

# Die Protein-Monoaminylierung als regulatorischer Mechanismus in der Signaltransduktion

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
**Diplom-Biochemiker Jakob Vowinckel**

durchgeführt am  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

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



Dezember 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Constance Scharff
2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Disputation am 22.06.2011

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Die primären biogenen Monoamine</b>	<b>6</b>
1.1	Vorkommen und Entdeckung primärer biogener Monoamine	6
1.2	Biosynthese und Abbau biogener Monoamine	7
1.3	Die intrazelluläre Lokalisation von Monoaminen	11
1.4	Wirkungen biogener Monoamine	13
1.5	Monoamin-Transporter der Plasmamembran	17
1.6	Vesikuläre Monoamin-Transporter und Ausschüttung	19
<b>2</b>	<b>Monomere und heterotrimere GTPasen</b>	<b>20</b>
2.1	Die Funktion von monomeren GTPasen in der Signaltransduktion	20
2.2	Die heterotrimeren GTPasen $G\alpha_o$ und $G\alpha_q$ und ihre Funktionen	22
2.3	Der katalytische Mechanismus der GTP-Hydrolyse	23
<b>3</b>	<b>Transglutaminasen</b>	<b>24</b>
3.1	Die Familie der Transglutaminasen	24
3.2	Die Funktionen der Gewebs-TGM	26
3.3	Die vielfältigen Substrate der TGM	28
<b>4</b>	<b>Die Serotonylierung als Spezialfall der Monoaminylierung</b>	<b>33</b>
4.1	Die Serotonylierung im Zuge der Thrombozytenaggregation	33
4.2	Die Monoaminylierung in glatten Gefäßmuskelzellen	34
4.3	Modulation der Insulinausschüttung durch Serotonylierung	36
4.4	Serotonylierung in differenzierenden Zellen	37
4.5	Extrazelluläre Serotonylierung	37
<b>5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>39</b>
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>Materialien</b>	<b>40</b>
1.1	Chemikalien	40
1.1.1	Chemikalien und Enzyme	40
1.1.2	Antikörper	40
1.1.3	Lösungen, Puffer und Medien	41
1.1.4	Oligonukleotide	41
1.2	Bakterienstämme und Zelllinien	41
<b>2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>42</b>
2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	42
2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA	42
2.1.3	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	42
2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2	Manipulation von Nukleinsäuren	43
2.2.1	Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten	43
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.3	Sicherung von PCR-Produkten	44
2.2.4	Reverse Transkription	44
2.2.5	Sequenzierung von DNA	44
2.3	Arbeiten mit Bakterienkulturen	45
2.3.1	Transformation von Bakterienzellen	45
2.3.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	45

2.3.3	Langzeitlagerung von Bakterien .....	45
<b>3</b>	<b>Klonierungsstrategien</b> .....	<b>46</b>
3.1	pGEX-Expressionskonstrukte.....	46
3.2	pQE-Expressionskonstrukte.....	47
3.3	pTarget-Expressionskonstrukte.....	48
3.4	pEGFP-Expressionskonstrukte.....	48
<b>4</b>	<b>Zellkulturen</b> .....	<b>49</b>
4.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	49
4.2	Differenzierung von 3T3-L1-Fibroblasten.....	50
4.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen .....	50
4.4	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	51
4.5	Monoaminylierungsexperimente in eukaryotischen Zellen .....	51
<b>5</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>51</b>
5.1	Isolierung und Analyse von Proteinen.....	51
5.1.1	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	51
5.1.2	Expression und Aufreinigung von 6xHis-Fusionsproteinen .....	52
5.1.3	Herstellung von Zellextrakten .....	53
5.1.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	53
5.1.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
5.1.6	Coomassie- und Silberfärbung.....	54
5.1.7	Immunoblotting .....	54
5.2	Immunochemische Methoden .....	55
5.2.1	Immunopräzipitation und GFP-Affinitätsaufreinigung.....	55
5.2.2	Herstellung von Antiseren gegen monoaminylierte Proteine .....	55
5.3	TGM-vermittelte Transamidierung .....	56
5.3.1	In vitro-Monoaminylierung.....	56
5.3.2	Quantifizierung von radioaktiv markierten Proteinen durch Fällung.....	56
5.3.3	Quantifizierung von [ <sup>3</sup> H]-markierten Proteinen durch Membrantransfer.....	57
5.3.4	Detektion von Biotin-markierten Proteinen.....	57
5.3.5	Visualisierung von Fluoreszenz-markierten Proteinen .....	57
5.3.6	Autoradiographie .....	58
5.4	Enzymbiochemische Methoden.....	58
5.4.1	GTP-Hydrolyse.....	58
5.4.2	Aktivitätsbestimmung von GTPasen.....	58
5.4.3	Experimente zur Aktivität von PLA <sub>2</sub> .....	59
5.4.4	Experimente zur Kinetik von TGM2.....	60
5.4.5	Synthese von DA-biotin .....	61
5.4.6	Identifizierung von monoaminylierten Proteinen mittels Massenspektrometrie...61	
5.4.7	MS-Untersuchung des katalytischen Zentrums von GTPasen.....	62
<b>6</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>63</b>
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
<b>1</b>	<b>Signalproteine als Substrate für die Monoaminylierung</b> .....	<b>64</b>
1.1	GTPasen werden <i>in vitro</i> durch TGM mit Monoaminen modifiziert.....	64
1.2	Die Aktivität von Cdc42 und Gα <sub>o1</sub> wird durch Histaminylierung reguliert.....	66
1.3	Die Histaminylierung von PLA <sub>2</sub> als Hydrolyse-aktivierende Modifikation .....	69
<b>2</b>	<b>Die Kinetik der Transamidierung mit Monoaminen</b> .....	<b>70</b>
2.1	Histamin ist ein spezifisches Substrat für TGM2 .....	70



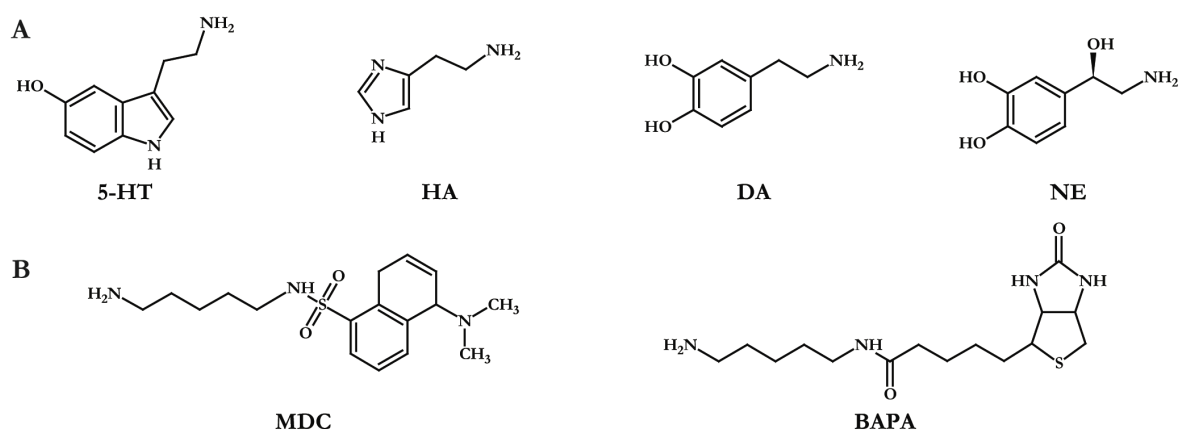
2.2	Die Stöchiometrie der TGM2-vermittelten Monoaminylierung.....	71
2.3	Der katalytische Q-Rest wird in GTPasen spezifisch monoaminyliert.....	72
2.4	Die Inhibition der Monoaminylierung durch MDC .....	75
<b>3</b>	<b>Die Rolle der Monoaminylierung in zellulären Prozessen</b> .....	<b>76</b>
3.1	Monoaminylierung kann in vielen Zelllinien nachgewiesen werden .....	76
3.1.1	Die Expression von TGM und Monoamin-Transportern in Zelllinien.....	76
3.1.2	Zelllinien inkorporieren 5-HT, HA, DA und NE in unterschiedlichen Mengen..	78
3.2	Identifikation von Zielproteinen der Monoaminylierung .....	81
3.2.1	Die Synthese und Charakterisierung von Biotin-modifizierten Monoaminen.....	81
3.2.2	Die Inkorporation von [ <sup>3</sup> H]-DA und DA-biotin in PC12- und 3T3-L1-Zellen....	84
3.2.3	Proteine unterschiedlichster Funktion werden in PC12- und 3T3-L1-Zellen monoaminyliert .....	85
3.2.4	Die Monoaminylierung des Nukleoli-lokaliserten Proteins NPM1 .....	87
3.2.5	Die kleine GTPase Rab1b wird in 3T3-L1-Zellen monoaminyliert .....	88
3.2.6	Die Proteine AnxA2, $\alpha$ -Enolase und PAI1BP .....	88
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
<b>1</b>	<b>Biogene Monoamine als Amin-Substrate von TGM</b> .....	<b>90</b>
1.1	HA, DA, NE und 5-HT sind Substrate für die TGM-vermittelte Transamidierung ...	90
1.2	Die spezifische Protein-Histaminierung durch TGM2 .....	92
1.3	Die Wirkung kompetitiver Inhibitoren auf die Monoaminylierung .....	96
<b>2</b>	<b>Zielproteine der TGM-vermittelten Monoaminylierung</b> .....	<b>98</b>
2.1	Die Monoaminylierung kleiner GTPasen.....	98
2.1.1	Rho-GTPasen werden durch Monoaminylierung reguliert.....	98
2.1.2	Rab-, Ras- und Arf-GTPasen sind Substratproteine für TGM-vermittelte Monoaminylierung.....	99
2.2	Heterotrimere GTPasen werden durch Monoaminylierung reguliert.....	101
2.3	Die Monoaminylierung der Signalproteine PLA <sub>2</sub> , AnxA2 und NPM1.....	102
<b>3</b>	<b>Die potenzielle physiologische Rolle der Monoaminylierung</b> .....	<b>105</b>
3.1	Unterschiedliche Zelllinien zeigen eine TGM-abhängige Monoamininkorporation .	105
3.2	Die Identifizierung endogen monoaminylierter Proteine .....	108
3.3	Ausblick auf durch Monoaminylierung modulierte Signalwege.....	113
3.3.1	Histaminierung: Regulation von GTPasen und PLA <sub>2</sub> .....	113
3.3.2	Dopaminierung: Neurodegenerative Erkrankungen, Vesikelausschüttung und Strukturproteine.....	114
3.3.3	Norepinephrinierung: Lymphozyten und Transferasen .....	116
<b>V</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>118</b>
<b>VI</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>135</b>
A	Oligonukleotide .....	135
B	<i>In vitro</i> -Monoaminylierung von kleinen und heterotrimeren GTPasen .....	138
C	Identifizierung von monoaminylierten Proteinen .....	139
D	Zusammenfassung .....	142
E	Danksagung .....	144
F	Lebenslauf .....	145
G	Publikationen .....	146
H	Selbständigkeitserklärung .....	147
I	Abkürzungen .....	148

# I EINLEITUNG

## 1 Die primären biogenen Monoamine

### 1.1 Vorkommen und Entdeckung primärer biogener Monoamine

Als biogene Amine werden Substanzen bezeichnet, die im Metabolismus der Zelle vor allem durch enzymatische Decarboxylierung von Aminosäuren (AS) entstehen und mindestens eine primäre Aminogruppe enthalten. Sie wirken im Tier- und Pflanzenreich einerseits als wichtige Vorstufe beispielsweise bei der Synthese von Kofaktoren. So wird z.B. Asparaginsäure zu  $\beta$ -Alanin decarboxyliert, das als Bestandteil von Pantothensäure essenziell für die Coenzym-A-Synthese ist. Andererseits entfalten biogene Amine selbst biologische Wirkungen, z.B. als Gewebshormone und Neurotransmitter. Die monoaminergen Neurotransmitter werden in fünf Klassen eingeteilt: Histamin (HA), die Catecholamine Dopamin (DA), Norepinephrin (NE) und Epinephrin, die Tryptamine Serotonin (5-HT) und Melatonin, die von Thyroidhormonen abgeleiteten Thyronamine und die Gruppe der Spurenamine (u.a.  $\beta$ -Phenylethylamin, Tyramin, Tryptamin, Octopamin und 3-Iodothyramin). Da sowohl Rezeptoren als auch Synthesewege vieler Monoamin-Neurotransmitter eine hohe Homologie aufweisen, geht man von einer evolutionären Verwandtschaft der unterschiedlichen Systeme aus.



**Abbildung 1: Biogene und synthetische Monoamine.** (A) Die biogenen Monoamine 5-HT, DA, HA und NE sind sowohl Neurotransmitter als auch Hormone und besitzen eine gemeinsame Ethylamin-Seitengruppe, die diese Substanzen zu Substraten für Transglutaminase-vermittelte Transamidierung macht. (B) Synthetische Monoamine wie das fluoreszente Cadaverin-Derivat Monodansylcadaverin (MDC) und das Biotin-gekoppelte 5-(Biotinamido)-pentylamin (BAPA) sind Substrate und kompetitive Inhibitoren für Transamidierungen.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind die vier biogenen Monoamine 5-HT, HA, DA und NE (siehe Abbildung 1 A), die sowohl als Neurotransmitter wie als Gewebshormon wirken können.

