26 in Rot).

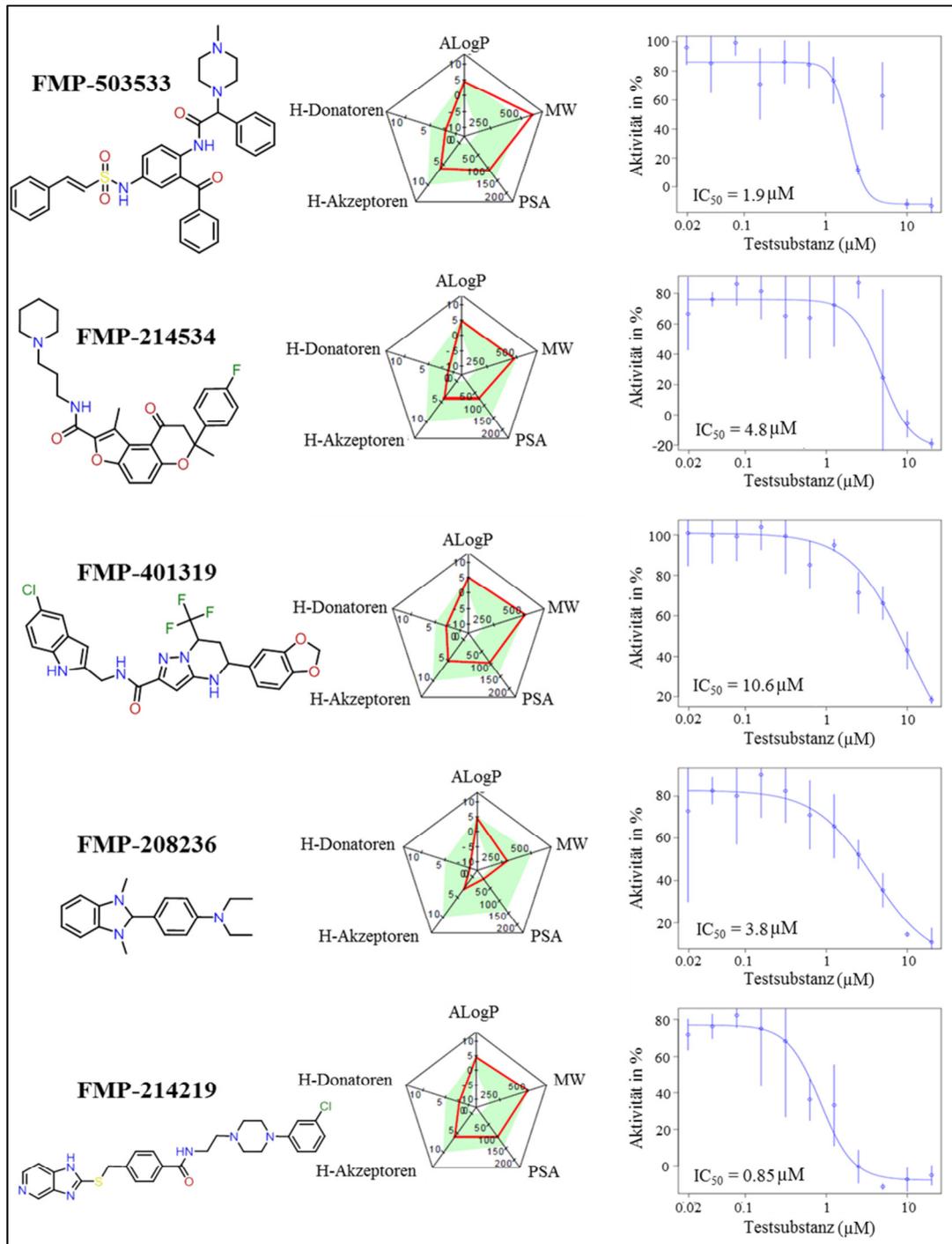


Abb. 27: Molekülstrukturen und Eigenschaften der Substanzen FMP-503533, FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219. (Links) Chemische Strukturen der identifizierten Substanzen. **(Mitte)** Beschreibung der jeweiligen Substanz (rote Linie) in Bezug auf die Erfüllung der Lipinski's „rule of five“ (grün hinterlegtes Feld: Hydrophobizität = ALogP, molekulare Masse = MW, polarer Oberflächenbereich = PSA; ferner die Zahl der H-Donatoren und -Akzeptoren). Die physikochemischen Eigenschaften wurden mittels des *SwissADME Servers* (www.swissadme.ch) errechnet. **(Rechts)** Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Reduktion der GFP-Fluoreszenzintensität von CRF₁R.GFP in stabil transfizierten HEK293 Zellen. Der Versuch wurde, wie beim Primärscreen beschrieben, durchgeführt. Es wurden jedoch serielle Verdünnungsreihen der Substanzen (0-15 µM) eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch die Detektion der GFP-Fluoreszenz mit einem Safire2 Plattenlesegerät. Die IC₅₀-Werte sind unter den Konzentrations-Wirkungs-Kurven angegeben. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils die Mittelwerte der Triplikate ± SD in % der maximalen Aktivität.

3.4.5 Überprüfung der Selektivität der Substanzen in einem zellulären Biosyntheseassay mit verschiedenen Membranproteinen

Nachdem die Auswahl der Substanzen erfolgt war, wurde untersucht, ob die Substanzen nur die Biosynthese des Screening-Targets (CRF₁R.GFP) inhibieren (Typ 2-Inhibitoren) oder auch die von anderen Membranproteinen (potentielle Typ 1-Inhibitoren). Es wurden folgende mit GFP fusionierte integrale Membranproteine verwendet: AQP2.GFP, CRF_{2(a)}R.GFP, ET_BR.GFP, LHR.GFP (Luteinisierender Hormon-Rezeptor), PAR1.GFP (Protease-Aktivierender Rezeptor 1), TSHR.GFP (Thyrotropin-Rezeptor), V₂.GFP (Vasopressin V₂-Rezeptor) und der im Screen verwendete CRF₁R.GFP.

Nach transienter Transfektion der Konstrukte in HEK293-Zellen, wurden diese für 19 h mit den Inhibitoren, DMSO oder Cycloheximid behandelt (siehe 2.2.2.6). Die Bestimmung der GFP-Gesamtfluoreszenz von 1×10^4 Zellen pro Probe erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messungen (siehe 2.2.2.6) und wurde als Maß der Proteinbiosynthese angesehen. Um den Einfluss von Proteinen auszuschließen, die bereits zum Zeitpunkt t_0 der Substanzbehandlung vorlagen, wurden die Messwerte der mit Cycloheximid behandelten Proben zur Normalisierung verwendet.

Für die Inhibitoren FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219 (Moleküldarstellung Abb. 28 links) zeigte sich eine Hemmwirkung, die für einen Typ 1-Inhibitor zu erwarten war. Diese Substanzen inhibierten die Biosynthese aller getesteten Proteine mit unterschiedlicher Intensität (Abb. 28 rechts). Der Inhibitor FMP-503533 (Moleküldarstellung Abb. 28 links) inhibiert dagegen nur die Biosynthese des Screening-Targets CRF₁R.GFP. Es könnte sich bei diesem Molekül also um einen Typ 2-Inhibitor handeln, der spezifisch für das SP von CRF₁R.GFP ist.

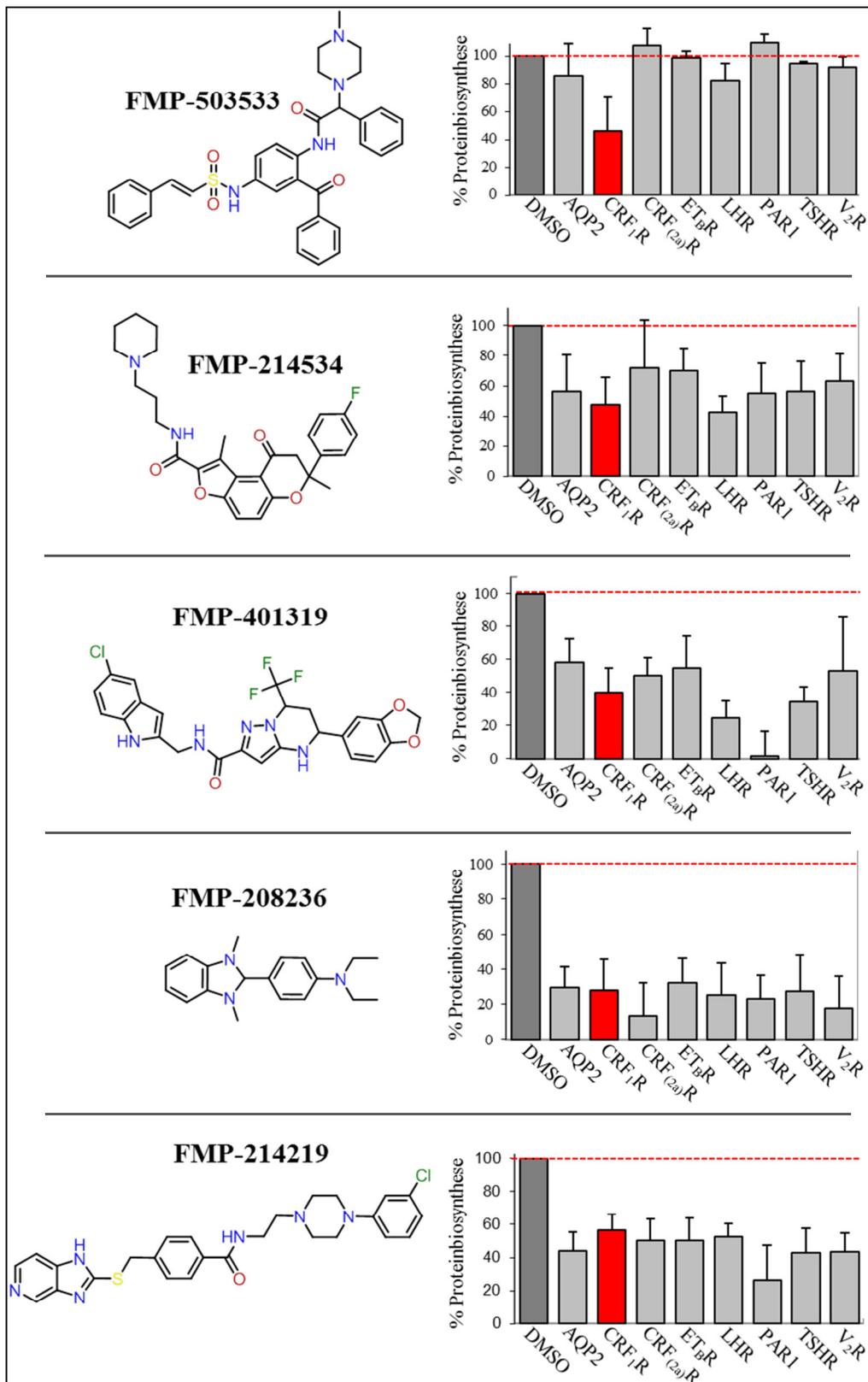


Abb. 28: Überprüfung der Selektivität der Inhibitoren **FMP-503533**, **FMP-214534**, **FMP-401319**, **FMP-208236** und **FMP-214219**. **(Links)** Chemische Strukturen der Inhibitoren. **(Rechts)** Um die Aktivität und Selektivität der identifizierten Inhibitoren zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen mit CRF₁R.GFP (Rot gekennzeichnet) und anderen GFP-fusionierten Membranproteinen transient transfiziert und mit den Inhibitoren FMP-503533 (20 µM), FMP-214534 (25 µM), FMP-401319 (25 µM), FMP-208236 (20 µM) und FMP-214219

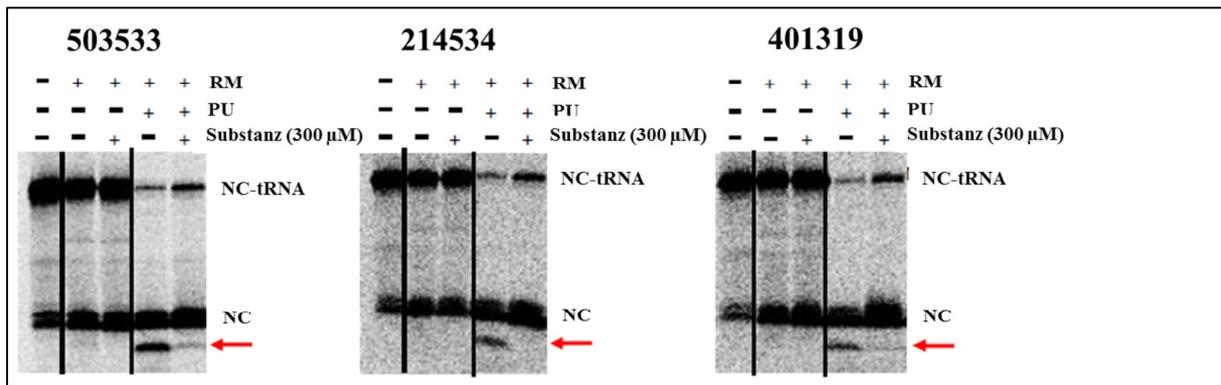
(10 μ M) behandelt. Die Zellen wurden für 19 h mit den Inhibitoren, Cycloheximid oder mit DMSO inkubiert und anschließend die GFP-Gesamtfluoreszenzintensität mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Substanzen FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219 inhibierten die Biosynthese aller verwendeten Membranproteine. Im Gegensatz dazu zeigt FMP-503533 nur eine Auswirkung auf die Proteinbiosynthese des CRF₁R.GFP-Konstrukts. Die Säulen der Diagramme stellen den Mittelwert der GFP Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten \pm SD dar.

Das zelluläre Biosyntheseassay zeigt zusammengefasst, dass mit dem zweistufigen Screen möglicherweise neue Typ 1-Inhibitoren gefunden wurden, die auf Ebene des Sec61-Komplexes wirken könnten (FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219). Bei der Substanz FMP-503533 handelt es sich möglicherweise um einen neuen Typ 2-Inhibitor für die Biosynthese des CRF₁R. Es war aber noch unklar, auf welcher Ebene des Sec61-Translokation-Pathways die Substanzen tatsächlich angreifen. Um dies zu untersuchen, wurde ein zellfreies Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassay in Zusammenarbeit mit Kurt Vermeire (Katholische Universität Leuven, Belgien) durchgeführt.

3.4.6 Untersuchung des Wirkungsmechanismus der identifizierten Substanzen auf der Ebene des Sec61-Translokation-Pathways mit Hilfe eines zellfreien Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassays

Für diesen Versuch wurde die Signalsequenz des Screening-Targets CRF₁R.GFP N-terminal an bovines Pre-Prolaktin fusioniert und ersetzte dabei dessen Signalpeptid (Konstrukt CRF₁R-pPL). Pre-Prolaktin stellt in diesem Versuch nur eine Markersequenz dar, die auch in Protease-Protektionassays gut charakterisierbar ist (siehe unten). Mittels PCR wurde ein CRF₁R-pPL-Fragment erzeugt, das eine 78 AS-Reste lange naszierende Kette ohne Stoppcodon ausbildet. Das PCR-Fragment wurde aufgereinigt und mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Anschließend erfolgte die Translation in einem zellfreien Retikulozyten-Lysat in Anwesenheit von [35S]-Methionin. Durch die Zugabe von pankreatischen rauen mikrosomalen Membranen (RM) kann der RNC mit Hilfe des SRP und des SRP-Rezeptors an den Sec61-Komplex binden. Weiter wird die Bindung der Signalsequenz an Sec61 α und die Öffnung des proteinleitenden Kanals initiiert. Durch das Fehlen eines Stoppcodons kann jedoch die Translation/ Translokation nicht beendet werden und die naszierende Kette bleibt über eine tRNA an das Ribosom und damit an den Sec61-Komplex gebunden. Diese Bindung wird durch die Zugabe von Puromyzin aufgehoben.

A



B

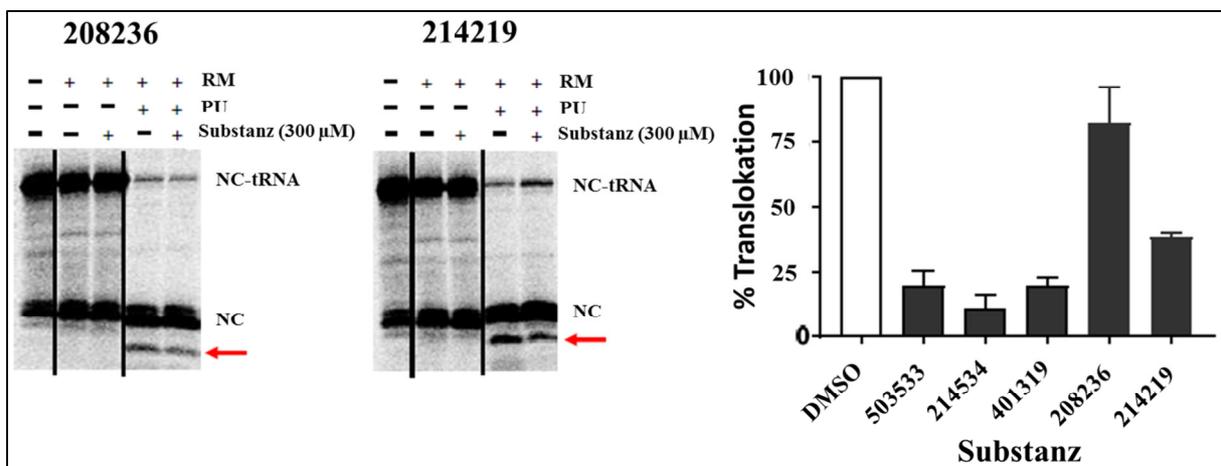


Abb. 29: Zellfreier Assay: Aktivitäten der Substanzen gegen den Sec61-Translokation-Pathway. (A) Gezeigt sind repräsentative Autoradiogramme der *in vitro* transkribierten/ translatierten und translozierten CRF₁R-pPL-Fusionsproteine in Anwesenheit und Abwesenheit der aufgeführten Substanzen (je 300 μ M). Die 78 AS-Reste lange naszierenden Ketten ohne Stoppcodon wurden *in vitro* mit einem zellfreien Reticulozyten-Lysat transkribiert/ translatiert. Da das Stoppcodon fehlt, bleiben die NC an das Ribosom und den Sec61-Komplex gebunden und sind nach SDS-PAGE/Autoradiographie als NC-tRNA-Komplex zu sehen (Spur 1, NC-tRNA). Aufgrund einer spontanen Hydrolyse der Peptidyl-tRNA-Bindung ist ebenfalls eine NC-Bande des [³⁵S]-markierten Proteins auf dem Radiogramm zu sehen (Spur 1, NC). Durch die Zugabe der RM (Spuren 2-5) kommt es zur Bindung zwischen den Ribosomen und dem proteinleitenden Kanal aber zunächst nicht zur Vollendung der Translokation. Diese erfolgt durch Zugabe von Puromycin (Spuren 4 und 5). Die naszierenden Ketten, die über den Sec61-Komplex transloziert wurden, werden dann nach Signalpeptidabspaltung in das RM-Lumen entlassen (rote Pfeile). (B) Die Signalintensitäten der translozierten Proteinbanden in Abwesenheit (DMSO, Spur 4) oder Anwesenheit der Substanz (Spur 5) sind in einem Säulendiagramm gezeigt. Jede Säule entspricht dem Mittelwert \pm S.E.; n \geq 2.

Puromycin ähnelt dem 3'-Ende einer Aminoacyl-tRNA und wird auf die naszierende Kette übertragen, sodass diese freigesetzt wird und die Translokation vollenden kann. Dies ermöglicht auf ER-luminaler Seite auch die Abspaltung des Signalpeptids durch die Signalpeptidase.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Substanzen FMP-503533, FMP-214534, FMP-401319 und im geringeren Maß auch FMP-214219 die Translokation und Prozessierung von CRF₁R-pPL inhibierten (Abb. 29; der rote Pfeil zeigt CRF₁R-pPL ohne Signalpeptid an). Die Substanz FMP-208236 zeigte hingegen keine Wirkung. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Substanzen FMP-503533, FMP-214534, FMP-401319 und FMP-214219 tatsächlich am Sec61-Translokation-Pathway angreifen. Der Wirkungsmechanismus der Substanz FMP-208236 bleibt unklar, da nur eine Inhibition im zellulären Assay nachweisbar war.

3.4.7 Identifizierung von Analoga der Substanz FMP-401319 („Hit-Expansion“)

Das größte Interesse besteht an den noch nicht beschriebenen reinen Typ 1-Inhibitoren des Sec61-Komplexes. Für die weiteren Analysen wurden daher die Substanzen FMP-503533 (wahrscheinlich Typ 2-Inhibitor), FMP-214219 (schwächere Aktivität im zellfreien Assay) und FMP-208236 (keine Aktivität im zellfreien Assay) ausgeschlossen. Um Hinweise auf die Struktur-/ Funktionsbeziehungen der verbleibenden Substanzen FMP-401319 und FMP-214534 zu erhalten, wurde zunächst in den Datenbanken (s.o.) nach kommerziell erhältlichen Substanzen gesucht, die ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen. Für die Substanz FMP-214534 wurden nur wenige ähnliche Moleküle identifiziert, sodass hier in Zukunft eine Derivatisierung mit Hilfe der medizinischen Chemie anzustreben ist. Im Fall der Substanz FMP-401319 konnte dagegen eine große Gruppe von ähnlichen Substanzen gefunden werden, die alle ein Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin Gerüst aufwiesen. Von dieser Substanz wurden 45 Analoga mit dem oben beschriebenen zellulären Assay (siehe 2.2.2.6) untersucht. In Abb. 30 sind nur exemplarische Ergebnisse gezeigt. Viele Substanzen, wie FMP-401319-6, FMP-401319-17 und FMP-401319-43 verloren im Vergleich zur ursprünglichen Substanz an inhibitorischer Potenz. Dagegen zeigte die Substanz FMP-401319-3 eine deutliche Steigerung des inhibitorischen Effekts auf die Proteinbiosynthese der Proteine AQP2, ET_BR und V₂R. (Abb. 30). Durch diese Experimente konnte auch ein erster Einblick in die Struktur-Wirkungsbeziehung von FMP-401319 erhalten werden.