5-HT, dessen Trivialname sich auf seine zunächst entdeckte Wirkung als im Blutserum befindlicher Regulator des Tonus bezieht [1], wirkt dabei im zentralen Nervensystem (ZNS) als Neurotransmitter z.B. bei der Regulation von Stimmungen, Schlaf und Nahrungsaufnahme und in der Peripherie unter anderem bei der primären Hämostase.

HA wurde zunächst als Bestandteil des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* entdeckt [2] und kurze Zeit später auch in Mammalia gefunden [3]. Das Monoamin wirkt im menschlichen Körper vor allem bei der Immunantwort, aber auch als Entzündungsmediator und im ZNS als Neurotransmitter.

Das Catecholamin DA wurde zuerst von BARGER beschrieben [2] und zunächst als lediglich Vorstufe in der Biosynthese von NE betrachtet. Später wurde klar, dass DA selbst ein potenter Neurotransmitter ist [4]. Die Substanz wird im Gehirn u.a. in der Substantia nigra und dem ventralen Tegmentum (VTA) gebildet und ist an vielen physiologischen Prozessen wie Lernen und Motivation, Kognition und Schlaf beteiligt. Außerdem reguliert DA in peripheren Geweben die Produktion des Peptidhormons Prolactin.

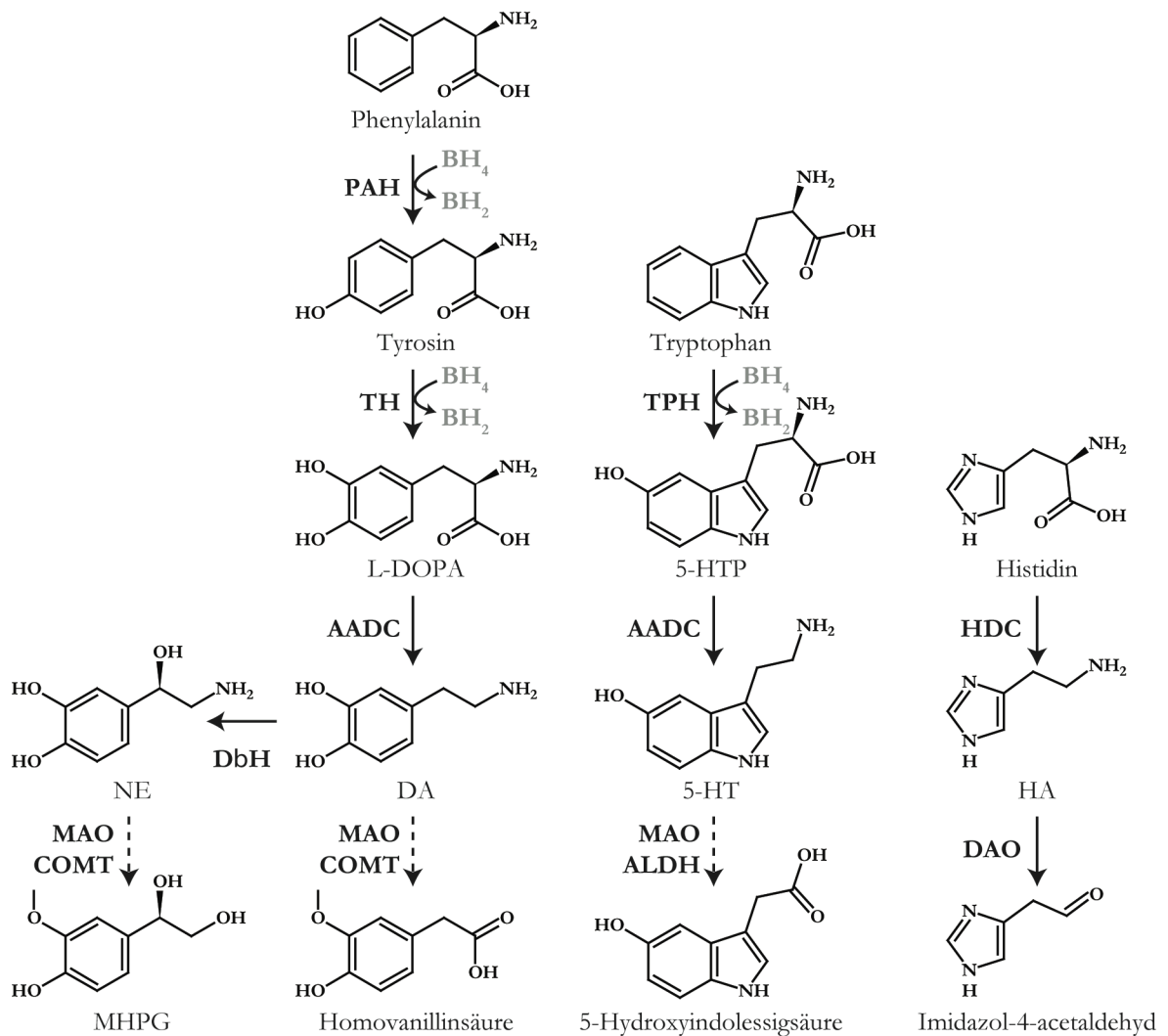
NE, das durch Hydroxylierung von DA entsteht, wurde 1949 erstmals als Neurotransmitter beschrieben [5]. Es wird vor allem als Mediator der Stressantwort betrachtet, da eine stressbedingte Aktivierung des Locus caeruleus im Hirnstamm, der besonders viel NE enthält, in erhöhter Aufmerksamkeit und allgemeiner Erregung resultiert. In peripheren Geweben erfolgt die NE-Synthese hauptsächlich in den Nebennieren, die das Hormon im Zuge z.B. des Fluchtreflexes ins Blut abgeben. Dort bewirkt es eine Erhöhung des Blutdrucks durch Bindung an  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren.

Gemeinsam ist den vier in dieser Arbeit untersuchten Monoaminen die Ethylamin-Seitengruppe, die im Fall von NE hydroxyliert vorliegt. Diese chemische Ähnlichkeit macht die Substanzen zu potenziellen Substraten der Transamidierung (siehe Abschnitt 3.3). In diesem Kontext sind abschließend die beiden in Abbildung 1 B dargestellten synthetischen Amine Monodansylcadaverin (MDC) und 5-(Biotinamido)-Pentylamin (BAPA) zu erwähnen, die als Derivate des natürlich vorkommenden Diamins Cadaverin ebenfalls solche Substrate sind. Cadaverin entsteht bei Verwesungsprozessen tierischen Gewebes durch Decarboxylierung von Lysin und erfüllt in Pflanzen die Funktion eines Wachstumshormons [6].

## 1.2 Biosynthese und Abbau biogener Monoamine

Die Synthese der Monoamin-Neurotransmitter erfolgt wie oben erwähnt ausgehend von aromatischen AS durch Hydroxylierung und anschließende Decarboxylierung. Die zur Superfamilie der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen gehörenden Enzyme Phenylalanin-

Hydroxylase (PAH), Tyrosin-Hydroxylase (TH) und Tryptophan-Hydroxylase (TPH) sind dabei für den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt verantwortlich. Die schnelle Decarboxylierung des Zwischenprodukts zum Monoamin erfolgt dann durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) oder die Histidin-Decarboxylase (HDC), die strukturell mit der Glutamat-Decarboxylase verwandt sind. Im Folgenden soll auf Synthese und Abbau der Monoamine einzeln eingegangen werden.



**Abbildung 2: Synthese und Katabolismus der Monoamin-Neurotransmitter.** Erläuterungen im Text. PAH, Phenylalanin-Hydroxylase; TH, Tyrosin-Hydroxylase; TPH, Tryptophan-Hydroxylase; AADC, Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase; HDC, Histidin-Decarboxylase; MAO, Monoamin-Oxidase; COMT, Catechol-O-Methyltransferase; ALDH, Aldehyd-Dehydrogenase; DAO, Diamin-Oxidase; L-DOPA, L-Dihydroxyphenylalanin; MHPG, 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol. Modifiziert nach [7].

Vor allem in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes, der Zirbeldrüse und den Raphe-Kernen des Hirnstamms wird 5-HT synthetisiert und gespeichert. Dabei wird zunächst die essenzielle AS L-Tryptophan durch TPH unter Verbrauch von Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) und Sauerstoff zu 5-Hydroxy-tryptophan (5-HTP) umgesetzt. Dieses wird dann durch die Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige AADC zu 5-HT decarboxyliert (siehe

Abbildung 2). Die 5-HT-Synthese als Teil des Tryptophan-Stoffwechsels ist stark reguliert und interagiert mit anderen Synthesewegen. So wird beispielsweise aus 5-HT in der Epiphyse und der Retina Melatonin gebildet, indem das Monoamin zunächst durch die Serotonin-N-Acetyltransferase an der Aminogruppe acetyliert und dann durch die N-Acetylserotonin-O-Methyltransferase zu Melatonin umgesetzt wird [8]. Tryptophan kann auch durch die AADC decarboxyliert werden, wobei das Spurenamin Tryptamin entsteht. Dieses wiederum ist Ausgangsstoff für die Synthese vielfältiger Naturstoffe vor allem in Pflanzen. Amphetamine wie Dimethyl-Tryptamin (DMT) oder Psychostimulantien wie Bufotenin und Psilocin beispielsweise sind natürliche Tryptamin-Derivate. Tryptamin selbst kann zudem, vermutlich durch Bindung an eine kürzlich entdeckte Gruppe von Spurenamin-Rezeptoren, als Neuromodulator wirken [9]. Über Indolacetaldehyd und Indolelessigsäure wird Trp außerdem zu Skatol und Indol verstoffwechselt. Wichtiger allerdings ist der Abbau der AS über den Kynureninweg, der über 95 % des Trp verbraucht [10]. 5-HT wird hauptsächlich durch Oxidation zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd (5-HIAL) und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) mit Hilfe der Enzyme Monoamin-Oxidase (MAO) A und B und Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) abgebaut. 5-HIAA wird schließlich über die Nieren ausgeschieden, und die Urinkonzentrationen des Metaboliten werden häufig zur Bestimmung der 5-HT-Konzentrationen im Körper herangezogen.

HA wird im Golgi-Apparat von Mastzellen und basophilen Granulozyten, aber auch im ZNS im Tuber cinereum des Hypothalamus gebildet und gespeichert. Des Weiteren wird das Monoamin von Mikroorganismen synthetisiert und findet sich daher z.B. in reifem Käse oder verdorbenem Fisch in Konzentrationen von bis zu 50 mM [11]. Ausgehend von der AS Histidin wird mittels oxidativer Decarboxylierung durch die Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige HDC HA gebildet. Das Enzym ist im Tierreich hoch konserviert und wird durch vielfältige Mechanismen reguliert, z.B. durch schnellen Abbau beim Erreichen einer Schwellenkonzentration. Dennoch ist die limitierende Komponente der HA-Synthese die Verfügbarkeit von Histidin [12].

Die Inaktivierung des Monoamins erfolgt entweder durch Wirkung der Histamin-N-Methyltransferase, die den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin auf die sekundäre Aminogruppe des Imidazolrings unter Bildung von N-Methylhistamin katalysiert. Das Produkt wird dann zunächst durch MAO oder DAO und abschließend durch ALDH zu 1,4-Methylimidazol-essigsäure oxidiert und ausgeschieden. Alternativ kann HA durch DAO oxidativ deaminiert werden, was in der Bildung von Imidazol-4-acetaldehyd resultiert (siehe Abbildung 2). Das Enzym, das auch andere Diamine wie Putrescin und Cadaverin deaminiert, liegt hauptsächlich in Epithelzellen des Darms vor und kann nach Stimulation z.B. mit

Heparin ausgeschüttet werden [13]. Dieser Umstand illustriert die wichtige Bedeutung der Eliminierung von mit der Nahrung aufgenommenem HA. Abschließend erfolgt durch ALDH eine schnelle Konversion zu Imidazol-4-essigsäure, die im ZNS als Neuromodulator fungiert [14]. So ist der Metabolit ein potenter Agonist von  $\gamma$ -Aminobuttersäure-A ( $\text{GABA}_A$ )-Rezeptoren oder kann, nach Konversion zu Imidazol-4-essigsäure-ribose, putative Imidazol-Rezeptoren aktivieren [15]. Ob HA durch Methylierung oder Oxidation inaktiviert wird, hängt im Wesentlichen vom Gewebe ab. Im ZNS z.B. wird HA praktisch ausschließlich methyliert [16].

Zur Synthese der Catecholamine wird die essenzielle AS Phenylalanin zunächst in der Leber durch die PAH, die bei der Phenylketonurie fehlt, zu Tyrosin umgewandelt. Ins Gehirn gelangtes Tyrosin wird von catecholaminergen Neuronen mittels niedrig- und hochaffiner AS-Transporter aufgenommen. Im Zytosol dieser Zellen erfolgt dann die Umwandlung zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) durch das  $\text{BH}_4$ -abhängige Enzym TH, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Catecholamin-Synthese darstellt.