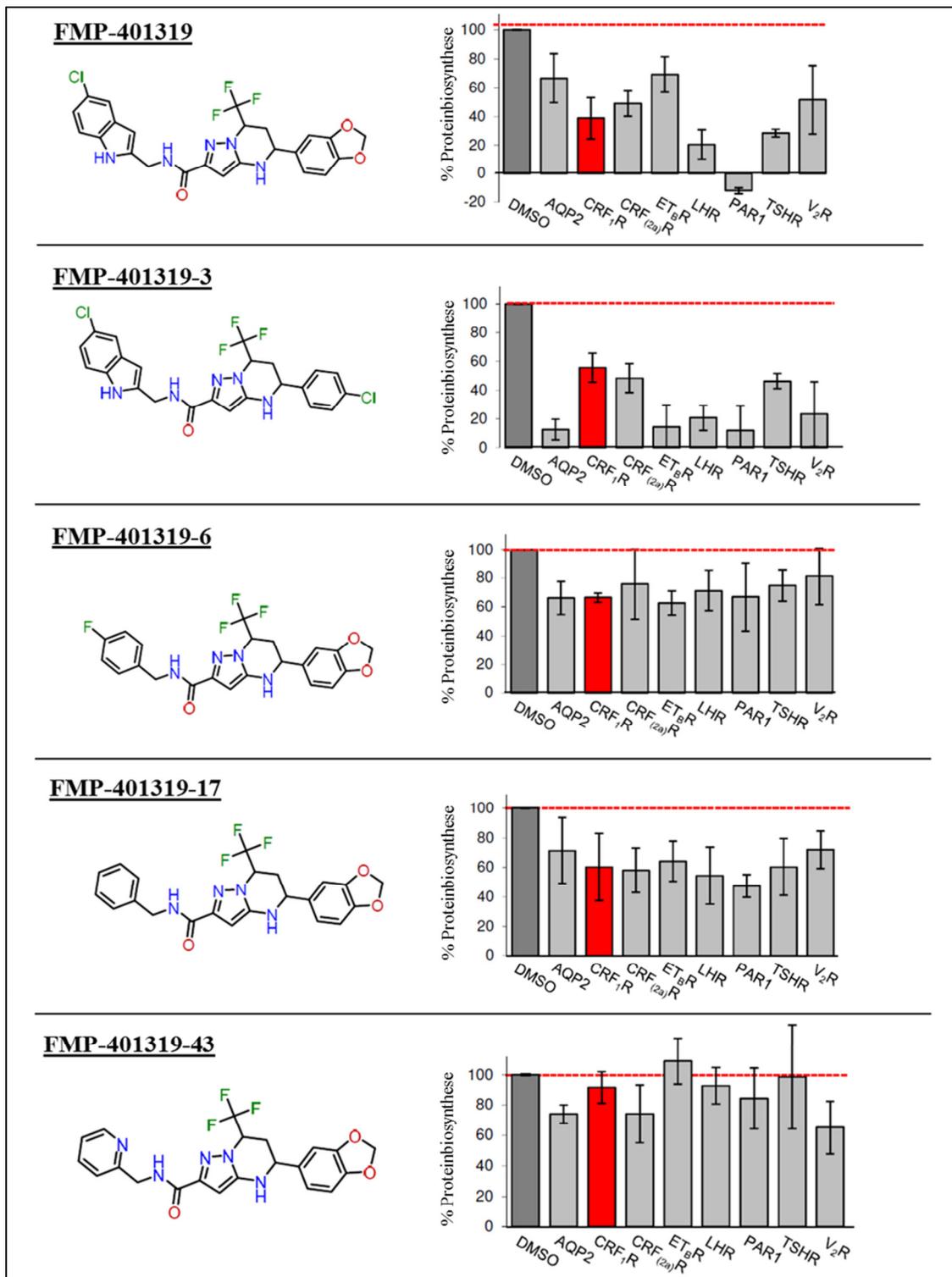


Abb. 30: Zelluläres Biosyntheseassay mit kommerziell erhältlichen Analoga der Substanz FMP-401319. Es sind nur exemplarische Ergebnisse gezeigt. **(Linker Teil)** Chemische Strukturen der Substanzen. **(Rechter Teil)** Mit den FMP-401319-Analoga wurde ein zelluläres Biosyntheseassay, wie in Abb. 27 beschrieben, durchgeführt. Während einige der Substanzen eine verringerte Aktivität aufwiesen (exemplarische Ergebnisse: Substanzen FMP-401319-6, FMP-401319-17 und FMP-401319-43), zeigte eine Substanz (FMP-401319-3), im Vergleich zu FMP-401319, einen erhöhten inhibitorischen Effekt auf einige Zielproteine. Die Säulen repräsentieren jeweils den Mittelwert von fünf unabhängigen Experimenten \pm SD.

Beispielsweise bewirkt die Substitution der Benzo-1,3-Dioxolan-Gruppe (rechte Hälfte des Moleküls) durch eine Chlorophenyl-Gruppe einen Anstieg des inhibitorischen Effekts (FMP-401319-3), wohingegen die Substitution der 5-Chloro-Indol-Gruppe (linke Hälfte des Moleküls) die inhibitorische Aktivität reduzierte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Seiten des Pyrazolo[1,5-a]-Pyrimidin-Gerüsts eine wichtige Rolle für die Funktion spielen. Um einen genaueren Einblick zu erhalten, wird aber auch hier ein Ansatz mit Synthesechemie erforderlich sein.

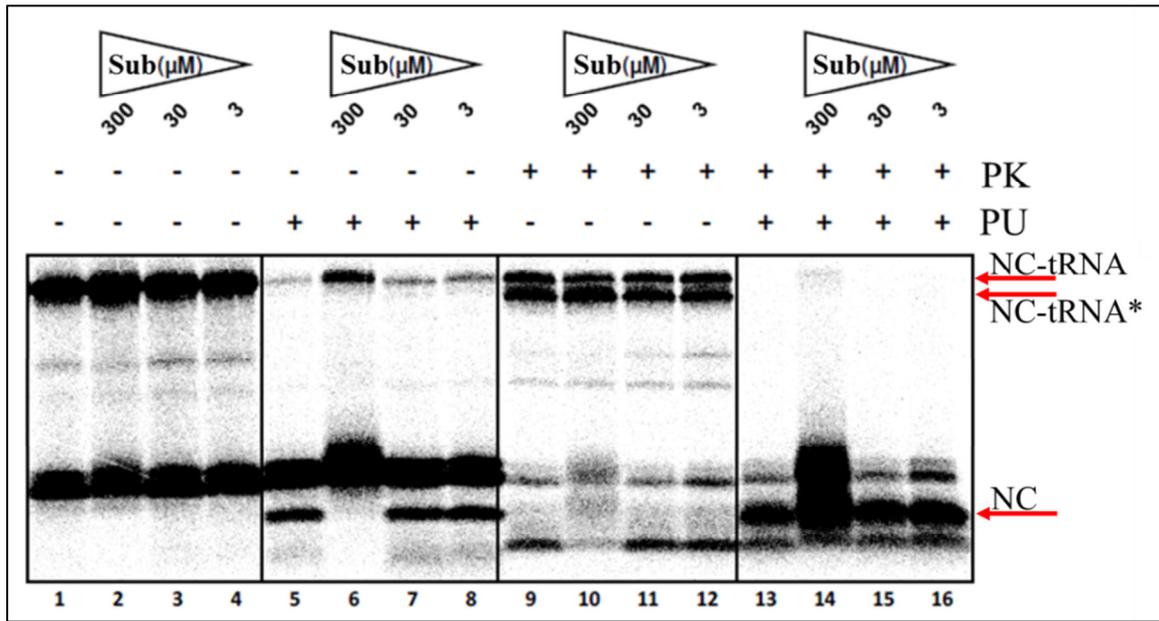
Bei der Analyse der Substanzen mit Hilfe des zellfreien Assays (siehe auch 2.2.3.4) zeigte sich, dass das inhibitorische Potential von FMP-401319-3 auf die Translokation von CRF₁R-pPL im Vergleich zu FMP-401319 etwas verbessert war (Daten nicht gezeigt). Die IC₅₀-Werte der Translokationsinhibition im zellfreien Assay lagen bei 139,1 µM für FMP-401319 und 97,6 µM für FMP-401319-3. Sie wurden durch die Berechnung des Verhältnisses von translozierten Proteinen gegen die Gesamtheit der translatierten Proteine im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle bestimmt (=100% Translokation) (Daten nicht gezeigt). Die IC₅₀-Werte erhöhen sich im zellfreien Assay im Vergleich zum zellulären Assay etwa um den Faktor 10 (z.B. FMP-401319 zellulär = 10,6 µM, siehe Abb. 27 und 28; zellfreies Assay = 139,1 µM). Dieser etwa zehnfache Anstieg im zellfreien Assay wurde in der Literatur häufig beschrieben (siehe CT oder CADA) (87, 92). Der Grund hierfür bleibt unklar (siehe Diskussion). Aufgrund der etwas verbesserten Eigenschaften wurden die weiteren Experimente mit FMP-401319-3 durchgeführt.

3.4.8 Untersuchung des Wirkungsmechanismus der Substanz FMP-401319-3 auf der Ebene des Sec61-Komplexes

Das oben beschriebene zellfreie Assay zeigt, ob eine Substanz auf den Sec61-Translokations-Pathway wirkt. Es gibt jedoch keinen Hinweis darauf, ob dieser Effekt auf einen Prä-Targeting-Schritt ausgeübt wird (z.B. Inhibition des SRP oder seines Rezeptors) oder auf Ebene des Sec61-Komplexes selbst. Diese beiden Möglichkeiten sollten im Folgenden unterschieden werden. Hierfür wurde der zellfreie Assay, wie in 2.2.3.4 beschrieben, mit der Substanz FMP-401319-3 wiederholt, mit dem Unterschied, dass gleichgroße Aliquots des translatierten und translozierten Materials Proteinase K ausgesetzt oder nicht weiter behandelt wurden. Alle Ansätze wurden mit RM versetzt, um das Anheften des Ribosoms an den Sec61-Komplex zu ermöglichen. Bei RNC, die noch nicht an den Sec61-Komplex gebunden haben,

wird der kurze N-terminale Teil der NC-tRNA, der aus dem zytosolischen Ribosom herausragt, durch die Proteinase K verdaut werden. Es entsteht eine etwas schneller laufende Bande auf dem Gel (Abb. 31, Spuren 9-12, unterhalb der NC-tRNA Bande; mit NC-tRNA* markiert). Haben die RNC dagegen bereits an den Sec61-Komplex gebunden, ist die NC-tRNA durch den Sec61-Komplex proteaseresistent (Abb. 31, Spuren 9-12, NC-tRNA-Bande). Da in den mit DMSO oder FMP401319-3 behandelten Proben die gleiche Menge an NC-tRNA-Banden und deren Abbauprodukte NC-tRNA* zu sehen waren (Abb. 31A, Spuren 9-12), kann ausgeschlossen werden, dass die Substanz einen Prä-Targeting-Effekt ausübt. In diesem Fall hätte sich die NC-tRNA*-Bande bei Substanzbehandlung deutlich verstärken müssen. Die Zugabe von Puromycin (PU) hingegen erlaubt bei dem DMSO behandelten Ansatz die Translokation und die Freisetzung der NC durch die Signalpeptidabspaltung. Die translozierte Kette ist im Lumen der RM proteaseresistent (Abb. 31A, Spur 13, roter Pfeil). Im Falle des mit FMP-401319-3 behandelten Ansatzes wird die Translokation der NC bei höheren Konzentrationen beeinträchtigt und es kommt zur Akkumulation der NC mit SP (Abb. 31A, Spur 14). Diese Bande ist ebenfalls proteaseresistent (die weiter unten laufenden proteaseresistenten Banden resultieren wahrscheinlich von NC, die zwischen dem Ausgangstunnel des Ribosoms und dem Sec61-Komplex auf zytosolischer Seite proteasezugänglich sind). Zusammengefasst zeigt dieses Experiment, dass die Substanz FMP-401319-3 offensichtlich die cotranslationale Translokation von CRF₁R-pPL blockiert und zwar nachdem der RNC an den Sec61-Komplex gebunden hat, aber bevor die NC das ER-Lumen erreicht hat, wo die Signalpeptidabspaltung erfolgen kann. Wie bereits oben ausgeführt, sind im zellfreien Assay wieder hohe Konzentrationen von FMP-401319-3 erforderlich, um diesen Effekt zu beobachten. Vergleicht man aber das inhibitorische Potential von FMP-401319-3 mit dem des archetypischen, gemischten Typ 1-/ Typ 2-Inhibitors CT hinsichtlich der CRF₁R-pPL-Translokation im zellfreien Assay, so sind die Unterschiede (Abb. 31B) nicht so groß, zumal das SP des CRF₁R als hoch CT-sensitiv beschrieben wurde. Die Substanz FMP-401319-3 ist insbesondere dann für weitere Untersuchungen interessant, wenn es sich bestätigen sollte, dass es sich um einen reinen Typ 1-Inhibitor des Sec61-Komplexes handelt.

A



B

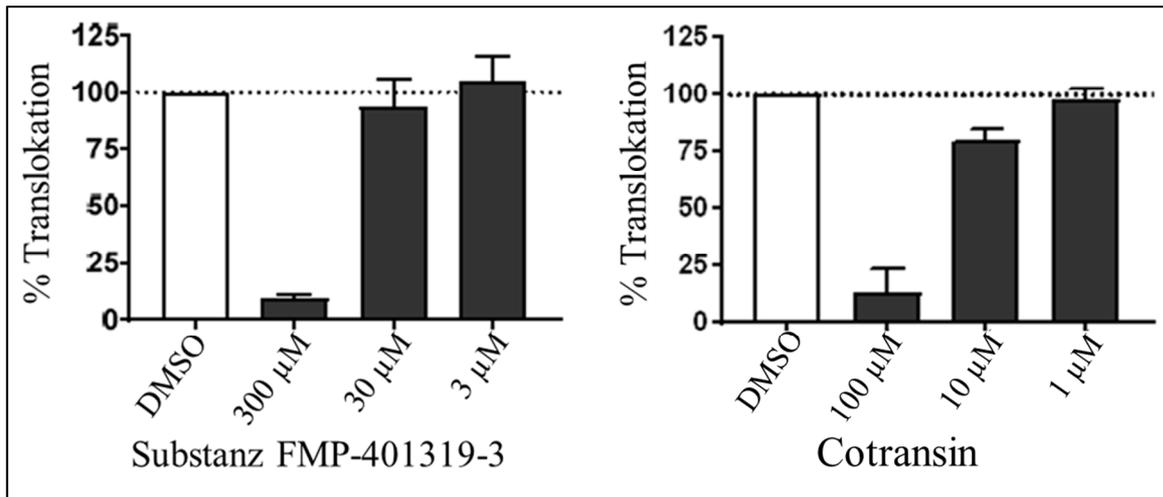


Abb. 31. Die Substanz FMP-401319-3 inhibiert die cotranslationale Translokation von CRF₁R-pPL auf der Ebene des Sec61-Komplexes. (A) Gezeigt sind repräsentative Autoradiogramme der *in vitro* transkribierten/ translatierten und translozierten CRF₁R-pPL-Fusionen in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von FMP-401319-3 (Sub). Alle Proben enthalten RM. Gleichgroße Aliquots der Proben blieben unbehandelt (Spuren 1-8) oder wurden mit PK behandelt (Spuren 9-16). Die mit dem unteren roten Pfeil markierten Banden zeigen naszierende Ketten, deren Signalpeptid abgespalten wurde und die ins RMLumen transloziert wurden. Bei einer Substanzkonzentration von 300 μM akkumulieren proteaseresistente NC mit ungespaltenem SP (Spur 14). **(B)** Signalintensitäten der translozierten Proteinbanden von CRF₁R-pPL in Abwesenheit (DMSO, Spur 5) oder Anwesenheit der von 300, 30 und 3 μM FMP 401319-3 (Spuren 6-8) im Säulendiagramm. Jede Säule entspricht dem Mittelwert ± S.E.; n = 3. **(C)**. Wie B jedoch mit 1, 10 und 100 μM CT (Autoradiogramme nicht gezeigt). Jede Säule entspricht dem Mittelwert ± S.E.; n = 3.