Durch Bindung zweier DA-Moleküle kann das Enzym allosterisch inhibiert und durch Phosphorylierung aktiviert werden [17]. Die anschließende, durch AADC katalysierte Decarboxylierung zu DA erfolgt sehr schnell, so dass nur sehr niedrige L-DOPA-Konzentrationen messbar sind. Im Gegensatz zu DA kann L-DOPA die Blut-Hirn-Schranke passieren, so dass sich die nicht proteinogene AS als Arzneimittel zur Behandlung verschiedener Krankheiten, die auf catecholaminergem Neurotransmission beruhen, eignet.

DA wird im Wesentlichen durch zwei Abbauege degradiert, die je nach Spezies und Zelltyp variieren. Durch MAO-A, die in der äußeren Mitochondrienmembran dopaminaminergem Neuronen lokalisiert ist, wird DA zunächst zum Intermediat 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd deaminiert und dann vor allem durch ALDH zu 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC) oxidiert. DOPAC kann dann von der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu Homovanillinsäure (HVA) methyliert werden, die ausgeschieden wird. Alternativ wird DA vor allem in Gliazellen und postsynaptisch der dopaminergen Neuronen direkt durch COMT zu 3-Methoxytyramin umgesetzt, das dann durch MAO deaminiert und durch ALDH zu HVA oxidiert wird [18].

NE wird im Nebennierenmark und im Locus caeruleus durch Hydroxylierung von DA durch das membrangebundene und Kupfer-abhängige Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase ( $\text{D}\beta\text{H}$ ) synthetisiert (siehe Abbildung 2). Dazu wird DA durch den vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT) in synaptische Vesikel transportiert, zu NE konvertiert und gespeichert. Die beiden Isoformen des VMAT werden differentiell exprimiert: In neuroendokrinen Zellen liegt VMAT1, in Neuronen VMAT2 vor [19]. Abgebaut wird NE hauptsächlich durch MAO-

abhängige Deaminierung zu einem kurzlebigen Aldehyd-Intermediat und weitere Reduktion zu 3,4-Dihydroxyphenylglykol (DHPG) durch eine Aldehydreduktase. Nach einer Methylierung zu 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol (MHPG) durch COMT wird die Substanz in der Leber durch Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und ALDH zu Vanillinmandelsäure (VMA) konvertiert und ausgeschieden [20]. Um neuronale DA- und NE-Konzentrationen zu steigern, kann u.a. pharmakologisch in den Catecholamin-Abbau eingegriffen werden. So werden beispielsweise die unspezifischen COMT- und MAO-Inhibitoren Entacapon bzw. Tranylcypromin zur Therapie der Parkinson'schen Krankheit (PD) eingesetzt.

Ein interessanter Aspekt der gleichzeitigen Wirkung biogener Monoamine als Gewebshormone und Neurotransmitter ergibt sich aus der Existenz der Blut-Hirn-Schranke. Durch die Trennung in ZNS und Peripherie müssen die hydrophilen Monoamine jeweils im Zielkompartiment synthetisiert werden, was zu einer Dualität der Systeme führt. Ausführlich lässt sich dieser Umstand an der Biosynthese von 5-HT illustrieren: Die Zweiteilung des serotonergen Systems in eine periphere und eine zentralnervöse Komponente wird durch die Existenz zweier praktisch ausschließlich peripher bzw. neuronal exprimierter TPH-Isoformen begründet [21]. Die durch Deletionsstudien in Mäusen gefundene neuronale Isoform TPH2 wird vor allem in den serotonergen Raphe-Kernen des Hirnstamms exprimiert und konnte ausserhalb der Blut-Hirn-Schranke bisher nur in sehr geringen Mengen in der Epiphyse [22] und der Retina [23] sowie im enterischen Nervensystem [24] detektiert werden. Die peripher exprimierte Form TPH1 findet sich dagegen hauptsächlich in der Epiphyse und den enterochromaffinen Zellen des Darms. Die besondere Situation des serotonergen Systems erlaubte auch die Generierung von *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die in Bezug auf zentralnervöse 5-HT-abhängige Prozesse nicht beeinträchtigt sind, in peripheren Geweben aber kein 5-HT mehr besitzen.

### 1.3 Die intrazelluläre Lokalisation von Monoaminen

Die klassische Sichtweise zur Wirkung monoaminerger Neurotransmitter geht von einer Bindung an (postsynaptische) ligandengesteuerte Rezeptoren oder Ionenkanäle aus, meistens gefolgt entweder vom direkten Abbau des Monoamins oder dem Rücktransport in die (präsynaptische) ausschüttende Zelle durch spezifische Transportproteine. Dort wird der Transmitter dann schnell in Vesikel verpackt, um für eine erneute Ausschüttung bereitzustehen. Tatsächlich finden sich beispielsweise in den granulären Vesikeln von Thrombozyten sehr hohe 5-HT-Konzentrationen von bis zu 500 mM [25]. Allerdings sind verschiedene Prozesse beschrieben worden, deren Regulation sich nicht mit der klassischen extrazellulären Wirkung von Monoaminen erklären lässt. So ist die 5-HT-induzierte

Hyperplasie von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) auf die Aktivität des 5-HT-Transporters (SERT) und damit auf intrazelluläres 5-HT (5-HT<sub>i</sub>) zurückzuführen [26], ein möglicher Wirkmechanismus wird in Abschnitt 4.2 erläutert. Generell ist der Mechanismus für die mitogene Wirkung von 5-HT auf T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen bisher nicht geklärt [27]. Weiter ist bekannt, dass die Differenzierung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks abhängig von 5-HT<sub>i</sub> ist [28]. In welcher Weise 5-HT<sub>i</sub> diese Prozesse moduliert, ist allerdings unbekannt. Spekuliert wird über zytoplasmatische Rezeptoren, die am glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert sind [29]. Unstrittig ist jedoch, dass nicht unbeträchtliche zytoplasmatische, perinukleäre und auch nukleäre Konzentrationen von 5-HT in vielen Zelltypen zu finden sind [30-33].

Diese Feststellung gilt nicht nur für 5-HT, sondern auch für andere Monoamine. HA wurde z.B. im Nukleus von peritonealen Mastzellen [30] und im Zytosol von Thrombozyten [34] gefunden, für deren Aggregation intrazelluläres HA (HA<sub>i</sub>) unverzichtbar ist [35]. Letzteres gilt ebenso für die Differenzierung dendritischer Zellen, ein Prozess während dessen die HDC-vermittelte HA-Synthese stark ansteigt [36]. Basophile Granulozyten reagieren auf verschiedene Stimuli mit der Akkumulation von HA<sub>i</sub>, was zur Inhibition der Expression von IL-4, IL-6 und HDC führt [37,38]. Unklar ist allerdings weiterhin der genaue Wirkort von HA<sub>i</sub>. Vorgeschlagen wurden intrazelluläre Rezeptoren (H<sub>1C</sub>), die in Mikrosomen möglicherweise zum Teil mit dem Hämprotein Cytochrom P450 identisch sind [39,40]. Weiterhin wurde über eine Beteiligung von HA<sub>i</sub> an der Regulation des Polyamin-Stoffwechsels [41] und des Genexpressions-Profiles von aus dem Knochenmark gewonnenen Mastzellen (BMMC) [42] berichtet.

Was die intrazelluläre Präsenz der Catecholamine betrifft, muss zunächst auf die Rolle von DA bei der Entstehung von PD hingewiesen werden. Diese ist gekennzeichnet durch ein Absterben dopaminerger Neuronen in der *pars compacta* der Substantia nigra im extrapyramidalen motorischen System, welches mittelbar zu den bekannten Symptomen Rigor, Tremor und Hypokinese führt. Als Ursache für dieses Absterben wurde lange ein Überangebot von intrazellulärem DA (DA<sub>i</sub>) betrachtet, auch wenn diese Ansicht zunehmend in Frage gestellt wird [43]. Unbestritten ist jedoch, dass DA aufgrund seiner hohen Reaktivität, die in Gegenwart von Sauerstoff zur Bildung von Chinon- und Aldehydderivaten führt [44], zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und mitochondrialer Dysfunktion beiträgt [45]. DA<sub>i</sub> wurde daher häufig in Bezug auf seine Rolle bei der Ätiologie von PD untersucht. So konnte etwa nach artifizieller Akkumulation von DA<sub>i</sub> in Neuronen des Maudstriatum eine fortschreitende Neurodegeneration beobachtet werden [46], und die Erhöhung von DA<sub>i</sub> durch das Pestizid Rotenon resultiert bei der catecholaminergen



Phäochromozytoma-Zelllinie PC12 in toxischen Effekten [47]. Eine ähnliche Wirkung konnte auch nach Inhibition des VMAT beobachtet werden [48]. Zytosolische DA-Konzentrationen wurden für unterschiedliche Modellsysteme bestimmt [49,50], und auch über eine nukleäre Lokalisation von DA wurde berichtet [51]. Generell geht man unter physiologischen Bedingungen von niedrigen zytosolischen DA-Konzentrationen aus, da das potenziell toxische Monoamin durch vesikuläre Transporter in sekretorische Vesikel (SV) verbracht wird. Als intrazelluläre DA-Bindungsstelle wurde das Protein  $\alpha$ -Synuclein vorgeschlagen: Dieses Transportprotein, das z.B. bei PD in den sogenannten Lewy-Körpern als Hauptkomponente vorliegt, bindet DA und verändert DA-abhängig seine Konformation [52,53]. Für reaktive DA-Chinone wurden zudem eine Vielzahl von Modifikationen beschrieben, so z.B. die kovalente Bindung an Parkin und TPH [54,55]. Daneben gibt es Hinweise für die Bindung von DA an Cytochrom P450 [39]. Ob diese oder andere Proteine allerdings auch im Falle physiologischer DA<sub>i</sub>-Konzentrationen Bindungspartner sind, bleibt ungeklärt.

Da bei PD auch norepinephrinerge Neuronen des Locus caeruleus degenerieren, wird für das ebenfalls reaktive NE ein ähnlicher Mechanismus diskutiert [56]. Allerdings wurde die Existenz von intrazellulärem NE (NE<sub>i</sub>) ausserhalb von SV bisher nur in Einzelfällen beschrieben, so z.B. in Fledermaus-Kardiomyozyten [57] oder im Kontext der nicht-exozytotischen NE-Ausschüttung im ischämischen Herzen [58]. Der größte Teil des NE<sub>i</sub> liegt, soweit bekannt, vesikulär vor. Einzelne Hinweise auf eine zelluläre Funktion zytosolischen NEs finden sich in Berichten über die Bindung an Cytochrom P450 [39] und als Toxine in der Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen [59].

#### 1.4 Wirkungen biogener Monoamine

Die extrazelluläre Wirkung biogener Monoamine wird im Wesentlichen durch ihre Eigenschaft als Liganden spezifischer Rezeptoren und Ionenkanäle vermittelt. Daher soll an dieser Stelle kurz auf diesen Mechanismus eingegangen werden. Für 5-HT sind zur Zeit 14 verschiedene Rezeptortypen bekannt, die in sieben Familien eingeteilt werden: 5-HT<sub>1</sub> bis 5-HT<sub>7</sub> [60]. Bei den Rezeptorklassen 1, 2 sowie 4 – 7 handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) des Rhodopsin-ähnlichen Typs mit heptahelikaler Struktur, beim 5-HT<sub>3</sub> um einen ligandengesteuerten Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanal. Gekoppelt sind die Rezeptoren mit den heterotrimeren G-Proteinen G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>5</sub>), G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> (5-HT<sub>2</sub>) oder G<sub>s</sub> (5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), die jeweils eine Inhibition bzw. Aktivierung der Adenylylzyklase (AC) (G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> bzw. G<sub>s</sub>) oder eine Stimulation der Phospholipase C (PLC) im Fall von G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> bewirkt. Dies wiederum resultiert in der Modulation der Konzentration sekundärer Botenstoffe wie zyklischem

AMP (cAMP), Arachidonsäure, Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) oder intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>) [61]. Die jeweiligen Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinität zu 5-HT bisweilen erheblich, so liegt etwa zwischen der Affinität von 5-HT<sub>1A</sub> (10<sup>-9</sup> M) und 5-HT<sub>2A</sub> (10<sup>-6</sup> M) der Faktor 1000 [62]. Je nach Gewebstyp kann sich auch der schlussendliche Effekt von 5-HT unterscheiden, da beispielsweise die durch cAMP, PKA und nachgeordnete Transkriptionsfaktoren (TFs) modulierte Genexpression gewebspezifisch ist und häufig mehrere Rezeptortypen von einer Zelle gleichzeitig exprimiert werden. Die ohnehin große Komplexität serotonerger Rezeptoren wird durch alternatives Spleißen, posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Glykosylierung sowie Heterodimerisierung weiter vergrößert.

Das serotonerge System stellt damit ein äußerst vielseitiges Transmittersystem dar. Der 5-HT<sub>1A</sub> postsynaptischer hippocampaler Neuronen beispielsweise moduliert die Bildung des expliziten Gedächtnisses [63], während der gleiche Rezeptor in nozizeptiven Neuronen analgetisch wirken kann [64]. Der Blutdruck kann ebenso durch 5-HT<sub>1A</sub> beeinflusst werden [65] wie Appetit [66], Schlaf [67] oder der Gemütszustand [68]. Insbesondere die Regulation der Gefühlslage stellt eine wichtige Aufgabe des serotonergen Systems dar, das daher häufig Ziel von antidepressiv wirkenden Pharmaka ist. Mehrere Wirkstoffklassen erlauben den Eingriff in weite Teile des 5-HT-Kreislaufs: MAO-A-Hemmer vergrößern durch einen verminderten Abbau die verfügbare Gesamtmenge, 5-HT<sub>2A</sub>-Antagonisten modulieren die Signaltransmission und 5-HT-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SRIs), die spezifisch (SSRI) oder promisk auch für NE (SNRI) wirken können, erhöhen die im synaptischen Spalt vorhandene 5-HT-Konzentration.

Für HA sind beim Menschen vier Rezeptoren bekannt, die als H<sub>1</sub> bis H<sub>4</sub> bezeichnet werden. Es handelt sich hierbei ebenfalls um Rhodopsin-ähnliche GPCRs mit sieben Transmembranhelizes, die mit den heterotrimeren G-Proteinen G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> (H<sub>1</sub>), G<sub>s</sub> (H<sub>2</sub>) oder G<sub>i</sub> (H<sub>3</sub> und H<sub>4</sub>) gekoppelt sind [69]. Der H<sub>1</sub>-Rezeptor wird in einer breiten Palette von Geweben exprimiert, so z.B. in der Lunge, in Blutgefäßen, im ZNS und in Lymphozyten. Seine Aktivierung durch den endogenen Liganden HA resultiert in der G<sub>q</sub>-vermittelten Stimulierung von PLC mit daraus folgender Mobilisierung von IP<sub>3</sub> und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Dies wiederum führt zur Erhöhung von Ca<sup>2+</sup>, cAMP oder Stickstoffmonoxid (NO) und z.B. zur Kontraktion glatter Muskeln, Erweiterung von Arteriolen oder Stimulierung afferenter Neuronen. H<sub>1</sub>-vermittelte Aktivierung ist essenziell für proinflammatorische Signalwege und allergische Reaktionen des Typs I, weshalb viele Antagonisten des Rezeptors als sogenannte H<sub>1</sub>-Antihistaminika zur Behandlung allergischer

Beschwerden eingesetzt werden. Im Kortex inhibiert der aktivierte  $H_1$   $K^+$ -Kanäle und depolarisiert so die neuronale Membran [70].

Der  $H_2$ -Rezeptor findet sich in ebenfalls in vielen Gewebetypen wie im Herzen, im Uterus, in den Belegzellen der Magenschleimhaut, in vaskulären SMCs und im ZNS. Eine Stimulierung führt typischer Weise zur  $G_s$ -abhängigen Aktivierung der AC und zur Erhöhung der cAMP-Konzentration, aber auch eine Kopplung mit PLC und daraus folgende  $Ca^{2+}_i$ -Erhöhung ist bekannt. Als wichtigster durch  $H_2$  vermittelter Effekt wird die Stimulation der Magensäuresekretion angesehen, und die Bildung eines Magengeschwürs kann auf übermäßige histaminerge Aktivierung zurückzuführen sein.

Der für das Gehirn wichtigste HA-Rezeptor ist  $H_3$ , der vor allem im ZNS und auch im peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert ist. Dort dient er als Autorezeptor histaminerge Neuronen, der Synthese und Ausschüttung von HA reguliert.  $H_3$  kann über seine Kopplung mit  $G_i/G_o$  die AC inhibieren, die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und Phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) aktivieren,  $Ca^{2+}_i$  mobilisieren, den PI3K/Akt-Signalweg stimulieren oder  $Na^+/H^+$ -Pumpen inhibieren [71]. Das Protein liegt in mehreren Isoformen vor, die Unterschiede in Pharmakologie und Gewebsspezifität aufweisen [72]. Im ZNS ist  $H_3$  vor allem in den Basalganglien, dem Hippocampus, dem Kortex und dem Striatum lokalisiert. Er wird zusammen mit  $H_1$  für die meisten zentralnervösen Effekte von HA verantwortlich gemacht, da er durch seine präsynaptisch modulatorische Funktion viele andere Neurotransmittersysteme mit beeinflusst.

$H_4$ , der zuletzt identifizierte Rezeptortyp, wird hauptsächlich von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, T-Zellen und verschiedenen Knochenmarkszellen exprimiert. Durch Aktivierung von  $G_i/G_o$ , PLC und folgender  $Ca^{2+}_i$ -Erhöhung trägt der Rezeptor zur Chemotaxis von Mastzellen bei [73]. Da der Rezeptor auch in anderen Geweben in sehr niedrigen Konzentrationen gefunden wurde, geht man auch von einer Beteiligung an anderen Prozessen wie Entzündungsmediation und Immunreaktion aus.

Die fünf bekannten DA-Rezeptortypen werden in zwei Subklassen eingeteilt: Die  $D_1$ -ähnliche Familie mit  $D_1$  und  $D_5$  sowie die  $D_2$ -ähnliche Familie mit  $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_4$ . Bei diesen handelt es sich sämtlich um GPCRs der Rhodopsin-ähnlichen Familie, die mit  $G_s$  ( $D_1$  und  $D_5$ ) oder  $G_i$  ( $D_2$  -  $D_4$ ) gekoppelt sind. Dementsprechend bewirkt eine Aktivierung durch Ligandenbindung eine Stimulierung oder Inhibition der AC mit entsprechender Veränderung der zellulären cAMP-Konzentration.

Der  $D_1$ -Rezeptor gilt als der im ZNS am höchsten exprimierte Subtyp, da er sich in allen dopaminergen Hirnarealen wie im Nucleus accumbens, im olfaktorischen Tuberkel, im limbischen System und in der Großhirnrinde nachweisen lässt [74]. Da das dopaminerge

System aufgrund der häufigen Koexpression mehrerer Rezeptorsubtypen komplex ist, ist wenig über die genaue Wirkung der einzelnen Typen bekannt. Anhand der Effekte spezifischer Agonisten kann aber festgestellt werden, dass  $D_1$ -Stimulation im Nucleus accumbens für die Entstehung von Suchterkrankungen mit verantwortlich ist [75]. In der Peripherie ist  $D_1$  u.a. an der Regulation des Blutdrucks und der Nierenfunktion beteiligt.

Der mit  $D_1$  nahe verwandte Rezeptor  $D_5$  ist bisher wenig erforscht. Er zeichnet sich durch eine sehr hohe Affinität zu DA aus und konnte u.a. im Hippocampus und anderen Regionen des limbischen Systems identifiziert werden. Der  $D_2$ -Rezeptor liegt, ebenso wie  $D_1$ , in vielen dopaminergen Arealen wie der Substantia nigra, dem Striatum und der Hypophyse hoch exprimiert vor [76] und kann durch alternatives Spleißen in einer kurzen und einer langen Isoform auftreten. In peripheren Geweben kann  $D_2$  u.a. in Blutgefäßen, in der Lunge und der Niere nachgewiesen werden [77], die experimentelle Inaktivierung des Rezeptors führt im ZNS zu Bewegungsstörungen, Veränderungen des Belohnungssystems und Hypophysenadenomen [78]. Man geht von einer essenziellen Funktion von  $D_2$ -Rezeptoren auf postsynaptischer Ebene und als Autorezeptoren dopaminergener Neuronen aus.

$D_3$ -Expression findet sich im ZNS vorwiegend im dorsalen Striatum, so z.B. im olfaktorischen Tuberkel und im Nucleus accumbens [79].  $D_3$ -spezifische Pharmaka werden zur Behandlung von Schizophrenie, Drogenabhängigkeit und PD eingesetzt, und in Patienten mit PD liegt eine verringerte  $D_3$ -Expression vor [80]. Zudem spricht die Verstärkung der  $D_3$ -Expression nach Kokaingabe für eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Entstehung von Suchterkrankungen [81]. Dies gilt auch für den dritten Rezeptor der  $D_2$ -ähnlichen Familie,  $D_4$ . Er kann u.a. in der Retina, der Großhirnrinde und der Amygdala nachgewiesen werden und wird mit Krankheiten wie Schizophrenie, PD, Ess- und anderen suchartigen Verhaltensstörungen in Verbindung gebracht [82]. Eine Besonderheit dieses Rezeptortyps ist ein in Exon 3 des DRD3-Gens enthaltener hochvariabler Minisatelliten-Abschnitt, der in unterschiedlich langen Allelen vorliegt und möglicherweise mit einer Aufmerksamkeits-/Hyperaktivitätsstörung (ADHD) assoziiert ist [83].

NE wird als Hormon von den Nebennieren, der auch die Zelllinie PC12 entstammt, ins Blut abgegeben und bewirkt wie Epinephrin eine Verengung von Gefäßen. Als Neurotransmitter wird das Monoamin im PNS von Neuronen des Sympathikus ausgeschüttet und vermittelt eine ergotrope, d.h. leistungssteigernde Wirkung auf betroffene Organe wie Herz, Lunge und Gonaden. Der größte Teil der Neuronen des zentralnervösen norepinephrineren Systems befindet sich im Locus caeruleus des Hirnstamms, die von dort in weite Gebiete des ZNS projizieren. Molekulare Empfänger des Signals sind dort und in peripheren Geweben die adrenergen Rezeptortypen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , und  $\beta$ , sämtlich GPCRs der Rhodopsin-ähnlichen

Familie [84]. Der  $G_q$ -gekoppelte  $\alpha_1$ , der in verschiedenen Isoformen bekannt ist, liegt im ZNS und PNS vor und vermittelt vor allem an glatten Muskeln des kardiovaskulären Systems kontraktile Wirkungen durch Aktivierung von PLC und folgende Freisetzung von  $IP_3$  und DAG sowie Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Spiegels [85]. Diese und die meisten anderen Wirkungen adrenerger Neurotransmission sind typische Komponenten des Fluchtreflexes. Bei  $\alpha_2$  handelt es sich um einen  $G_i/G_o$ -gekoppelten Rezeptor, der ebenfalls in mehreren Subtypen vorkommt, bei Aktivierung durch seine Liganden Epinephrin, NE oder Isoprenalin die Aktivität der AC hemmt und so die zelluläre cAMP-Konzentration erniedrigt. Der Rezeptor ist beteiligt an Vasokonstriktion, Vasodilation, Inhibition der Lipolyse im Fettgewebe und Kontrolle der norepinephrinerger Neurotransmission [86,87]. Er wird in der Großhirnrinde mit kognitiven Prozessen wie Gedächtnis und Aufmerksamkeit in Verbindung gebracht [88].  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren werden in drei Subtypen unterteilt, die über  $G_s$  eine Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels vermitteln. Die Hauptfunktionen der Rezeptoren liegen in der Modulation der Kontraktion des Herzmuskels ( $\beta_1$ ), der Regulation des Tonus glatter Muskeln z.B. im Uterus ( $\beta_2$ ) sowie der Steuerung von Lipolyse und Thermogenese im Fettgewebe ( $\beta_3$ ).

### 1.5 Monoamin-Transporter der Plasmamembran

Das komplexe Gleichgewicht zwischen Synthese, Speicherung, Ausschüttung, Wiederaufnahme und Abbau von Monoaminen bestimmt die Intensität des monoaminergen Signals. Eine wichtige Komponente ist dabei im Fall der Neurotransmission die Entfernung des freigesetzten Transmitters aus dem extrazellulären Raum. Dies kann mittels enzymatischen Abbaus, Verdünnung durch Diffusion oder, weitaus wichtiger, spezifischen Rücktransports durch Monoamin-Transporter der Plasmamembran geschehen [89]. Bekannt sind die drei spezifischen Proteine SERT, DA-Transporter (DAT) und NE-Transporter (NET), der weniger spezifische neuronale Plasmamembran-Monoamin-Transporter (PMAT) und der extraneurale Monoamin-Transporter (EMT), der auch als Organische-Kationen-Transporter 3 (OCT-3) und Histamin-Transporter (HAT) bezeichnet wird [90-92]. Die drei erstgenannten gehören innerhalb der großen Familie der Transporter gelöster Stoffe (SLC) der Familie der  $Na^+/Cl^-$ -abhängigen substratspezifischen neuronalen Membrantransporter (SLC6) an, die auch Transportproteine der Neurotransmitter GABA, Glycin, Taurin u.a. beinhaltet. Strukturell geht man von 12 Transmembrandomänen aus, wobei N- und C-Terminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind; die Energie für den aktiven Transport der Monoamine stammt aus dem Kotransport von  $Na^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen entlang eines durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase aufgebauten Gradienten [90]. Beim PMAT, auch als hENT4 bezeichnet, handelt es sich um ein Mitglied der Equilibrativen Nukleosid-Transporter (ENT) mit Spezi-

fität für 5-HT, DA, NE, das Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridin (MPP<sup>+</sup>) und Adenosin. Der Transporter ist Na<sup>+</sup>-unabhängig, abhängig vom Membranpotential und in weiten Teilen des Gehirns exprimiert [93]. Die Proteine der OCT-Familie, auch als SLC22-Familie bezeichnet, vermitteln den Transport verschiedenster organischer Kationen über die Plasmamembran. Im Kontext monoaminerger Aktivität sind die beiden Mitglieder OCT-2 (SLC22A2), exprimiert vor allem in der Niere, und besonders OCT-3 (SLC22A3) interessant. OCT-3 dient in vielen Geweben, u.a. im Gehirn, der Elimination von endogenen organischen Kationen, Toxinen und anderen kleinen Molekülen. Besondere Bedeutung hat der Transporter aber als extraneurales, niedrigaffines Monoamin-Transportsystem zur peripheren Elimination von Neurotransmittern, das auch in Abgrenzung zu den hochaffinen, spezifischen SLC6-Transportern (uptake-1) als uptake-2 bezeichnet wird [94]. Es ist allerdings fraglich, ob dieses System lediglich aus den beiden vorgestellten OCTs besteht, da sie z.B. in Gefäß-Endothelzellen nur für die erste, schnelle Aufnahme verantwortlich sind und eine spätere, länger andauernde Komponente nicht auf sie zurückgeführt werden kann [95].