DISKUSSION

4.1 Identifikation eines strukturellen Konsensusmotivs in Signalsequenzen für die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Cotransin

Hun-7293 und das Derivat CT wurden als substratspezifische Inhibitoren der Proteinbiosynthese für die Proteine ICAM-1, E-Selektin und VCAM1 beschrieben (92). In den folgenden Jahren wurde die Liste, der durch CT in ihrer Proteinbiosynthese beeinflussten Proteine, immer wieder erweitert und angepasst (19, 47, 103-105, 107, 128). Im Jahr 2015 wurde dann eine *Proteomics*-Studie durchgeführt, bei der die SILAC-Methodik und Massenspektrometrie genutzt wurden, um festzustellen, wie viele Proteine tatsächlich CT-sensitiv sind. Zusätzlich ermöglichte diese Studie erstmals, zwischen wenig sensitiven und resistenten Proteinen zu unterscheiden, sowie den Einfluss von SP und SAS auf die CT-Sensitivität zu untersuchen (110). Die Ergebnisse zeigten, dass nahezu alle detektierbaren sekretorischen Proteine eine CT-Sensitivität aufwiesen, wohingegen die Mehrheit aller integralen Membranproteine nicht durch CT in ihrer Proteinbiosynthese beeinflusst wurden. Zwar war schon vorher bekannt, dass CT ein gemischter Typ 1-/ Typ 2-Inhibitor am Sec61-Komplex ist (es wurden ursprünglich fünf hochsensitive Proteine beschrieben), diese Studie zeigte jedoch, dass Cotransin noch weitaus weniger selektiv ist, als ursprünglich angenommen. Aufgrund der Tatsache, dass mit der angewandten SILAC-Methodik niedrig exprimierte Proteine oft nicht detektiert werden und das HepG2-Zellen nicht das gesamte Proteom repräsentieren, wird die Zahl der CT-sensitiven Proteine auch nach dieser Studie noch immer unterschätzt. Weiter wurde durch die Ergebnisse eine Spezifität von CT für SP ausgeschlossen, da von den 21 CT-sensitiven integralen Membranproteinen auch 12 eine SAS aufwiesen (110). Durch die *Proteomics*-Studie konnte auch die Möglichkeit praktisch ausgeschlossen werden, aus CT und den anderen Cyclodepsipeptiden pharmakologisch nutzbare, substratspezifische Typ 2-Inhibitoren durch Derivatisierung abzuleiten (104). Da die meisten integralen Membranproteine aber resistent gegenüber CT waren, erscheint es umgekehrt auch ausgeschlossen, dass aus CT ein unselektiver Typ 1-Inhibitor für den Sec61-Komplex entwickelt werden kann, der unabhängig von Signalsequenzen wirkt.

Für die erste Zielstellung dieser Arbeit, der Suche nach einem Konsensusmotiv für die CT-Wirkung und dessen Charakterisierung, brachte die *Proteomics*-Studie jedoch wichtige

Erkenntnisse. Durch einen Vergleich der *in silico* erzeugten dreidimensionalen Sekundärstrukturen einiger der im SILAC-Experiment identifizierten Signalsequenzen in Kombination mit den Ergebnissen der Sequenzalignment-Programme und weiteren Anpassungen gelang es hier erstmals, ein strukturelles Konsensusmotiv zu definieren, welches, wenn es innerhalb einer sensitiven SAS auftritt, eine CT-Sensitivität vermitteln kann (Abb. 14, 17, 18). In den seltenen Fällen, in denen das Motiv in einem SP auftritt, scheint es auch hier CT-Sensitivität hervorzurufen (Abb. 20, 21, 22). Die CT-Sensitivität vermittelnden Eigenschaften des Konsensusmotivs konnten in dieser Arbeit, sowohl bei SAS als auch bei SP, experimentell bestätigt werden. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit stellen sich folgende Fragen: Wie genau vermittelt das Konsensusmotiv die CT-Sensitivität der SAS und der wenigen SP, die dieses Motiv besitzen? Ebenso muss diskutiert werden, worauf die CT-Sensitivität der vielen SP beruht, die dieses Motiv nicht tragen.

Es wird angenommen, dass CT (Abb. 9) die Interaktion zwischen dem proteinleitenden Sec61-Komplex und der Signalsequenz verhindert (92). Der genaue Mechanismus hierfür ist noch unklar. Entsprechend kann auch noch keine Aussage darüber abgeleitet werden, wie das gefundene Konsensusmotiv die CT-Sensitivität vermittelt. In einem Modell für die Wirkungsweise von CT, welches aus den Resultaten einer seitenkettenspezifischen *Crosslinking*-Studie abgeleitet und kürzlich veröffentlicht wurde, wird angenommen, dass CT eine serielle Bindung der sensitiven Signalsequenzen auf der zytosolischen Seite des geschlossenen Kanals unterbindet. Diese serielle Bindung der Signalsequenzen fängt am äußeren Ende der zytosolischen Seite des Kanals an und durchläuft, durch die Verlängerung der naszierenden Kette, verschiedene Bindungsstufen bis hin zur Plug-Domäne (Abb. 4). Durch diese serielle Bindung soll die Signalsequenz die geschlossene Konformation des Kanals destabilisieren und dann zwischen den TMs des geöffneten proteinleitenden Kanals in die Lipiddoppelschicht der Membran eingebettet werden (47). Es wurde postuliert, dass CT in der Nähe der Plug-Domäne bindet und so die initiale Bindung der Signalsequenzen stabilisiert. Dadurch sollen die weiteren seriellen Bindungsschritte, die für die Öffnung des Kanals verantwortlich sind, blockiert werden (47). Bei diesem Modell der CT-Wirkungsweise wären Signalsequenzen, die keine CT-Sensitivität aufweisen, auch bei Anwesenheit von CT, in der Lage die Öffnung des Kanals einzuleiten. Bei dieser publizierten Hypothese bleibt allerdings die Frage offen, was eine CT-sensitive von einer CT-resistenten Signalsequenz unterscheidet. Eine gängige Hypothese zur Erklärung dieser Frage war bisher, dass für die

CT-Sensitivität einer Signalsequenz ausschließlich deren Hydrophobizität ausschlaggebend ist. Eine stärker hydrophobe Signalsequenz könnte diese Prozesse einfacher durchlaufen und thermodynamisch auch leichter in die ER-Membran integriert werden. Eine ausgeprägt hydrophobe Signalsequenz wäre demnach cotransinresistent, eine hydrophilere Signalsequenz contrainsensitiv (47).

Diese Hydrophobizitäts-Hypothese wird auf den ersten Blick auch durch die *Proteomics*-Studie unterstützt, die zeigte, dass fast alle sekretorischen Proteine mit SP (relativ hydrophil) CT-sensitiv waren, während die Mehrzahl der SAS (relativ hydrophob) keine CT-Sensitivität aufwiesen. Die in dieser Arbeit durchgeführte, bioinformatische Analyse der Daten konnte diese Hypothese jedoch nicht bestätigen, da gezeigt werden konnte, dass die Hydrophobizitäten der CT-sensitiven und -resistenten Signalsequenzen über die gesamte Hydrophobizitätsskala verteilt vorliegen (Abb.11). Einerseits unterstützt zwar die Tatsache, dass die Mutationen R10A, A14L, A18L, G20L und R23A die Gesamthydrophobizität des ET_BR-SP steigerten und gleichzeitig die CT-Sensitivität verringerten, die Hydrophobizitäts-Hypothese (Abb. 23). Andererseits führte die Mutation V16A des ET_BR-SP ebenfalls zu einer Reduktion der CT-Sensitivität, obwohl diese Mutation die Gesamthydrophobizität des SP verringert. Ferner steigerten einige der ET_BR-SP Mutationen, wie G9L und S22A, die in der Nähe oder direkt innerhalb des Konsensusmotivs liegen, ebenfalls die Gesamthydrophobizität des SP. Eine Reduktion der CT-Sensitivität blieb bei diesen Mutanten jedoch aus (Abb. 23).

Der Abgleich mit anderen Publikationen untermauert die Funktionalität des identifizierten Konsensusmotivs. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass der TNF- α ein CT-sensitives Protein ist. Die AS T45 und T46 in der SAS wurden dabei als ausschlaggebend für die Vermittlung der CT-Sensitivität gegenüber CT beschrieben (105). Diese Ergebnisse lassen sich leicht mit Hilfe des in dieser Arbeit identifizierten Konsensusmotivs erklären, das in der SAS des TNF- α ebenfalls vorkommt (Abb. 14, letzte Sequenz unterhalb der schwarzen Linie). Die AS T45 und T46 bilden demnach die erste Vertiefung des Konsensusmotivs innerhalb dieser SAS (Abb. 14). Die SAS von TNF- α enthält ein komplettes Konsensusmotiv. Leider wurde in der zitierten Arbeit die Mutagenesestudie nur bis AS 49 durchgeführt (47), was wahrscheinlich die Identifikation der restlichen AS des Motivs verhinderte. Auch im Fall der SAS des TNF- α ist die oben beschriebene Hydrophobizitäts-Hypothese in Frage zu stellen, da die SAS des TNF- α Proteins durch die beiden Mutationen V41K und L50K eine Reduktion der Gesamthydrophobizität erfuhr, die Sensitivität für CT jedoch durch die Mutationen erhöht wurde (47). Bei der genauen Betrachtung der Lysinsubstitutionen zeigt

sich, dass beide Mutationen durch die Einbringung flankierender, geladener AS höchstwahrscheinlich eine Optimierung des Konsensusmotivs in der SAS des TNF- α Proteins darstellen.

Eine weitere Möglichkeit für die Vermittlung der CT-Sensitivität könnte in der Länge der Signalsequenzen bestehen. Eine solche Korrelation konnte allerdings, wie in Abb. 12 gezeigt ist, in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit in allen sensitiven SAS ein Konsensusmotiv identifiziert, das die CT-Sensitivität vermitteln kann. In den wenigen SP, die das Motiv aufweisen, scheint es ebenfalls funktionell zu sein. Unklar bleibt, welche Eigenschaften die CT-Sensitivität der überwiegenden Mehrzahl von SP bestimmt, die dieses Motiv nicht enthalten. Die reine Hydrophobizitäts-Hypothese für die CT-Empfindlichkeit von Signalsequenzen erfuhr durch die Ergebnisse dieser Arbeit keine Unterstützung. Die Hydrophobizität einer Signalsequenz könnte allerdings ein Faktor unter mehreren anderen sein. Es gilt als relativ sicher, dass CT die Bindung sensitiver Signalsequenzen auf der zytosolischen Seite des geschlossenen Kanals stabilisiert und dadurch deren serielle Weiterleitung im proteinleitenden Kanal und die Öffnung des Kanals verhindert (47, 92). Diese initiale Stabilisierung der Signalsequenzen könnte gefördert werden, wenn das gefundene Konsensusmotiv vorhanden ist (SP oder SAS). Die Hydrophobizität der Signalsequenzen könnte an dieser Bindungsstelle dann eine untergeordnete Rolle spielen. Die vielen sensitiven SP, die das Motiv nicht enthalten, könnten dagegen eine etwas modifizierte erste Bindungsstelle nutzen, an der die relative Hydrophilität der Signalsequenzen eine größere Rolle spielt. Die Stabilisierung der SP an dieser Bindungsstelle durch CT könnte die hohe Anzahl von sensitiven SP erklären, die das Motiv nicht enthalten, aber im Vergleich zu SAS eher hydrophil sind. Möglicherweise gibt es aber in CT-sensitiven SP auch andere Konsensusmotive, die mit den Methoden dieser Arbeit bisher nicht identifiziert werden konnten. CT und die anderen Cyclodepsipeptide haben einen sehr interessanten Wirkungsmechanismus am Sec61-Komplex, der insbesondere durch zukünftige *Crosslinking*-Studien mit CT und sensitiven Signalsequenzen, die das Motiv enthalten und solchen, die es nicht enthalten, experimentell zugänglich sein sollte. Leider werden CT und seine möglichen Derivate aus den eingangs erwähnten Gründen pharmakologisch nicht nutzbar sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher nach neuen Inhibitoren für den Sec61-Komplex gesucht.

4.2 Entwicklung und Etablierung eines Hochdurchsatz-Screens zur Identifizierung von kleinen Molekülen, die den Sec61-Komplex inhibieren

Mit der in dieser Arbeit entwickelten sequenziellen Hochdurchsatz-Screening-Methode werden Inhibitoren für den gesamten Sec61-Translokation-Pathway erfasst. Ziel war es v.a. neue Typ 1-Inhibitoren des Sec61-Komplexes zu identifizieren. Diese wurden bisher nicht beschrieben und könnten neue zytotoxische Tumormittel darstellen, die im Gegensatz zu konventionellen Zytostatika (z.B. DNA-interkalierende Substanzen, DNA-Alkylantien, Basenanaloga) selbst keine mutagenen Eigenschaften besitzen. Das Screening-Assay sollte aber natürlich auch die Identifizierung neuer Typ 2-Inhibitoren für das primäre Screening-Target ermöglichen.

Durch den Primärscreen wurden alle Substanzen identifiziert, welche einen Einfluss auf die Transkription, die Translation, die Translokation sowie die Assemblierung des Sec61-Translokons und seiner permanenten und temporären Komponenten ausüben. Weiterhin wurden Substanzen gefunden, die stochastisch falsch-positiv waren und Substanzen, die die GFP-Fluoreszenz eliminieren. Im Sekundärscreen wurden anschließend die Substanzen identifiziert, die ausschließlich den Sec61-Translokation-Pathway hemmen sollten. Durch die Bestimmung der IC_{50} -Werte und die Berücksichtigung der Kriterien der Medizinalchemie wurden fünf Substanzen für die weiteren Analysen ausgewählt. Die Selektivität der Substanzen wurde durch ein zelluläres Biosyntheseassay mit verschiedenen Membranproteinen bestimmt. Für den Wirkungsmechanismus am Sec61-Komplex stand ein zellfreies Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassay zur Verfügung. Im zellulären Assay zeigte die Substanz FMP-503533 eine Selektivität für das primäre Screening-Target (Abb. 28). Es könnte sich hierbei also um einen Typ 2-Inhibitor des Sec61-Komplexes handeln, der nur beim Vorhandensein des SP des CRF_1R wirksam ist. Um dies zu bestätigen, wären weitergehende Studien notwendig, v.a. eine *Proteomics*-Analyse (z.B. SILAC-Experimente mit kombinierter Massenspektrometrie). Das Wirkprinzip eines Typ 2-Inhibitors war bereits beschrieben (89) und das Auffinden eines Typ 1-Inhibitors hatte auch unter pharmakologischen Gesichtspunkten eine höhere Priorität. Die übrigen vier Substanzen, FMP-214534, FMP-401319, FMP-208236 und FMP-214219, inhibierten dagegen die Biosynthese aller eingesetzten Membranproteine, was auf ein Typ 1-Wirkprinzip hinweist

(Abb. 28). Dies sollte zukünftig aber ebenfalls durch eine *Proteomics*-Analyse gesichert werden.

Im zellfreien Assay konnte gezeigt werden, dass die Substanzen, FMP-503533, FMP-214534, und FMP-401319 offensichtlich am Sec61-Translokation-Pathway angreifen, denn sie inhibierten die Translokation des Konstrukts CRF₁R-pPL (Abb. 29). Die Substanzen FMP-208236 und 214219 zeigten keine bzw. eine schwächere Inhibition der Translokation. Daraus kann jedoch nicht zwingend geschlossen werden, dass die beiden letzten Substanzen nicht am Sec61-Translokation-Pathway angreifen. Das zellfreie Assay stellt ein rekonstituiertes System dar, in das alle Komponenten in ihrer funktionellen Form zugesetzt werden. Würden die beiden letzten Substanzen beispielsweise die Zusammenlagerung einer der Komponenten des Sec61-Translokation-Pathways inhibieren (z.B. des SRP oder des Sec61-Komplexes), wäre dies im zellfreien Assay nicht detektierbar. Diese Hypothese müsste in weiteren Studien überprüft werden.

Im Rahmen der umfangreichen Datenbankanalysen konnten nur für die Substanz FMP-401319 zahlreiche kommerziell erhältliche Analoga identifiziert werden, die einen ersten Einblick in die Struktur-Wirkungsbeziehung erlauben. Hier konnte gezeigt werden, dass offensichtlich beide Enden des Moleküls für die Wirkung wichtig sind (Abb. 30).

Mit der Substanz FMP-401319-3 wurde eine Substanz identifiziert, die etwas bessere Eigenschaften als die Ausgangssubstanz aufweist. Mit dieser Verbindung wurde dann untersucht, auf welcher Ebene des Sec61-Translokation-Pathways der Angriff erfolgt. Mit Hilfe des zellfreien Assays und kombinierter Proteaseprotektion konnte gezeigt werden, dass FMP 401319-3 tatsächlich auf der Ebene des Sec61-Komplexes wirkt. Die Substanz blockierte die cotranslationale Translokation von CRF₁R-pPL, nachdem der RNC an den Sec61-Komplex gebunden hat, aber bevor die NC das ER-Lumen erreicht hat, wo die Signalpeptidabspaltung erfolgen kann. Auffällig war, dass im zellfreien Assay deutlich höhere Konzentrationen erforderlich sind, um einen Effekt zu erzielen, als im zellulären Assay. Ähnliches wurde auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet z.B. im Rahmen der CT- oder CADA-Studien (87, 92). Ein Grund hierfür könnte in der ausgeprägten Hydrophobizität der Substanzen liegen. Geht man davon aus, dass im zellfreien Assay ein Überschuss an mikrosomalen Membranen eingesetzt wird, so könnten diese Membranen einen Großteil der eingesetzten Substanzen durch hydrophobe Wechselwirkungen abfangen. Zukünftig sollte dieser Parameter optimiert werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zum zellulären System zu ermöglichen.

Die IC_{50} -Werte der in dieser Arbeit gefundenen Inhibitoren für die Biosynthese von CRF₁R.GFP lagen aber auch im zellulären Assay nur im niedrigen mikromolaren Bereich (Abb. 27). Für die Entwicklung eines Arzneimittels wäre sicher eine niedrige nanomolare IC_{50} die bessere Ausgangsbasis. Auch wenn mit den Methoden der Medizinalchemie hier noch einiges verbessert werden kann, sollte auch über einen zweiten Sekundärscreen mit kürzerer Inkubationszeit nachgedacht werden. Hochtoxische Inhibitoren des Sec61-Komplexes könnten im Sekundärscreen bei der verwendeten Inkubationszeit von 48 h zum schnellen Absterben der Zellen geführt haben, so dass auch die Synthese von zytosolischem GFP unter die Nachweisgrenze gefallen sein könnte.

Zum Schluss muss festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit nur einen ersten Schritt darstellen, um Selektivität und Wirkungsmechanismus der Substanz FMP-401319-3 zu beschreiben. Neben der bereits erwähnten *Proteomics*-Analyse zur abschließenden Bestätigung einer unselektiven Typ 1-Inhibition, müsste z.B. mit *Crosslinking*-Studien gezeigt werden, ob FMP-401319-3 direkt am Sec61-Komplex angreift. Ein indirekter Wirkungsmechanismus kann derzeit noch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Obwohl die Anzahl der Inhibitoren, die auf den eukaryontischen Sec61-Translokation-Pathway wirken, in den letzten Jahren zugenommen hat (81), wurde bis heute nicht ein einziger Inhibitor des orthologen prokaryontischen SecYEG-Translokation-Pathways identifiziert. Der Sec61- und der SecYEG-Komplex weisen zwar strukturell und funktionell große Ähnlichkeiten auf, die Aminosäuresequenzidentitäten und -ähnlichkeiten der proteinleitenden Kanaluntereinheiten sind aber mit 18,7% Identität und 49,6% nicht übermäßig ausgeprägt (*E.coli* SecY vs. humanes Sec61 α). Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass es Inhibitoren gibt, die zwar SecYEG blockieren, nicht aber den Sec61-Komplex. Solche SecYEG-Inhibitoren könnten eine völlig neue Klasse von Antibiotika darstellen, die dringend, z.B. für die Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Keimen, benötigt werden. Möglicherweise beruht der Mangel an SecYEG-Inhibitoren auf dem Fehlen geeigneter Screening-Assays. Ein im Vergleich zu dieser Arbeit nur wenig verändertes zweistufiges Screening-Verfahren könnte hier Abhilfe schaffen. So könnte man für den Primärscreen ein mit GFP fusioniertes Membranprotein von z.B. *E.coli* als Target verwenden, das über den cotranslationalen SecYEG-Translokation-Pathway in die innere Membran der Bakterien integriert wird. Der Sekundärscreen würde dann wieder mit unfusioniertem, zytosolischem GFP durchgeführt werden. Für eine Differenzierung der in diesem Fall unerwünschten

Wirkungen gegen den Sec61-Komplex könnte ebenfalls auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zurückgegriffen werden.

Zusammenfassung

Der Sec61-Translokon-Pathway ist für die meisten Proteine der erste Schritt des intrazellulären Proteintransports. Mit Hilfe von Signalsequenzen der Proteine und des Sec61-Komplexes der ER-Membran werden sekretorische Proteine über die ER-Membran transloziert und integrale Membranproteine in diese integriert. Die kontrollierte Beeinflussung der Translokation von Proteinen am Sec61-Komplex hat ein hohes pharmakologisches Potential, das zur Zeit noch nicht genutzt wird. Inhibitoren des Sec61-Komplexes könnten z.B. zu neuen Zytostatika entwickelt werden. Um dieses Ziel in erreichbare Nähe zu rücken, muss die Funktionsweise des Sec61-Komplexes und insbesondere der Öffnungsmechanismus des proteinleitenden Kanals durch die Signalsequenzen der Proteine weiter aufgeklärt werden. Auch für diesen Zweck wären Inhibitoren des Sec61-Komplexes gute Werkzeuge. Ein Beispiel für einen solchen Inhibitor stellt das Zyklodepsipeptid Cotransin (CT) dar. Bisher wurde beschrieben, dass CT und einige andere Zyklodepsipeptide wahrscheinlich direkt an den Sec61-Komplex binden, dort aber nur die Biosynthese einer kleinen Anzahl von Proteinen blockieren. Für diese Selektivität sind die Signalsequenzen der sensitiven Proteine verantwortlich. Die Zahl der Proteine, deren Biosynthese tatsächlich CT-sensitiv ist, war ebenso unklar wie die Eigenschaften der Signalsequenzen, die diese Sensitivität vermitteln. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die tatsächliche Selektivität von CT mit Hilfe einer *Proteomics*-Analyse untersucht und festgestellt, dass bei einer sättigenden CT-Konzentration von 30 μM die Biosynthese fast aller sekretorischer Proteine CT-sensitiv war. Die Biosynthese der Mehrzahl der integralen Membranproteine war dagegen CT-resistent. Die Substanz ist damit weitaus weniger selektiv als bisher angenommen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine breit angelegte, bioinformatische Analyse der Signalsequenzen der CT-sensitiven Proteine durchgeführt, die in dieser *Proteomics*-Studie identifiziert wurden. Ziel war es, ein mögliches Konsensusmotiv in den Signalsequenzen (Signalankersequenzen oder Signalpeptide) zu identifizieren, das die CT-Sensitivität vermittelt, und dieses dann experimentell zu charakterisieren. In allen CT-sensitiven Signalankersequenzen konnte auf Ebene der α -helikalen Sekundärstruktur ein entsprechendes Konsensusmotiv gefunden werden. Das Konsensusmotiv bildet auf der Helixoberfläche zwei Vertiefungen durch kleine Aminosäurereste aus (Gly, Ala, Ser, Thr, Cys), die durch größere, raumfüllende Aminosäurereste voneinander getrennt sind. Flankierend zu dieser Gruppe von Aminosäuren finden sich große geladene, polare oder aromatischen Aminosäurereste. In der

Folge wurde mit Hilfe von gerichteten Mutagenesen experimentell bestätigt, dass dieses Motiv die CT-Sensitivität einer Signalankersequenz vermitteln kann. Im Gegensatz zu den CT-sensitiven Signalankersequenzen, bilden die meisten CT-sensitiven Signalpeptide dieses Motiv nicht aus und es bleibt unklar, worauf deren CT-Sensitivität beruht. In den seltenen Fällen, in denen das Motiv in einem Signalpeptid vorhanden ist, scheint es auch hier die CT-Sensitivität zu vermitteln. Dies konnte ebenfalls durch gerichtete Mutagenesen experimentell gezeigt werden.