Im Kontext der Neurotransmission kommt den Transportproteinen der SLC6-Familie eine besondere Rolle zu, da diese für die schnelle Entfernung des ausgeschütteten Transmitters aus dem synaptischen Spalt und damit für das Signalende essenziell sind. Unter bestimmten Bedingungen kann allerdings auch ein reverser Transport erfolgen, z.B. unter Einwirkung von Amphetaminen wie 3,4-Methylenedioxy-*N*-methyldamphetamin (MDMA, Ecstasy) oder Fenfluramin, die einerseits den vesikulären Monoamin-Transport hemmen und andererseits durch Antiport zu einem Efflux führen [96]. Die somit deutlich erhöhten extrazellulären Monoamin-Konzentrationen (der Effekt wurde für SERT, DAT und NET beschrieben) sind charakteristisch für die stimulierenden Eigenschaften der als Rauschmittel missbrauchten Amphetamine. Inhibitoren der Monoamin-Transporter können ebenfalls einen Anstieg der extrazellulären Monoamin-Konzentrationen bewirken, indem die Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt verhindert wird [97]. Zu diesen gehören Stimulanzien wie Kokain (DAT, NET, SERT) und Mazindol (NET, DAT) sowie trizyklische Antidepressiva wie Desipramin (NET). Besondere Bedeutung kommt den SSRIs (z.B. Fluoxetin) und SNRIs (z.B. Venlafaxin) zu, die aufgrund ihrer hohen Spezifität geringe Nebenwirkungen zeitigen. Die Stärke des Monoamin-Transports wird von der Zelle hauptsächlich durch Regulation der Lokalisation der Transportproteine beeinflusst. So können an der Plasmamembran befindliche Proteine beispielsweise nach einer Phosphorylierung internalisiert werden, doch auch über eine pharmakologische Veränderung der intrazellulären Lokalisation z.B. von DAT durch Kokain wurde berichtet [97].

Im ZNS werden die Monoamin-Transporter praktisch ausschließlich von Neuronen exprimiert, die den jeweiligen Neurotransmitter ausschütten. DAT findet sich daher hauptsächlich in der Substantia nigra und im VTA, NET im Locus caeruleus und in anderen Regionen des Hirnstamms, und SERT in den Raphe-Kernen. In peripheren Geweben konnte DAT u.a. im Magen, im Pankreas und in der Niere nachgewiesen werden, während NET in Neuronen des Sympathikus, im Nebennierenmark sowie in Lunge und Plazenta vorkommt. SERT dagegen wird von Thrombozyten, Astrozyten, im Gastrointestinaltrakt und in der Nebenniere exprimiert [97].

### 1.6 Vesikuläre Monoamin-Transporter und Ausschüttung

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Plasmamembran-Transportern besteht die Aufgabe der VMAT darin, im Zytoplasma befindliche Monoamine in präsynaptische SV zu befördern, die dann durch Fusion mit der Plasmamembran ihren Inhalt freisetzen und die synaptische Transmission ermöglichen können. Die beiden bekannten Isoformen VMAT1 und VMAT2 gehören mit dem vesikulären Acetylcholin-Transporter zur SLC18-Familie und weisen eine Sequenzidentität von 60 % auf [98]. Sie bestehen wahrscheinlich aus 12 Transmembrandomänen und beziehen die für den aktiven Transport nötige Energie aus einem durch eine vakuoläre ATPase aufgebauten Protonengradienten, der durch Monoamin/H<sup>+</sup>-Antiport ausgenutzt wird [99]. VMAT1 findet sich u.a. in der Nebenniere, in Ganglien des Sympathikus sowie in enterochromaffinen Zellen. Die Affinität des Transporters ist für 5-HT am höchsten, gefolgt von Epinephrin, DA, NE und HA, während VMAT2 eine geringere Affinität für Epinephrin und eine höhere für HA aufweist. Letzterer findet sich vor allem in monoaminergen Neuronen des ZNS, aber auch in vielen anderen Zelltypen wie Pankreas, Mastzellen und Thrombozyten [98]. Reguliert werden VMATs im Wesentlichen durch Phosphorylierung, doch auch ein autoregulatorischer Mechanismus ist bekannt. Hierbei aktivieren hohe vesikuläre Monoamin-Konzentrationen die  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine G<sub>q</sub> bzw. G<sub>o2</sub>, was zu einer Drosselung der VMAT2-Aktivität führt [100,101].

Transmitterhaltige synaptische Vesikel werden dann, vermutlich gesteuert von Rab3-GTPasen, zur präsynaptischen Membran dirigiert. Dort kommt es zum festen Anheften (*tethering*) und, gesteuert von Proteinen des SM- und des SNARE-Komplexes, zur Ca<sup>2+</sup>-induzierten Vesikelfusion. Als Sensor für den sekundären Botenstoff dient an der neuronalen Synapse Synaptotagmin, das in der Ca<sup>2+</sup>-gebundenen Form das Protein Complexin aus dem SNARE-Komplex verdrängt und somit die für die Fusion nötige Energie freisetzt [102]. Der nun in hohen Konzentrationen im synaptischen Spalt vorhandene Transmitter kann durch Bindung an entsprechende Rezeptormoleküle der Postsynapse die Erregungsweiterleitung vermitteln,

bevor er, wie oben beschrieben, durch spezifische Transporter ins Zytosol der präsynaptischen Zelle verbracht wird und für eine erneute Ausschüttung zur Verfügung steht.

## 2 Monomere und heterotrimere GTPasen

### 2.1 Die Funktion von monomeren GTPasen in der Signaltransduktion

Eine Schlüsselrolle bei vielen Signalprozessen kommt der Proteinfamilie der GTPasen, auch als G-Proteine bezeichnet, zu. Diese molekularen Schalter wechseln zwischen einer GDP-gebundenen und einer durch signalvermittelten Nukleotidaustausch aktivierten, GTP-gebundenen Konformation. Letztere erlaubt die Bindung spezifischer Effektorproteine und damit eine Weiterleitung des Signals. GTPasen werden nach ihrer Struktur in monomere und heterotrimere GTPasen unterteilt, wobei alle eine hochkonservierte G-Domäne besitzen. Monomere („kleine“) GTPasen werden wiederum in die Unterfamilien Ras (*Rat Sarcoma*), Rho (*Ras Homology*), Rab (*RAs-related in Brain*), Ran (*RAs-like Nuclear*) und Arf (ADP-Ribosylierungsfaktor), heterotrimere GTPasen in die Familien  $G_s$  (stimulatorisch),  $G_i$  (inhibitorisch),  $G_q$  und  $G_{12}$  gegliedert. Daneben sind noch Signalerkennungspartikel (SRP) und Elongationsfaktoren der Proteintranslation wie EF-Tu zu erwähnen, die ebenfalls eine GTPase-Aktivität aufweisen; andere GTP-bindende Proteine wie Tubulin sind strukturell nicht verwandt.

Der Ras-Unterfamilie werden neben H-, K- und N-Ras u.a. auch Rap-GTPasen und das in dieser Arbeit verwendete M-Ras zugeordnet [103]. Gemeinsam ist den Proteinen neben ihrer Sequenzhomologie die Eigenschaft als Onkogene, da sie, wie z.B. im MAPK-Weg, an wichtigen Knoten der zellulären Signaltransduktion über das Zellschicksal entscheiden. Das vor allem im ZNS exprimierte M-Ras im Besonderen wird mit der Reorganisation von Actinfilamenten und Differenzierungsprozessen in Verbindung gebracht. In PC12-Zellen beispielsweise aktiviert M-Ras B-Raf und damit den ERK-Signalweg [104,105].

Zu den Rho-GTPasen zählen z.Zt. 23 Proteine, unter anderem die gut charakterisierten Enzyme RhoA, Cdc42, Rac1 und TC10 [106]. Auch die Mitglieder dieser Subfamilie vermitteln extrazelluläre Stimuli und leiten diese an zelluläre Signalwege weiter, wobei eine Besonderheit der Gruppe in der Vielfalt bekannter Effektorproteine, Guanosinnukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) besteht [107,108]. Eine Hauptaufgabe von Rho-GTPasen ist die Reorganisation des Actin-Zytoskeletts; RhoA z.B. vermittelt die Bildung von Actin-Fibrillenbündeln durch Interaktion mit mDia oder der Rho-abhängigen Kinase (ROCK), wobei letztere u.a. die leichte Polypeptidkette des Myosins phosphoryliert und so die Vernetzung des Motorproteins mit Actin stimuliert [109]. Wie im



weiteren (siehe Abschnitt I4.1) darzulegen sein wird, wird RhoA zudem z.B. im Zuge der Thrombozytenaggregation posttranslational mit 5-HT modifiziert. Cdc42 ist ebenfalls für die Regulation vielfältiger zellulärer Funktionen verantwortlich, der am besten charakterisierte Signalweg beinhaltet die Aktivierung des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASP), das wiederum das Actin-Zytoskelett reguliert und im Falle des Wiskott-Aldrich-Syndroms, bei mutiertem WASP, u.a. zu Abnormalitäten der T-Zell-Zytoarchitektur und der Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) führt [110,111].

Weitere Effektoren von Cdc42, TC10 und Rac1 sind Proteine der p21-aktivierten Kinase (Pak)-Familie, Pak3 beispielsweise ist an der Cdc42-abhängigen Bildung dendritischer Dorne beteiligt [112]. TC10 seinerseits reguliert die Insulin-induzierte Translokation des Glukose-Transporters 4 (GLUT4) in Muskel- und Fettgewebe [113]. Während GEFs das G-Protein aktivieren, führt die Interaktion mit GAPs durch eine verstärkte GTP-Hydrolyse zu einer Beendigung des Signals. Da die meisten kleinen GTPasen nur eine sehr geringe intrinsische GTPase-Aktivität aufweisen, ist die Feinregulation der entsprechenden Signalwege durch GAPs nötig. Zu den wichtigsten für Rho-GTPasen spezifischen GAPs gehört p50RhoGAP, das auch als ARHGAP1 oder Cdc42GAP bezeichnet wird [108,114].

Der großen Gruppe der Rab-GTPasen gehören etwa 70 Proteine an, die als Regulatoren des intrazellulären Vesikeltransports und des Proteintransports zwischen verschiedenen Organellen fungieren. Für die Ausschüttung von SV essenziell sind, wie oben erwähnt, Rab3a-c. Rab1 erfüllt eine wichtige Rolle beim Transport von COP1-Vesikeln vom ER zum Golgi-Apparat, während Rab4 in frühen Endosomen gefunden wird und am Prozess des Sortierens beteiligt ist [115,116]. Rab5 wiederum liegt an endozytotischen (auch synaptischen) Vesikeln lokalisiert vor und reguliert die Motilität von Endosomen [117]. Während Rab11 und Rab18 in den Transport endozytotischer Vesikel von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat involviert sind, kommt Rab11b im speziellen eine wichtige Rolle in exozytotischen Prozessen an Synapsen, so z.B. in PC12-Zellen, zu [116,118,119]. Das beim Griscelli-Syndrom mutierte Protein Rab27a sorgt für die korrekte Bewegung von Melanosomen zur Zellperipherie von Melanozyten, weshalb im Krankheitsfall ein partieller Albinismus auftritt [120]. Außerdem ist es an der Regulation der Sekretion lytischer Granula in zytotoxischen T-Zellen beteiligt [121].

Die Ran-Superfamilie kleiner G-Proteine besteht lediglich aus einem Mitglied, das für den Transport von RNA und Proteinen durch die Kernpore essenziell ist [122]. Arf-GTPasen sind wie Rab-Proteine in den Vesikeltransport involviert, indem sie z.B. Hüllproteine wie Clathrin an spezielle Membranbereiche rekrutieren und so das retrograde Transportsystem und die Endozytose modulieren [123].

## 2.2 Die heterotrimeren GTPasen $G\alpha_o$ und $G\alpha_q$ und ihre Funktionen

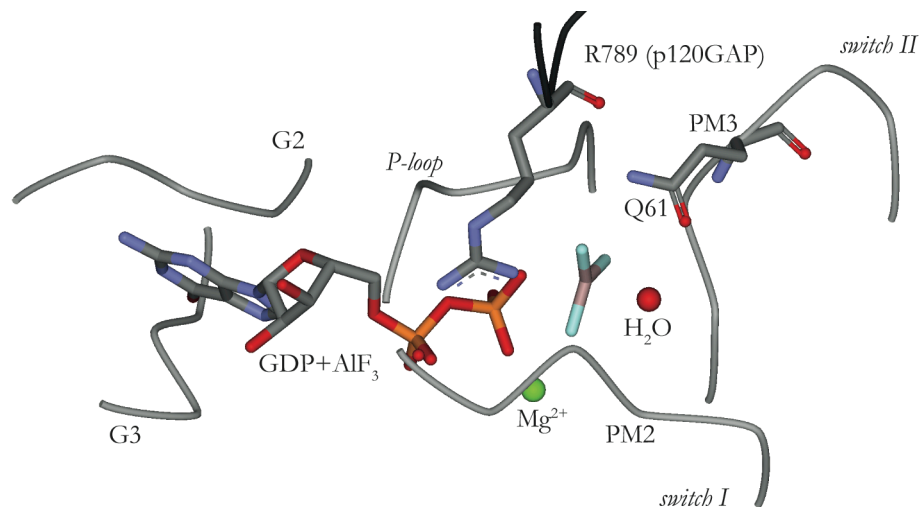
Heterotrimeren GTPasen setzen sich aus den Untereinheiten  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$  zusammen, wobei nur die erste eine katalytische GTPase-Aktivität aufweist. Nach einem typischerweise durch einen als GEF fungierenden GPCR initiierten Nukleotidaustausch dissoziiert membran-assoziiertes  $G\alpha\beta\gamma$  in die GTP-gebundene  $G\alpha$ -Untereinheit ( $GTP\cdot G\alpha$ ) und in den  $G\beta\gamma$ -Komplex, der je nach Zusammensetzung z.B. durch Interaktion mit  $Ca^{2+}$ -Kanälen des L-Typs die  $Ca^{2+}$ -Konzentration beeinflusst [124].  $GTP\cdot G\alpha$  hingegen liegt bis zur Inaktivierung durch intrinsische GTP-Hydrolyse im aktiven Zustand vor, in dem es je nach Typ mit unterschiedlichen Effektoren interagiert und damit intrazelluläre Signalwege reguliert. Da in dieser Arbeit insbesondere die beiden heterotrimeren GTPasen  $G\alpha_{o1}$  (Other) und  $G\alpha_q$  betrachtet wurden, soll an dieser Stelle kurz auf deren zelluläre Funktion eingegangen werden.

Das zur  $G\alpha_q$ -Familie gehörende Pertussistoxin-sensitive  $G\alpha_o$  liegt vor allem in neuronalem Gewebe hoch exprimiert vor [125]. Intrazellulär kolokalisiert das Protein mit neuronalen Wachstumskegeln, und entsprechend wird ihm eine regulatorische Rolle beim Wachstum von Neuriten, z.B. in PC12-Zellen, zugeschrieben [126,127]. Beschrieben ist weiterhin die Beteiligung von  $G\alpha_o$  an der Transformation von NIH3T3-Zellen, der Modulation von  $Ca^{2+}$ -Kanälen in dorsalen Wurzelganglien, der Vesikelausschüttung chromaffiner Zellen und der Regulation der VMAT-Aktivität [128-131]. Obwohl der genaue Signalfluss nicht bekannt ist, geht man von einer zentralen Rolle des Src/Stat-Weges in der  $G\alpha_o$ -Signaltransduktion aus [132]. Für  $G\alpha_q$ -Proteine hingegen ist wie oben erwähnt bekannt, dass sie PLC und den  $IP_3$ -Signalweg aktivieren können. Sie liegen in vielen Geweben und Zelltypen vor, so dass eine Auflistung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Gemeinsam ist den beiden GTPasen u.a. ihre Rolle bei der Regulation des Monoamingehalts von SV durch direkte Inhibition der VMAT-Aktivität [133].

Aus der Vielzahl bekannter Interaktionspartner soll auf die Familie der Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion (RGS) eingegangen werden. Die Mitglieder dieser großen Proteinfamilie kommen ubiquitär vor und hemmen die  $G\alpha$ -abhängige Signalweiterleitung, indem sie zum einen als GAPs die GTP-Hydrolyse forcieren und zum anderen die Interaktion des G-Proteins mit anderen Bindungspartnern stören [134]. Überexprimiertes RGS4 beispielsweise hemmt die  $G_q$ - bzw.  $G_i$ -vermittelte Weiterleitung des Bradykinin- und Somatostatin-Signals in HEK293-Zellen [135]. RGS-Proteine stellen ein wertvolles Werkzeug zur Bestimmung des Signalstatus von heterotrimeren G-Proteinen dar, da z.B. RGS4 bevorzugt mit aktivem, GTP- oder GDP/ $AlF_4$ -gebundenem  $G\alpha_o$  und  $G\alpha_q$  interagiert [136-138].

### 2.3 Der katalytische Mechanismus der GTP-Hydrolyse

Betrachtet man die oben beschriebene Diversität der von GTPasen regulierten Prozesse, so erscheint es um so bemerkenswerter, dass im Grunde eine einfache Hydrolyse das zentrale Element einer hochkomplexen Maschinerie bildet. Tatsächlich ähnelt sich der katalytische Mechanismus aller beschriebenen GTPasen, und auch auf der Ebene von Sequenzelementen und dreidimensionaler Struktur besteht eine hohe Homologie. Insbesondere die Sequenzmotive PM1 ( $^{10}\text{GxxxxGKS/T}$ ), PM2 ( $^{35}\text{T}$ ), PM3 ( $^{57}\text{DxxGQ/H/T}$ ), G1 (F/Y), G2 ( $^{116}\text{N/TKxD}$ ) und G3 ( $^{143}\text{ExSA}$ ) sind als Teil der bei kleinen GTPasen etwa 20 kDa umfassenden G-Domäne konserviert und essenziell für die Nukleotidbindungs- und Hydrolyse eines G-Proteins<sup>1</sup> [139,140]. Besondere Bedeutung kommt G2, welches die Nukleotidbase bindet, und PM1, dem zentralen Element der Phosphat-Schleife (*P-loop*), zu. Ein weiteres fundamentales Modul der G-Domäne ist der *switch*-Mechanismus. Die beiden als *switch I* und *switch II* bezeichneten Domänen binden mit ihren hochkonservierten PM2- bzw. PM3-Motiven das  $\gamma$ -Phosphat des Trinukleotids in einer angespannten Konformation. Nach Hydrolyse entspannt sich diese, wodurch zuvor exponierte Effektor-Bindedomänen nicht mehr zugänglich sind [141].



**Abbildung 3: Das katalytische Zentrum der kleinen GTPase Ras.** Während die Motive G2 und G3 die Nukleotidbase koordinieren, sorgt der *P-loop* für die Bindung des  $\gamma$ -Phosphats. Vermittelt durch den in PM3 (*switch II*) enthaltenen Q61-Rest wird ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül so positioniert, dass ein nukleophiler Angriff stattfinden kann. Der durch ein GAP bereitgestellte R789-Rest und das durch PM2 (*switch I*) gebundene  $\text{Mg}^{2+}$  stellen positive Ladungen zur Verfügung (PDB #1WQ1, modifiziert nach [142]).

Die eigentliche katalytische Reaktion wird durch Bindung eines  $\text{Mg}^{2+}$ -Ions (PM2), korrekter Positionierung des für den nukleophilen Angriff verantwortlichen  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls durch einen in allen kleinen und heterotrimeren GTPasen bis auf Rap konservierten Glutamin (Q)-Rest in

<sup>1</sup> Positionsangaben beziehen sich auf Ras

PM3 und Stabilisierung des Übergangszustands durch den von einem GAP bereitgestellten Arginin (R)-Rest ermöglicht. Zur Veranschaulichung gibt Abbildung 3 den durch GDP/AlF<sub>4</sub>-Bindung simulierten Übergangszustand der GTP-Hydrolyse von Ras wieder. In Mutanten von G-Proteinen, bei denen der katalytische Q-Rest durch eine andere AS ersetzt ist, kann keine Hydrolyseaktivität festgestellt werden. Da diese Proteine dauerhaft in einer GTP-gebundenen und damit für Effektoren zugänglichen Konformation vorliegen, werden sie häufig für zellbiologische Untersuchungen herangezogen [142,143]. Eine Modifikation des Q-Restes, wie sie z.B. von bakteriellen Toxinen in Form einer Deamidierung vorgenommen wird, führt also zur Inhibition der GTPase-Aktivität und damit konstitutiven Aktivierung des G-Proteins [144].

### 3 Transglutaminasen

#### 3.1 Die Familie der Transglutaminasen

Bei der Bildung von oligomeren oder polymeren Proteinkomplexen spielen häufig nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, Ionenbindungen oder van-der-Waals-Kräfte die Hauptrolle. In einigen Fällen, wie z.B. bei der Bildung der verhornten Oberhaut, werden aber stärkere, kovalente Verknüpfungen benötigt. Häufig werden solche Quervernetzungen durch Mitglieder der Enzymfamilie der Transglutaminasen (TGM) gebildet. Diese Proteine existieren in nahezu allen Organismen und werden in drei strukturell unterschiedliche Gruppen unterteilt: Papain-ähnliche TGM, Protein-Disulfid-Isomerase (PDI)-ähnliche TGM und bakterielle Toxin-TGM. Erstere sind Mitglieder der Papain-ähnlichen Superfamilie von Cystein-Proteasen, zu der auch Papain, Calpain, deubiquitinierende Enzyme und N-Acetyltransferasen zählen. PDI-ähnliche TGM sind vor allem aus niederen Organismen bekannt, ein Beispiel ist das ERp60-ähnliche Protein aus dem Fadenwurm *Dirofilaria immitis*, das eine Homologie mit PDIs und sowohl PDI- als auch TGM-Aktivität aufweist [145]. Zu den bakteriellen Toxinen mit TGM-Aktivität werden u.a. der Zytotoxische Nekrotisierende Faktor 1 (CNF-1) aus *E. coli* und das Dermonekrotische Toxin (DNT) aus *Bordetella sp.* gerechnet [146], deren Wirkmechanismus in der pathologischen Aktivierung von Rho-GTPasen durch Deamidierung besteht [144,147]. Von den unterschiedlichen durch TGM katalysierten Reaktionen wird neben Deamidierung und Amin-Inkorporation die Quervernetzung von Proteinen als wichtigste angesehen. Daneben sind einzelne Mitglieder der Familie aber an einer ganzen Reihe von anderen zellulären Funktionen beteiligt, wie z.B. an der Esterifizierung von Involucrin (TGM1; [148]), an der Bildung des Erythrozyten-Zytoskeletts (Bande 4.2) oder als GTPase an der Signaltransduktion (TGM2). Diese

Funktionen stehen allerdings nicht in Zusammenhang mit der eigentlichen katalytischen Aktivität von TGM.

Im humanen Genom sind neun Mitglieder dieser Familie bekannt (siehe Tabelle 1), wobei nur acht Proteine eine enzymatische Aktivität aufweisen. Der Fibrin-stabilisierende Faktor (fXIIIa) ist eine im Wesentlichen extrazellulär im Blutplasma vorliegende TGM, die vor allem für ihre Beteiligung an der Blutgerinnung bekannt ist. Dabei folgt einer Aktivierung des inaktiven Proenzym fXIII durch Thrombin die Stabilisierung von Fibringerinnseln durch Quervernetzung. Daneben liegt diese TGM, z.B. in Thrombozyten und Megakaryozyten, aber auch intrazellulär vor [149] und kann u.a. als PDI wirken [150]. Das als Keratinozyten-TGM bekannte Enzym TGM1 ist wesentlich an der Verhornung der Epidermis beteiligt, indem es durch Vernetzung von Strukturproteinen der Zellhülle wie Involucrin, Loricrin und Typ II-Keratinen die sogenannte verhornte Zellhülle (CE) bildet [151]. Eine Defizienz des TGM1-Gens führt zu Störungen der CE, die sich im Krankheitsbild der lamellaren Ichthyose manifestieren [152].