Die oben beschriebenen Zyklodepsipeptide weisen einen Signalsequenz-selektiven Wirkungsmechanismus am Sec61-Komplex auf und sind daher, auch aufgrund ihrer peptidischen Struktur, für die Wirkstoffentwicklung wenig geeignet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein zellbasierter Hochdurchsatz-Screen entwickelt und etabliert, mit dem Ziel, neue Inhibitoren für den Sec61-Komplex zu identifizieren, die den proteinleitenden Kanal auch unabhängig von Signalsequenzen blockieren. Bei diesem sequenziellen Screening-Verfahren mit 37312 Substanzen wurden im Primärscreen zunächst alle Verbindungen aus der Bibliothek identifiziert, die einen Einfluss auf Transkription, Translation und den Sec61-Translokation-Pathway haben. Im Sekundärscreen wurden dann die Substanzen identifiziert, die eine Selektivität für den Sec61-Translokation-Pathway aufweisen sollten. Nach Bestimmung der IC_{50} -Werte und Berücksichtigung der Parameter der Medizinalchemie wurden fünf Substanzen für die weitere Analyse ausgewählt. Die Selektivität der Substanzen wurde mit Hilfe eines zellulären Biosyntheseassays mit verschiedenen Membranproteinen bestimmt. Die Aktivität gegen den Sec61-Translokation-Pathway konnte mit einem zellfreien Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassay bewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass zwei Substanzen (FMP-214534 und FMP-401319) den Sec61-Translokation-Pathway unabhängig von Signalsequenzen mit einer IC_{50} im niedrigen mikromolaren Bereich (zelluläres Assay) blockieren. Für die Substanz FMP-401319 wurde eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Analoga analysiert und eine Substanz mit leicht verbesserten Eigenschaften gefunden. Mit dieser Substanz (FMP-401319-3) wurde abschließend mit Hilfe des zellfreien Transkriptions-/ Translations-/ Translokationsassays und Proteaseprotektion bestimmt, auf welcher Stufe des Sec61-Translokation-Pathways die Verbindung angreift. Es konnte gezeigt werden, dass die Substanz die cotranslationale Translokation eines Proteins auf der Ebene des Sec61-Komplexes blockiert, und zwar nachdem das Ribosom an den Sec61-Komplex gebunden hat, aber bevor die naszierende

Proteinkette das ER-Lumen erreicht und das Signalpeptid abgespalten werden kann. Zukünftige Studien müssen zeigen, wo genau die Substanz FM-401319-3 bindet und den Sec61-Komplex beeinflusst.

Summary

For most proteins, the Sec61 translocon pathway represents the first step in intracellular protein transport. With the help of signal sequences of the proteins and the Sec61 complex of the ER membrane, secretory proteins are translocated across the ER membrane and integral membrane proteins are integrated into the lipid bilayer. Thus, controlling protein translocation at the Sec61 complex has a high pharmacological potential, which is currently not used. Inhibitors of the Sec61 complex could therefore serve, for example, as new cytostatic drugs. Sec61 inhibitors further represent appropriate tools to study the function of the Sec61 complex and in particular the opening mechanism of the protein-conducting channel by the signal sequences of the proteins which, in turn, must be further elucidated in order to optimize these drugs. An example of such an inhibitor is the cyclodepsipeptide cotransin (CT). To date, it was described that CT and some other cyclodepsipeptides are likely to bind directly to the Sec61 complex. However, these compounds were shown to only block the biosynthesis of a small number of proteins. For this selectivity, the signal sequences of the sensitive proteins are crucial. Nevertheless, neither the actual number of CT-sensitive proteins was clearly determined nor was known what distinguishes CT-sensitive and non-sensitive signal sequences. Prior to this work, the actual selectivity of CT was studied by a proteomics analysis and it was found that at a saturating CT concentration (30 μM), the biosynthesis of almost all secretory proteins was CT-sensitive. The biosynthesis of the majority of integral membrane proteins, however, was CT-resistant. These results showed that CT was far less selective than previously thought.

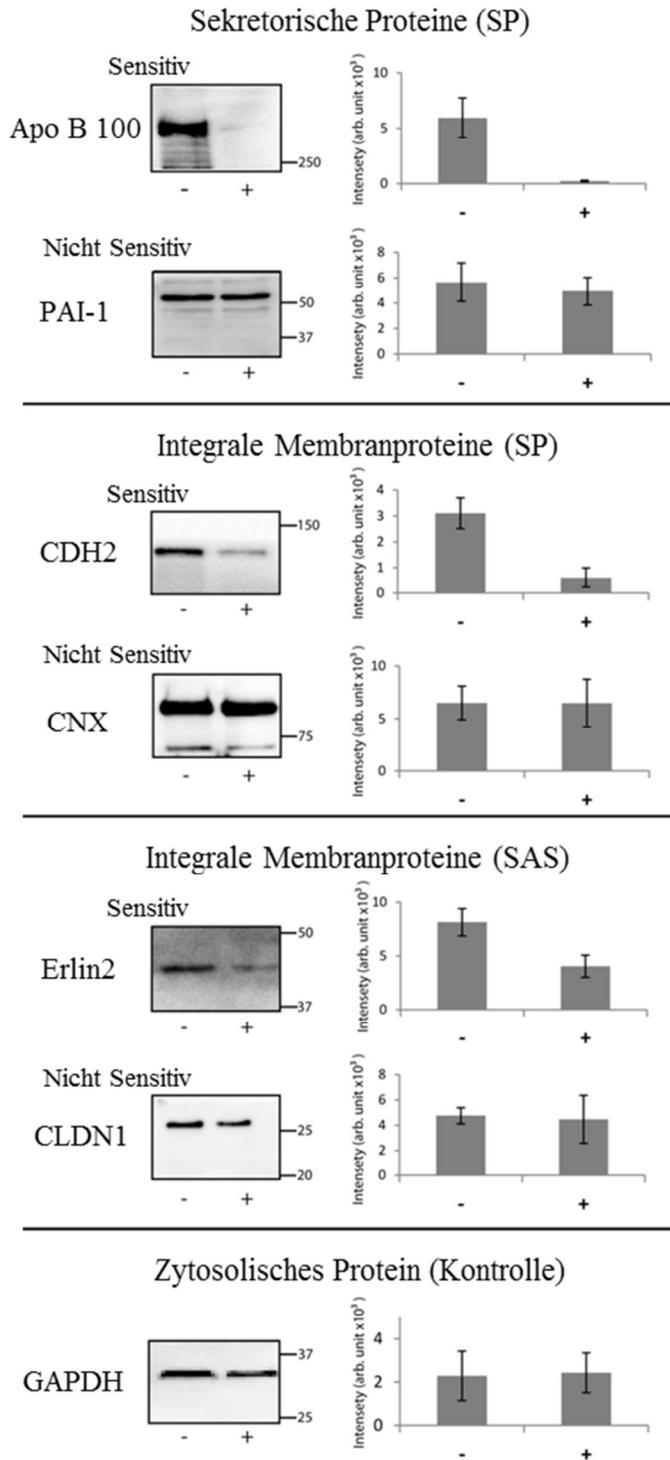
In the first part of this work, an extensive bioinformatic analysis of the signal sequences of the CT-sensitive proteins, previously identified in the proteomics study, was performed. The aim was to identify a possible consensus motif in the signal sequences (signal anchor sequences or signal peptides), which mediates CT sensitivity and to characterize it experimentally. In all CT-sensitive signal anchor sequences, a corresponding consensus motif could be identified at the level of the α -helical secondary structure of these sequences. The consensus motif leads to the formation of two cavities at the helix surface by the presence of small amino acid residues (Gly, Ala, Ser, Thr, Cys) which are separated by larger, space-filling amino acid residues. The cavities are flanked on both sides by large charged, polar or aromatic amino acid residues. Subsequently, it was confirmed experimentally by directed mutagenesis experiments that this

motif can mediate the CT sensitivity of a signal anchor sequence. In contrast to the CT-sensitive signal anchor sequences, most CT-sensitive signal peptides do not form this motif and it remains unclear what determines their CT sensitivity. However, in the rare cases where the motif is present in a signal peptide, it also appears to mediate CT sensitivity. This could also be confirmed experimentally by directed mutagenesis.

The cyclodepsipeptides described above have a signal sequence-selective mechanism of action at the Sec61 complex and are therefore not suitable for drug development, also because of their peptidic structure. In the second part of this work, a cell-based high-throughput screen was developed and established with the aim to identify new inhibitors for the Sec61 complex, which block the protein-conducting channel independently of signal sequences. In the primary screen of this sequential screening assay (37,312 compounds in total), all substances from the library that have an influence on transcription, translation and the Sec61 translocon pathway were identified. In the secondary screen, the substances which should inhibit the Sec61 translocon pathway alone were then selected. After determining the IC_{50} values, and considering the parameters of medicinal chemistry, five substances were selected for further analysis. The selectivity of the substances was determined by use of a cellular biosynthesis assay with various membrane proteins. The activity against the Sec61 translocon pathway was analyzed using a cell-free transcription/ translation/ translocation assay. It was found that two substances, namely FMP-214534 and FMP-401319, block the Sec61 translocon pathway independent of signal sequences with low micromolar IC_{50} values (cellular assay). For the substance FMP-401319, a variety of commercially available analogs were analyzed and a compound with slightly improved properties, namely FMP-401319-3, was found. Using this substance, in the cell-free transcription/ translation/ translocation assay and protease protection experiments, it was finally determined at which stage of the Sec61 translocon pathway the compound acts. It could be shown that FMP-401319-3 actually blocks the cotranslational translocation of a protein at the level of the Sec61 complex. This occurs after the ribosome has bound to the Sec61 complex, but before the nascent protein chain has reached the ER lumen for signal peptide cleavage. Future studies will have to show where exactly the substance FM-401319-3 binds and exerts its functions at the Sec61 complex.

Anhang

A. 1 Überprüfung der Cotransin-Sensitivität ausgewählter Membranproteine aus der *Proteomics*-Studie mit Hilfe von Immunoblots



Durch die *Proteomics*-Analyse der CT-behandelten HepG2-Zellen (104) konnten zahlreiche CT-sensitive und CT-resistente Proteine identifiziert werden. Von den CT-resistenten und CT-sensitiven sekretorischen und integralen Membranproteinen wurden jeweils zwei Proteine für die Überprüfung ausgewählt. HepG2-Zellen wurden mit CT (19h; 30 μ M) (+) oder DMSO (-) behandelt. Zytosolisch exprimiertes GFP diente nach transienter Transfektion als Negativkontrolle (ganz unten). Sekretorische Proteine wurden im Zellkulturmedium und die Membranproteine in isolierten Gesamtmembranfraktionen mit spezifischen Antikörpern auf Immunoblots detektiert (linke Abbildungen). Eine densitometrische Auswertung der Intensität der immunoreaktiven Proteinbanden ist im rechten Teil gezeigt. Hier stellen die Säulen Mittelwerte aus drei verschiedenen Immunoblots \pm SD dar.

A. 2 Liste der, durch die Datenbanksuche identifizierten GPCR, die das Konsensusmotiv aufweisen

Data screened by: full motif		
Found motif carrying SPs: 119 GPCR-SPs: 5		
P24530	G protein-coupled receptor	Endothelin B receptor
P25101	G protein-coupled receptor	Endothelin A receptor
Q9HBX8	G protein-coupled receptor	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6
P32241	GPCR, family 2	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1
Q14831	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 7

Data screened by: motif right-sided		
Found motif carrying SPs: 328 GPCR-SPs: 11		
P24530	G protein-coupled receptor	Endothelin B receptor
P25101	G protein-coupled receptor	Endothelin A receptor
P25116	G protein-coupled receptor	Proteinase-activated receptor 1
Q9HBX8	G protein-coupled receptor	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6
Q03431	GPCR, family 2	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor
O94910	GPCR, family 2	Latrophilin-1
P32241	GPCR, family 2	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1
P49190	GPCR, family 2	Parathyroid hormone 2 receptor
Q8IZP9	GPCR, family 2	G-protein coupled receptor 64
P41180	GPCR, family 3	Extracellular calcium-sensing receptor
Q14831	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 7

Data screened by: motif left-sided		
Found motif carrying SPs: 413 GPCR-SPs: 11		
P24530	G protein-coupled receptor	Endothelin B receptor
P25101	G protein-coupled receptor	Endothelin A receptor
P55085	G protein-coupled receptor	Proteinase-activated receptor 2
Q9HBX8	G protein-coupled receptor	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6
P32241	GPCR, family 2	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1
P48960	GPCR, family 2	Leukocyte antigen CD97
Q8IZF3	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 115
Q96K78	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 128
Q99NYQ7	GPCR, family 2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
Q9UHX3	GPCR, family 2	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2
Q14831	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 7

Data screened by: motif central part		
Found motif carrying SPs: 413 GPCR-SPs: 11		
Q8WXG9	G protein-coupled receptor	G-protein coupled receptor 98
O00254	G protein-coupled receptor	Proteinase-activated receptor 3
O60883	G protein-coupled receptor	Prosaposin receptor GPR37L 1
P24530	G protein-coupled receptor	Endothelin B receptor
P25101	G protein-coupled receptor	Endothelin-1 receptor
P25116	G protein-coupled receptor	Proteinase-activated receptor 1
P55085	G protein-coupled receptor	Proteinase-activated receptor 2
Q9BXB1	G protein-coupled receptor	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4
Q9HBX8	G protein-coupled receptor	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 6
P43220	GPCR, family 2	Glucagon-like peptide 1 receptor
Q03431	GPCR, family 2	Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor

O14514	GPCR, family 2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
O60241	GPCR, family 2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 2
O94910	GPCR, family 2	Letrophilin-1
P32241	GPCR, family 2	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1
P34998	GPCR, family 2	Corticotropin-releasing factor receptor 1
P48960	GPCR, family 2	Leukocyte antigen CD97
P49190	GPCR, family 2	Parathyroid hormone 2 receptor
Q86SQ4	GPCR, family 2	G-protein coupled receptor 126
Q86Y34	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 97
Q81WK6	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 125
Q8IZF2	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 116
Q8IZF3	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 115
Q8IZF4	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 114
Q8IZF5	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 113
Q8IZP9	GPCR, family 2	G-protein coupled receptor 64
Q96K78	GPCR, family 2	Probable G-protein coupled receptor 128
Q96PE1	GPCR, family 2	G-protein coupled receptor 124
Q9BY15	GPCR, family 2	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 3
Q9HBW9	GPCR, family 2	EGF, letrophilin and seven transmembrane domain-containing protein 1
Q9HCU4	GPCR, family 2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2
Q9NYQ6	GPCR, family 2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
Q9NYQ7	GPCR, family 2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
Q9UHX3	GPCR, family 2	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2
Q9Y653	GPCR, family 2	G-protein coupled receptor 56
P41587	GPCR, family 2	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 2
O00222	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 8
P41180	GPCR, family 3	Extracellular calcium-sensing receptor
Q14831	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 7
Q14833	GPCR, family 3	Metabotropic glutamate receptor 4
Q7RTX0	GPCR, family 3	Taste receptor type 1 member 3
Q8TE23	GPCR, family 3	Taste receptor type 1 member 2
O75899	GPCR, family 3	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2

Liste der GPCR, die in der Datenbankanalyse identifiziert wurden, die das Konsensusmotiv komplett oder in Teilen aufweisen.

Literaturverzeichnis

1. Lithgow T, Waksman G. Seaside transportation--from structure to function of translocation machines. *EMBO reports*. 2013;14(7):585-7.
2. Papanikou E, Karamanou S, Economou A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(11):839-51.
3. Hegde RS, Kang SW. The concept of translocational regulation. *The Journal of cell biology*. 2008;182(2):225-32.
4. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature*. 1992;355(6355):33-45.
5. Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*. 1985;54:631-64.
6. Van den Berg B, Clemons WM, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, et al. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*. 2004;427(6969):36-44.
7. Johnson AE, van Waes MA. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15:799-842.
8. Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P. The signal recognition particle. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:755-75.
9. Park E, Rapoport TA. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys*. 2012;41:21-40.
10. Kocik L, Junne T, Spiess M. Orientation of internal signal-anchor sequences at the Sec61 translocon. *Journal of molecular biology*. 2012;424(5):368-78.
11. Rapoport TA. Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *The FEBS journal*. 2008;275(18):4471-8.
12. Wu W, Suttie JW. N-glycosylation contributes to the intracellular stability of prothrombin precursors in the endoplasmic reticulum. *Thrombosis research*. 1999;96(2):91-8.
13. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. 2002;12(4):43r-56r.
14. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(4):246-55.
15. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(3):181-91.
16. Walter P, Johnson AE. Signal Sequence Recognition and Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Annual Review of Cell Biology*. 1994;10(1):87-119.
17. Hegde RS, Bernstein HD. The surprising complexity of signal sequences. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(10):563-71.
18. Martoglio B. Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides. *Biochemical Society transactions*. 2003;31(Pt 6):1243-7.
19. Harant H, Wolff B, Schreiner EP, Oberhauser B, Hofer L, Lettner N, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor cotranslational translocation by the cyclopeptide CAM741. *Mol Pharmacol*. 2007;71(6):1657-65.
20. Köchl R, Alken M, Rutz C, Krause G, Oksche A, Rosenthal W, et al. The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(18):16131-8.
21. Wallin E, von Heijne G. Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein engineering*. 1995;8(7):693-8.

22. Schulz K, Rutz C, Westendorf C, Ridelis I, Vogelbein S, Furkert J, et al. The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(43):32878-87.
23. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein engineering*. 1997;10(1):1-6.
24. Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein engineering*. 1999;12(1):3-9.
25. von Heijne G. Signal sequences. The limits of variation. *Journal of molecular biology*. 1985;184(1):99-105.
26. von Heijne G. Protein targeting signals. *Current opinion in cell biology*. 1990;2(4):604-8.
27. von Heijne G. The signal peptide. *The Journal of membrane biology*. 1990;115(3):195-201.
28. Martoglio B, Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in cell biology*. 1998;8(10):410-5.
29. High S, Dobberstein B. Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Current opinion in cell biology*. 1992;4(4):581-6.
30. Fons RD, Bogert BA, Hegde RS. Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *The Journal of cell biology*. 2003;160(4):529-39.
31. Nicchitta CV, Blobel G. Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation. *Cell*. 1993;73(5):989-98.
32. Zimmermann R, Eyrich S, Ahmad M, Helms V. Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1808(3):912-24.
33. Krieg UC, Johnson AE, Walter P. Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel. *The Journal of cell biology*. 1989;109(5):2033-43.
34. Hartmann E, Gorlich D, Kostka S, Otto A, Kraft R, Knespel S, et al. A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1993;214(2):375-81.
35. Tai VW, Imperiali B. Substrate specificity of the glycosyl donor for oligosaccharyl transferase. *The Journal of organic chemistry*. 2001;66(19):6217-28.
36. Chen W, Helenius J, Braakman I, Helenius A. Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(14):6229-33.
37. Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*. 1998;92(6):747-58.
38. Dierks T, Volkmer J, Schlenstedt G, Jung C, Sandholzer U, Zachmann K, et al. A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 1996;15(24):6931-42.
39. Brodsky JL, Goeckeler J, Schekman R. BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(21):9643-6.
40. Rensing SA, Maier UG. The SecY protein family: comparative analysis and phylogenetic relationships. *Molecular phylogenetics and evolution*. 1994;3(3):187-91.

41. Hizlan D, Robson A, Whitehouse S, Gold VA, Vonck J, Mills D, et al. Structure of the SecY complex unlocked by a preprotein mimic. *Cell Rep.* 2012;1(1):21-8.
42. Esnault Y, Feldheim D, Blondel MO, Schekman R, Kepes F. SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269(44):27478-85.
43. Kalies KU, Rapoport TA, Hartmann E. The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *The Journal of cell biology.* 1998;141(4):887-94.
44. Denks K, Vogt A, Sachelaru I, Petriman NA, Kudva R, Koch HG. The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Molecular membrane biology.* 2014;31(2-3):58-84.
45. Collinson I, Corey RA, Allen WJ. Channel crossing: how are proteins shipped across the bacterial plasma membrane? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2015;370(1679).
46. Albers S-V, Szabó Z, Driessen AJM. Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature reviews Microbiology.* 2006;4(7):537-47.
47. Mackinnon AL, Paavilainen VO, Sharma A, Hegde RS, Taunton J. An allosteric Sec61 inhibitor traps nascent transmembrane helices at the lateral gate. *Elife.* 2014;3:e01483.
48. Rapoport TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 2007;450(7170):663-9.
49. Egea PF, Stroud RM. Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(40):17182-7.
50. Gumbart J, Schulten K. The roles of pore ring and plug in the SecY protein-conducting channel. *The Journal of general physiology.* 2008;132(6):709-19.
51. Junne T, Schwede T, Goder V, Spiess M. The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. *Molecular biology of the cell.* 2006;17(9):4063-8.
52. Eglen RM, Bosse R, Reisine T. Emerging concepts of guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor (GPCR) function and implications for high throughput screening. *Assay and drug development technologies.* 2007;5(3):425-51.
53. Rutz C, Klein W, Schulein R. N-Terminal Signal Peptides of G Protein-Coupled Receptors: Significance for Receptor Biosynthesis, Trafficking, and Signal Transduction. *Progress in molecular biology and translational science.* 2015;132:267-87.
54. Deshaies RJ, Schekman R. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology.* 1987;105(2):633-45.
55. Madas A, Gotthardt K, Awe K, Stieler J, Doring T, Fuser S, et al. Role of human sec63 in modulating the steady-state levels of multi-spanning membrane proteins. *PloS one.* 2012;7(11):e49243.
56. Wittke S, Dunnwald M, Johnsson N. Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Molecular biology of the cell.* 2000;11(11):3859-71.
57. Young BP, Craven RA, Reid PJ, Willer M, Stirling CJ. Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *The EMBO journal.* 2001;20(1-2):262-71.

58. Lang S, Benedix J, Fedeles SV, Schorr S, Schirra C, Schauble N, et al. Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Journal of cell science*. 2012;125(Pt 8):1958-69.
59. Tyedmers J, Lerner M, Wiedmann M, Volkmer J, Zimmermann R. Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO reports*. 2003;4(5):505-10.
60. Schauble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan O, et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *The EMBO journal*. 2012;31(15):3282-96.
61. Lyman SK, Schekman R. Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*. 1997;88(1):85-96.
62. Lyman SK, Schekman R. Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 1995;131(5):1163-71.
63. Zhou Y, Xue S, Yang JJ. Calciomics: integrative studies of Ca²⁺-binding proteins and their interactomes in biological systems. *Metallomics : integrated biometal science*. 2013;5(1):29-42.
64. Erdmann F, Schauble N, Lang S, Jung M, Honigmann A, Ahmad M, et al. Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 2011;30(1):17-31.
65. Görlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA. A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*. 1992;357(6373):47-52.
66. Görlich D, Rapoport TA. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*. 1993;75(4):615-30.
67. Liao S, Lin J, Do H, Johnson AE. Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell*. 1997;90(1):31-41.
68. Shao S, Hegde RS. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell and developmental biology*. 2011;27:25-56.
69. Heinrich SU, Mothes W, Brunner J, Rapoport TA. The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell*. 2000;102(2):233-44.
70. Potter MD, Nicchitta CV. Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(26):23314-20.
71. Sommer N, Junne T, Kalies K-U, Spiess M, Hartmann E. TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(12):3104-11.
72. Harada Y, Li H, Li H, Lennarz WJ. Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(17):6945-9.
73. Karaoglu D, Kelleher DJ, Gilmore R. The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(51):32513-20.
74. Pfeffer S, Dudek J, Gogala M, Schorr S, Linxweiler J, Lang S, et al. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nature communications*. 2014;5:3072.