**Tabelle 1: Die neun bekannten Papain-ähnlichen TGM.** Modifiziert nach [153].

Protein	Synonym	MW [kDa]	Gewebe	Lokalisation	Funktion	bekannte Krankheiten
fXIIIa	Fibrin-stabilisierender Faktor, Pro-Fibrinolyse	83	Thrombozyten, Astrozyten, Dendritische Zellen der Haut, Chondrozyten, Plazenta, Plasma, Synovialflüssigkeit	Zytosolisch, Extrazellulär	Blutgerinnung, Knochenwachstum	fXIII-Defizienz
TGM1	TG <sub>1</sub> , TG <sub>K</sub> , Keratinozyten-TG	90	Keratinozyten, Gehirn	Membranständig, Zytosolisch	Bildung der Zellhülle	Lamellare Ichthyose
TGM2	TG <sub>2</sub> , TG <sub>C</sub> , Gewebs-TG, Gh $\alpha$	80	ubiquitär	Zytosolisch, Nukleär, Membranständig, Zelloberfläche, Extrazellulär	viele Funktionen	?
TGM3	TG <sub>3</sub> , TG <sub>E</sub> , Epidermale TG	77	Plattenepithel, Gehirn	Zytosolisch	Bildung der Zellhülle	?
TGM4	TG <sub>4</sub> , TG <sub>P</sub> , Prostata-TG	77	Prostata	?	Samenkoagulation	?
TGM5	TG <sub>5</sub> , TG <sub>X</sub>	81	Ubiquitär außer ZNS und lymphatisches System	?	?	?
TGM6	TG <sub>6</sub> , TG <sub>Y</sub>	80	Gehirn	?	?	?
TGM7	TG <sub>7</sub> , TG <sub>Z</sub>	?	Ubiquitär	?	?	?
Bande 4.2	B4.2, ATP-bindendes Erythrozyten-Protein Bande 4.3	72	Erythrozyten, Knochenmark, Fötale Leber und Milz	Membranständig	Bestandteil des Membranskeletts	Kugelfellenanämie

Eine ähnliche Funktion ist auch für die sogenannte epidermale TGM (TGM3) beschrieben, die ebenfalls an der Bildung der Zellhülle beteiligt ist. Als Hauptfunktion wird aber die Quervernetzung von Trichohyalin im Haarfollikel angesehen [154]. Beide TGM werden allerdings nicht ausschließlich in epidermalen Zellen exprimiert, sondern kommen vielmehr in vielen unterschiedlichen Zelltypen vor [155]. So wird beispielsweise eine Beteiligung von TGM3 an der Entstehung von Speiseröhren-Krebs [156] oder von TGM1 an neurodegenerativen Erkrankungen [157] diskutiert. TGM4 gilt als ein Prostata-spezifisches Enzym, das allerdings auch in anderen Geweben nachgewiesen werden kann [158]. Eine wichtige Rolle spielt TGM4 bei der Bildung des Vaginalpfropfs *post coitum* bei Nagetieren [159], und in humanen Prostata-Karzinomzellen wird über eine Veränderung der invasiven Kapazität nach Verringerung der TGM4-Expression berichtet [158]. Generell ist aber wenig über die physiologischen Funktionen von TGM4 und TGM5 bis 7 bekannt. TGM5 gilt als epidermal exprimiertes Enzym, da eine zum Funktionsverlust führende Mutation Ursache für ein erbliches Keratolyse-Syndrom sein kann [160]. Über TGM6 und 7 ist äußerst wenig bekannt. TGM6 wurde erst kürzlich isoliert, wird in neuronalen Geweben exprimiert und steht zusammen mit TGM2 und 3 in Verbindung mit der Gluten-Unverträglichkeitserkrankung Zöliakie [161].

Das Erythrozyten-Protein Bande 4.2 ist ein TGM-Homolog, dem aber die katalytische Aktivität fehlt. Das Protein stellt mit 5 % des Membranproteins einen integralen Bestandteil der Erythrozyten-Membran dar und trägt durch Assoziation mit dem Bande 3- und dem Rhesus-Protein-Komplex sowie mit CD47 und Ankyrin entscheidend zu deren Stabilität bei [162]. Durch Mutationen im kodierenden Gen EPB4.2 wird Kugelzellenanämie ausgelöst, charakterisiert durch Abnormalitäten im Ionentransport die zu hämolytischer Anämie, Gelbfieber und vergrößerter Milz führen [163].

### 3.2 Die Funktionen der Gewebs-TGM

Das weitaus bekannteste und am besten charakterisierte Mitglied der Familie ist allerdings die Gewebs-TGM (TGM2), die 1957 als erste TGM beschrieben wurde [164]. Obwohl TGM2 neben der namensgebenden Transamidierungs-Aktivität auch als PDI und als GTPase wirken kann und in der extrazellulären Matrix (ECM) mit Fibronectin interagiert, bleibt seine eigentliche physiologische Rolle bis heute im Dunkeln. Bekannt ist, dass das Enzym wie alle Papain-ähnlichen TGM durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird, im Fall der TGM2 liegt aber zudem eine reziproke Regulation der katalytischen Aktivitäten vor: Bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen überwiegt die Transamidierung, bei niedrigen die Funktion als G-Protein. Am einfachsten lässt sich dieser Umstand mit einer Beteiligung am programmierten Zelltod erklären, bei dem die Zelle

durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$  wird und die GTP-Herstellung ins Stocken gerät. In diesem Fall würde das vorher als G-Protein fungierende Enzym seine starke Transamidierungs-Aktivität entfalten und zelluläre Bestandteile zu unlöslichen Aggregaten vernetzen [153]. In seiner Eigenschaft als G-Protein wurde TGM2 zunächst als  $\text{G}\alpha_{\text{h}}$  beschrieben, das die Aktivierung der  $\delta 1$ -Isoform von Phospholipase C und von Kaliumkanälen sowie die Inaktivierung der AC vermittelt [165]. TGM2 wird ubiquitär in nahezu allen Zelltypen exprimiert und liegt hauptsächlich als zytosolisches Protein (80 %) vor. Daneben findet sich TGM aber auch im Blutplasma (10-15 %), in der Kernmembran (5 %) und im Zellkern [153]. Die Lokalisation in der ECM wird durch die Sekretion des Enzyms ermöglicht. Durch den Umstand, dass TGM2 nahezu in allen Zellen und in vielen Zellkompartimenten vorhanden ist, ergeben sich die unterschiedlichsten Wirkorte und Zielproteine. Aus dieser Vielzahl seien nur die Quervernetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Matrixproteinen im Zuge der Knochenbildung [166] und die Stabilisierung von dermo-epidermalen Kontaktstellen durch Quervernetzung von TGF- $\beta$  mit Mikrofibrillen [167] erwähnt. Zahlreich sind ebenfalls die postulierten pathologischen Wirkmechanismen von TGM2. So werden bei der Autoimmunerkrankung Zöliakie, einer Gluten-Unverträglichkeit, proteolytisch resistente Gluten-Peptide durch TGM2 deamidiert und durch Antigen-präsentierende Zellen aufgenommen. Dies führt zu einer T-Zell-Antwort, die mit der Zerstörung von Teilen des Darmepithels einhergeht [168]. Bei der Bildung von altersbedingten Katarakten erfolgt in Epithelzellen der Linse eine Stimulierung der TGM2-Aktivität durch oxidativen Stress und so die Quervernetzung und Aggregation von Linsenproteinen wie z.B.  $\beta$ -Crystallin [169]. Die pathologische Überexpression von TGM2 kann in Leukämien beobachtet werden, und auch an der Pathogenese der Schuppenflechte ist das Enzym beteiligt [153]. Besondere Bedeutung wird TGM, insbesondere der Gewebs-TGM, im Kontext der Krebsentstehung zugemessen, da das Enzym von vielen Karzinom-Zellen verstärkt exprimiert wird [170]. Allerdings ist die genaue Funktion bisher unklar, da TGM2 sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken kann [171] und in vielen Zelllinien mit einer Wirkstoffresistenz korreliert [170].

In Neuronen wurde TGM2 mit Axon-Wachstum und –Regeneration sowie mit unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Diese Krankheiten, zu denen der erbliche Veitstanz (*Chorea Huntington*), die Alzheimer-Krankheit (*Morbus Alzheimer*) und PD gehören, sind durch die Akkumulation von unlöslichen Proteinaggregaten im Gehirn und zunehmendes Absterben der betroffenen Nervenzellen gekennzeichnet. Interessanterweise wird TGM2 in erkrankten Neuronen verstärkt exprimiert, und die quervernetzenden Eigenschaften des Enzyms lassen auf eine Beteiligung an der Bildung der Aggregate schließen [172]. Am Beispiel der *Chorea Huntington* sei dieser Zusammenhang näher erläutert. Ursächlich für die

autosomal dominant vererbte Krankheit ist die unnatürliche Verlängerung sich wiederholender CAG-Sequenzen im Exon 1 des für das Huntingtin-Protein (HTT) codierenden Gens *HTT*. Dabei ist die Länge der Wiederholungen ausschlaggebend für die Schwere der Krankheit und den Zeitpunkt des Auftretens. Als pathologisch gelten dabei über 35 CAG-Wiederholungen [172]. Auf Proteinebene resultieren diese Bereiche in mehr oder weniger langen Poly-Q-Abschnitten, die als Q-Substrate für TGM dienen können [173]. Die Hypothese der Beteiligung von TGM an der Ätiologie von *Chorea Huntington* wird zudem durch die Beobachtungen gestützt, dass sich in den Gehirnen betroffener Patienten eine erhöhte TGM-Aktivität findet [174,175]. Die Bildung von Proteinaggregaten könnte daher damit zu erklären sein, dass Poly-Q-Bereiche mit steigender Länge zu guten Substraten für TGM2-vermittelte Transamidierung [173] und somit verstärkt quervernetzt werden. Zudem bewirkt der TGM-Inhibitor Cysteamin (CTEA) eine Verringerung der Aggregatsbildung und ein verlängertes Überleben von Mäusen, die mutiertes HTT exprimieren [176]. Es ist allerdings nicht klar, ob die Bildung der Proteinaggregate ursächlich für das Absterben der Neuronen oder ein Nebenprodukt bei dem Bemühen der Zelle ist, toxisches HTT zu eliminieren [172]. Da ein vollständiger *knock-out* von HTT im Mausmodell embryonal letal ist, könnte auch der durch Aggregatbildung hervorgerufene Entzug des essenziellen Proteins der Grund für den Tod der Nervenzellen sein.

Neben *Chorea Huntington* sind sieben weitere sogenannte Trinukleotidkrankheiten bekannt, die auf pathologisch verlängerte CAG-Wiederholungen zurückgeführt werden: Spinobulbäre Muskelatrophie, die Spinozerebellären Ataxien 1, 2, 3, 6 und 7 sowie Dentatorubrale Pallidolysiane Atrophie. Eine Beteiligung von TGM an diesen weniger gut erforschten Krankheiten ist aufgrund der ähnlichen Mutationen wahrscheinlich.

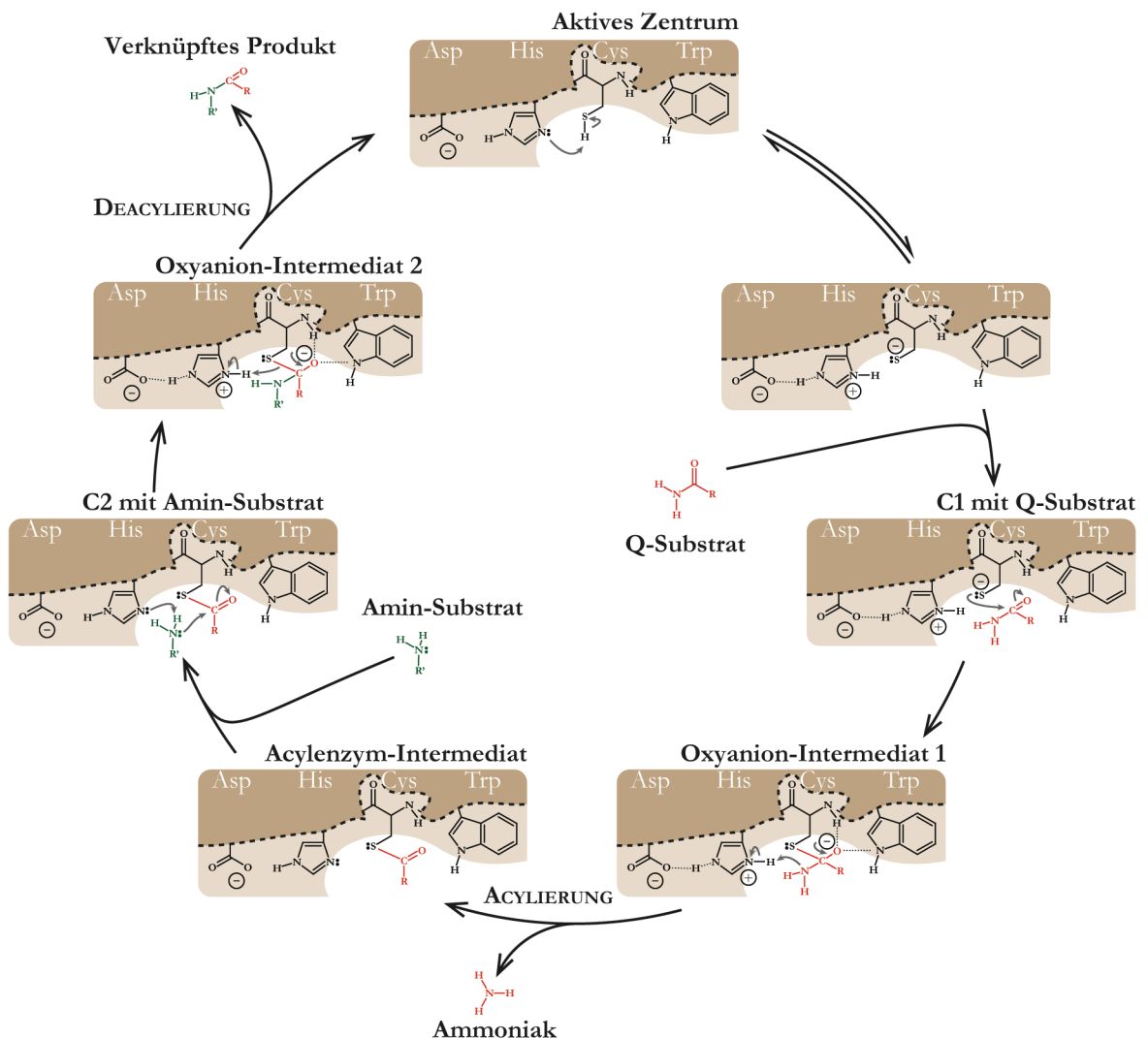
Festzuhalten bleibt schließlich die Beobachtung, dass im R6/2-Mausmodell für *Chorea Huntington* bereits einige Zeit vor Erscheinen der ersten Symptome im Hirnstamm eine Degeneration des serotonergen Systems stattfindet [177]. Andere monoaminerge Systeme wie das dopaminerge und norepinephrinerge System sind ebenfalls betroffen. So berichtete REYNOLDS *et al.* [178] von verringerten DA- und NE-Konzentrationen im Striatum bzw. im Hippocampus der Modelltiere. Prinzipiell erscheint damit ein kausaler Zusammenhang zwischen verringerter monoaminergem Innervierung und dem Auftreten der Huntington'schen Krankheit denkbar.