75. Shibatani T, David LL, McCormack AL, Frueh K, Skach WR. Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry*. 2005;44(16):5982-92.
76. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(2):74-82.
77. Boisrame A, Chasles M, Babour A, Beckerich JM, Gaillardin C. Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 24):4947-56.
78. Lakkaraju AK, Abrami L, Lemmin T, Blaskovic S, Kunz B, Kihara A, et al. Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex. *The EMBO journal*. 2012;31(7):1823-35.
79. Austen BM, Hermon-Taylor J, Kaderbhai MA, Ridd DH. Design and synthesis of a consensus signal sequence that inhibits protein translocation into rough microsomal vesicles. *Biochem J*. 1984;224(1):317-25.
80. Erdmann F, Jung M, Eyrisch S, Lang S, Helms V, Wagner R, et al. Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity. *FEBS letters*. 2009;583(14):2359-64.
81. Kalies KU, Romisch K. Inhibitors of Protein Translocation Across the ER Membrane. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2015;16(10):1027-38.
82. Hall BS, Hill K, McKenna M, Ogbechi J, High S, Willis AE, et al. The pathogenic mechanism of the *Mycobacterium ulcerans* virulence factor, mycolactone, depends on blockade of protein translocation into the ER. *PLoS pathogens*. 2014;10(4):e1004061.
83. McKenna M, Simmonds RE, High S. Mechanistic insights into the inhibition of Sec61-dependent co- and post-translational translocation by mycolactone. *Journal of cell science*. 2016;129(7):1404-15.
84. Baron L, Paatero AO, Morel JD, Impens F, Guenin-Mace L, Saint-Auret S, et al. Mycolactone subverts immunity by selectively blocking the Sec61 translocon. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(13):2885-96.
85. Cross BC, McKibbin C, Callan AC, Roboti P, Piacenti M, Rabu C, et al. Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 23):4393-400.
86. Wang Q, Li L, Ye Y. Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(12):7445-54.
87. Vermeire K, Bell TW, Van Puyenbroeck V, Giraut A, Noppen S, Liekens S, et al. Signal peptide-binding drug as a selective inhibitor of co-translational protein translocation. *PLoS biology*. 2014;12(12):e1002011.
88. Vermeire K, Zhang Y, Princen K, Hatse S, Samala MF, Dey K, et al. CADA inhibits human immunodeficiency virus and human herpesvirus 7 replication by down-modulation of the cellular CD4 receptor. *Virology*. 2002;302(2):342-53.
89. Vermeire K, Princen K, Hatse S, De Clercq E, Dey K, Bell TW, et al. CADA, a novel CD4-targeted HIV inhibitor, is synergistic with various anti-HIV drugs in vitro. *AIDS (London, England)*. 2004;18(16):2115-25.
90. Demillo VG, Goulinet-Mateo F, Kim J, Schols D, Vermeire K, Bell TW. Unsymmetrical cyclotriazadisulfonamide (CADA) compounds as human CD4 receptor down-modulating agents. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(16):5712-21.
91. Foster CA, Dreyfuss M, Mandak B, Meingassner JG, Naegeli HU, Nussbaumer A, et al. Pharmacological modulation of endothelial cell-associated adhesion molecule expression: implications for future treatment of dermatological diseases. *J Dermatol*. 1994;21(11):847-54.

92. Garrison JL, Kunkel EJ, Hegde RS, Taunton J. A substrate-specific inhibitor of protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2005;436(7048):285-9.
93. Schreiner EP, Oberhauser B, Foster CA. Inhibitors of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2003;13(2):149-66.
94. Stawikowski M, Cudic P. Depsipeptide synthesis. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2007;386:321-39.
95. Sarabia F, Chamma S, Ruiz AS, Ortiz LM, Herrera FJ. Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. *Current medicinal chemistry*. 2004;11(10):1309-32.
96. Xu WY, Zhao SM, Zeng GZ, He WJ, Xu HM, Tan NH. [Progress in the study of some important natural bioactive cyclopeptides]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*. 2012;47(3):271-9.
97. Tsukimoto M, Nagaoka M, Shishido Y, Fujimoto J, Nishisaka F, Matsumoto S, et al. Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B. *Journal of natural products*. 2011;74(11):2329-31.
98. Zhou X, Liu J, Yang B, Lin X, Yang XW, Liu Y. Marine natural products with anti-HIV activities in the last decade. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(7):953-73.
99. Andavan GS, Lemmens-Gruber R. Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research. *Marine drugs*. 2010;8(3):810-34.
100. Chen Y, Bilban M, Foster CA, Boger DL. Solution-phase parallel synthesis of a pharmacophore library of HUN-7293 analogues: a general chemical mutagenesis approach to defining structure-function properties of naturally occurring cyclic (depsi)peptides. *J Am Chem Soc*. 2002;124(19):5431-40.
101. Winiski AP, Foster CA. ICAM-1 expression in a spontaneously transformed human keratinocyte cell line: characterization by a simple cell-ELISA assay. *The Journal of investigative dermatology*. 1992;99(1):48-52.
102. Boger DL, Keim H, Oberhauser B, Schreiner EP, Foster CA. Total Synthesis of HUN-7293. *Journal of the American Chemical Society*. 1999;121(26):6197-205.
103. Besemer J, Harant H, Wang S, Oberhauser B, Marquardt K, Foster CA, et al. Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature*. 2005;436(7048):290-3.
104. Westendorf C, Schmidt A, Coin I, Furkert J, Ridelis I, Zampatis D, et al. Inhibition of biosynthesis of human endothelin B receptor by the cyclodepsipeptide cotransin. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(41):35588-600.
105. Maifeld SV, MacKinnon AL, Garrison JL, Sharma A, Kunkel EJ, Hegde RS, et al. Secretory protein profiling reveals TNF-alpha inactivation by selective and promiscuous Sec61 modulators. *Chem Biol*. 2011;18(9):1082-8.
106. Besemer J, Harant H, Wang S, Oberhauser B, Marquardt K, Foster CA, et al. Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature*. 2005;436(7048):290-3.
107. Harant H, Lettner N, Hofer L, Oberhauser B, de Vries JE, Lindley IJ. The translocation inhibitor CAM741 interferes with vascular cell adhesion molecule 1 signal peptide insertion at the translocon. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(41):30492-502.
108. Coin I, Beerbaum M, Schmieder P, Bienert M, Beyermann M. Solid-phase synthesis of a cyclodepsipeptide: cotransin. *Org Lett*. 2008;10(17):3857-60.
109. Ruiz-Saenz A, Sandhu M, Carrasco Y, Maglathlin RL, Taunton J, Moasser MM. Targeting HER3 by interfering with its Sec61-mediated cotranslational insertion into the endoplasmic reticulum. *Oncogene*. 2015;34(41):5288-94.

110. Klein W, Westendorf C, Schmidt A, Conill-Cortes M, Rutz C, Blohs M, et al. Defining a conformational consensus motif in cotransin-sensitive signal sequences: a proteomic and site-directed mutagenesis study. *PLoS one*. 2015;10(3):e0120886.
111. Alken M, Rutz C, Köchl R, Donalies U, Oueslati M, Furkert J, et al. The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *Biochem J*. 2005;390(Pt 2):455-64.
112. Rutz C, Renner A, Alken M, Schulz K, Beyermann M, Wiesner B, et al. The corticotropin-releasing factor receptor type 2a contains an N-terminal pseudo signal peptide. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(34):24910-21.
113. Zampatis DE, Rutz C, Furkert J, Schmidt A, Wüstenhagen D, Kubick S, et al. The protease-activated receptor 1 possesses a functional and cleavable signal peptide which is necessary for receptor expression. *FEBS Lett*. 2012;586(16):2351-9.
114. Lisurek M, Rupp B, Wichard J, Neuenschwander M, von Kries JP, Frank R, et al. Design of chemical libraries with potentially bioactive molecules applying a maximum common substructure concept. *Molecular diversity*. 2010;14(2):401-8.
115. Brideau C, Gunter B, Pikounis B, Liaw A. Improved statistical methods for hit selection in high-throughput screening. *Journal of biomolecular screening*. 2003;8(6):634-47.
116. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67-73.
117. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One*. 2015;10(12):e0146021.
118. Mehta CR, Patel NR. ALGORITHM 643: FEXACT: a FORTRAN subroutine for Fisher's exact test on unordered *r* × *c* contingency tables. *ACM Trans Math Softw*. 1986;12(2):154-61.
119. Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000;16(6):276-7.
120. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*. 2004;340(4):783-95.
121. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8(10):785-6.
122. Schulein R, Zuhlke K, Krause G, Rosenthal W. Functional rescue of the nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutants G185C and R202C by a second site suppressor mutation. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(11):8384-92.
123. Audigier Y, Friedlander M, Blobel G. Multiple topogenic sequences in bovine opsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(16):5783-7.
124. Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(19):10418-23.
125. Alken M, Rutz C, Köchl R, Donalies U, Oueslati M, Furkert J, et al. The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *The Biochemical journal*. 2005;390(Pt 2):455-64.
126. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*. 2001;46(1-3):3-26.

127. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of combinatorial chemistry*. 1999;1(1):55-68.
128. Alken M, Schmidt A, Rutz C, Furkert J, Kleinau G, Rosenthal W, et al. The sequence after the signal peptide of the G protein-coupled endothelin B receptor is required for efficient translocon gating at the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Pharmacol*. 2009;75(4):801-11.

Eigene Publikationen

Im Verlauf dieser Arbeit entstanden:

Klein W, Rutz C, Eckhard J, Provinciael B, Specker E, Neuenschwander M, Kleinau G, Scheerer P, von Kries JP, Nazaré M, Vermeire K, Schüle R. Identification of novel inhibitors for the eucaryotic Sec translocon pathway using a sequential high throughput screening assay. Submitted.

Klein W, Westendorf C, Schmidt A, Conill-Cortes M, Rutz C, Blohs M, et al. Defining a conformational consensus motif in cotransin-sensitive signal sequences: a proteomic and site-directed mutagenesis study. *PLoS one*. 2015;10(3):e0120886.

Rutz C, Klein W, Schüle R. N-Terminal Signal Peptides of G Protein-Coupled Receptors: Significance for Receptor Biosynthesis, Trafficking, and Signal Transduction. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015;132:267-87.

Im Verlauf der Masterarbeit entstanden:

Vogt E, Sanhaji M, Klein W, Seidel T, Wordeman L, and Eichenlaub-Ritter U. MCAK is present at centromeres, midspindle and chiasmata and involved in silencing of the spindle assembly checkpoint in mammalian oocytes. 2010; 16(9): 665-684.

Danksagung

Ich möchte allen danken, an die ich denken muss, wenn ich mich an die Zeit meiner Doktorarbeit erinnere. Ohne euch hätte das hier niemals entstehen können.

Ich danke euch, für eine Umgebung, in der wirklich freie Grundlagenforschung betrieben wurde und alles, was man machen wollte, möglich zu sein schien. Für die Möglichkeit eigenen Ideen zu folgen und sich ausprobieren zu dürfen. Für das intensive Diskutieren und Auseinandersetzen mit meinen Theorien und Gedanken. Für die Geduld und Unterstützung, die Hilfestellungen und Denkanstöße, den guten Willen und all die kleinen und großen Freundlichkeiten. Und vor allen Dingen für die vielen Freiheiten.

Ich danke euch dafür, dass Ihr mir viele sehr schöne Momente und Begegnungen mitgegeben habt und ich meine Doktorarbeit als eine tolle Zeit in Erinnerung behalten werde. Ich bedanke mich auch, für die Unterstützung an den schweren Tagen und dass Ihr dafür gesorgt habt, dass es immer weiter ging.

DANKE

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst, die benutzte Literatur sowie Hilfsmittel vollständig erwähnt habe und sie weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt wurde. Diese Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Sofern fremde Abbildungen zur Illustration verwendet wurden, ist dies als Quelle und im Literaturverzeichnis angegeben.

Köln, den 25.02.2018

Wolfgang Klein