### 3.3 Die vielfältigen Substrate der TGM

TGM werden zur Gruppe der Papain-ähnlichen Superfamilie von Cystein-Proteasen gezählt, die die katalytische Triade Cys-His-Asp oder Cys-His-Asn gemein haben. Wie in Abbildung 4



skizziert erfolgt die Modifizierung des Q-Substrats über die Bildung eines Acylenzym-Intermediats. Dazu bilden die Cys- und His-Reste im katalytischen Zentrum zunächst ein Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar, welches dann im Oxyanion-Intermediat die  $\gamma$ -Carboxamidgruppe des Q-Substrats angreift. Unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  wird so das Acylenzym-Intermediat gebildet. Ausgehend von diesem Zwischenprodukt können TGM wie oben erwähnt eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen katalysieren, die durch Bindung eines zweiten Substrats initiiert werden. Im Fall der Transamidierung bindet ein Amin-Substrat und bildet in einem nukleophilen Angriff das Oxyanion-Intermediat 2. Das Enzym wird dann im Deacylierungs-Schritt regeneriert und das verknüpfte Produkt freigesetzt. Diese Reaktion resultiert, wenn das Amin-Substrat ein proteingebundener Lysinrest eines anderen Proteins ist, in der Quervernetzung, für die TGM bekannt sind (siehe Abbildung 5 A).



**Abbildung 4: Der Reaktionsmechanismus der TGM-vermittelten Transamidierung.** Die Cys- und His-Reste im katalytischen Zentrum des Enzyms bilden zunächst ein Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar. Die Bindung des Q-Substrats erlaubt dann einen Angriff dessen  $\gamma$ -Carboxamidgruppe durch das Thiolat. Nach Bildung des Oxyanion-Intermediats 1 erfolgt die Acylierung unter Freisetzung von Ammoniak, aus der das Acylenzym-Intermediat resultiert. Die Amino-Gruppe des gebundenen Amin-Substrats vollzieht dann einen nukleophilen Angriff, der zur Bildung des Oxyanion-Intermediats 2 führt. Schließlich wird das verknüpfte Produkt im Deacylierungs-Schritt freigesetzt und das Enzym regeneriert. Abbildung modifiziert nach IISMAA *et al.* [179].

Allerdings kann neben dieser intermolekularen Verknüpfung auch ein Lysinrest des Q-Substrat-Proteins als Amin-Substrat dienen, was in einer intramolekularen kovalenten Bindung resultiert. Überdies können auch nicht-proteingebundene primäre Amine wie Mono- oder Polyamine als Amin-Substrate dienen. Bei dieser nach dem gleichen Mechanismus ablaufenden Reaktion wird als Endprodukt z.B. ein ( $\gamma$ -Glutamyl)-monoaminylnrest gebildet (siehe Abbildung 5 B). Der direkte Angriff des Acylenzym-Intermediats durch Wasser schließlich führt zur Deamidierung des Q- und damit zur Bildung eines Glutamat (E)-Restes (siehe Abbildung 5 C). Im Zuge aller drei Reaktionen wird jeweils ein Molekül  $\text{NH}_3$  freigesetzt. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird die Bildung des Acylenzym-Intermediats angesehen [180]. Weitere Charakteristika der TGM sind eine saturierende Bindung des Amin-Substrats und eine hohe Spezifität für diese. Zunächst soll aber auf die unterschiedlichen bekannten Q-Substrat-Proteine eingegangen werden.

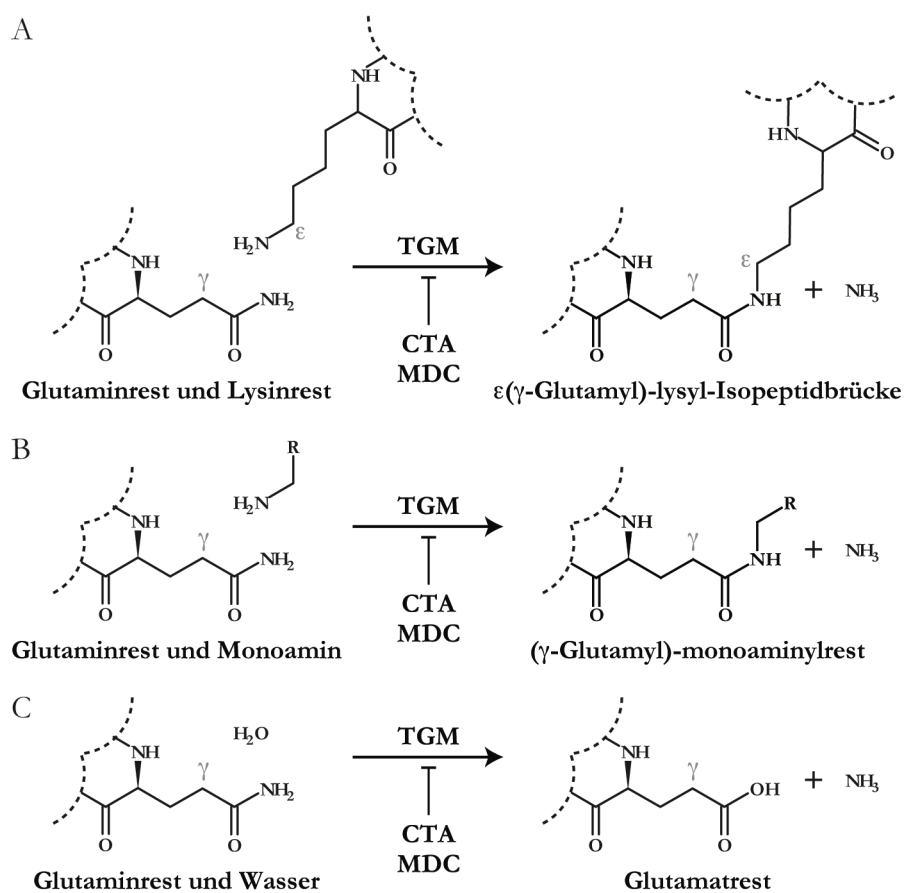
Trotz vielfältiger Bemühungen konnte bisher keine Konsensus-Sequenz gefunden werden, die eine Vorhersage von TGM-Substraten ermöglichen würde. Berichtet wurde für TGM2 zwar von einer pQx(P,T,S)l-Sequenz<sup>2</sup> [181], andere Arbeitsgruppen aber schlugen die Konsensus-Sequenzen QxPhD(P), QxPh oder QxxhDP vor [182]. In der kürzlich von FACCHIANO *et al.* [183] vorgestellten Liste aller bisher gefundenen TGM-Substrate finden sich 111 Q-Substrat-Proteine und 35 Amin-Substrat-Proteine, die hauptsächlich aus Studien mit TGM2 oder fXIIIa stammen. Zu ersteren gehören intrazelluläre ebenso wie sekretierte oder membranständige Proteine, die unterschiedlichste Funktionen erfüllen. Strukturproteine wie Actin, Collagen, Crystallin, Fibrinogen, Loricrin, Tubulin und Fibronectin sind hier ebenso vertreten wie Enzyme der unterschiedlichsten metabolischen Funktionen (z.B. Proteasen, ATP-Synthase, Enolase und Phosphoglycerat-Kinase) und Signalproteine (z.B. Acetylcholin-Esterase, Glucagon, Insulin, Interleukin-2, PLA<sub>2</sub>, Tetanus-Toxin und der Androgen-Rezeptor). Wie oben erläutert können auch Proteine, die an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind, als Q-Substrate dienen. So führt FACCHIANO u.a. das  $\beta$ -Amyloidpeptid, HTT sowie Poly-Q-Peptide im allgemeinen auf. Als Modellprotein für *in vitro*-Untersuchungen von TGM wird weithin ein modifiziertes Derivat des Milchproteins Casein verwendet. Dieses N,N-Dimethyl-Casein (DMC) besitzt modifizierte Lysinreste, die eine Quervernetzung verhindern, und kommt häufig bei der Quantifizierung der TGM-Aktivität biologischer Proben zur Anwendung [184].

Betrachtet man die bekannten Amin-Substrate, so sind im Kontext der Quervernetzung zunächst die erwähnten 35 Proteine zu erläutern. Auch hier findet sich eine bemerkenswerte

---

<sup>2</sup> p: polare AS; l: aliphatische AS; x: beliebige AS; h: hydrophobe AS

Bandbreite unterschiedlicher Proteine, die von Strukturproteinen (Actin, Keratin) über Zell-Adhäsions-Proteine bis zu metabolischen Enzymen (Glutamat-Dehydrogenase (GDH), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase) reicht. Die Deamidierung von Proteinen ist wie oben erwähnt am besten für das Gluten-Peptid Gliadin A beschrieben, das durch TGM modifiziert, von T-Zellen aufgenommen und präsentiert wird und ursächlich für die Gluten-Unverträglichkeitserkrankung Zöliakie ist. Weiterhin ist bekannt, dass die bakteriellen TGM CNF und DNT die kleinen GTPasen RhoA und Ras deamidieren, was zur Zerstörung der Wirtszelle durch Deregulation der Bildung von Actin-Fibrillenbündeln führt [146,144].

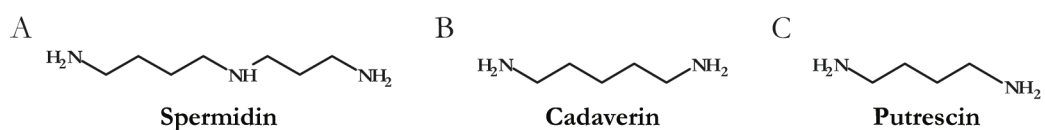


**Abbildung 5: Die drei durch TGM vermittelten Reaktionen der Protein-Quervernetzung, Monoamin-Inkorporation und Deamidierung.** (A) Unter Abspaltung von NH<sub>3</sub> wird ein proteingebundener Glutaminrest in Anwesenheit von TGM mit einem proteingebundenen Lysinrest verknüpft. Es resultiert eine intra- oder intermolekulare  $\epsilon$ ( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysylbrücke. (B) In Gegenwart von primären Aminen können TGM eine Inkorporation von z.B. Monoaminen katalysieren. Dabei wird das Monoamin unter NH<sub>3</sub>-Abspaltung kovalent mit einem proteingebundenen Glutaminrest verbunden. (C) Wenn kein geeignetes Amin-Donor-Substrat zugegen ist, kann auch eine TGM-abhängige Deamidierung unter Bildung eines Glutamatrestes erfolgen. Diese Reaktionen können von kompetitiven Inhibitoren wie Cysteamin (CTEA) oder Monodansylcadaverin (MDC) gehemmt werden.

Im Zusammenhang dieser Arbeit ist die Inkorporation von biogenen Monoaminen von besonderer Bedeutung. Zunächst soll jedoch auf eine andere Amin-Inkorporation

eingegangen werden, die TGM-vermittelte Modifizierung von Proteinen mit Polyaminen. Als solche werden offenkettige oder zyklische organische Verbindungen mit endständigen primären Aminogruppen, häufig unterbrochen von sekundären Aminogruppen, bezeichnet. Zu den biogenen Polyaminen zählen die vor allem im Zellkern und in den Ribosomen lokalisierten Substanzen Spermidin (siehe Abbildung 6 A) und Spermin. Obwohl zu ihrer Funktion wenig bekannt ist, wird angenommen, dass ihre Hauptaufgabe in der Stabilisierung von RNA sowie von gefalteter und superspiralisierter DNA besteht. So liegen in Ratten-Leberzellen beispielsweise 80 % (0,9 mM) des enthaltenen Spermidins RNA-gebunden vor und nur etwa 7 % (80  $\mu$ M) sind in löslicher Form nachweisbar [185]. Durch den Abbau von Ornithin und Lysin entstehen bei Verwesungsprozessen Putrescin und Cadaverin (siehe Abbildung 6 B und C), Polyamine, die zum Leichengeruch beitragen.

Nach TGM-vermittelter Inkorporation von Polyaminen wurde z.B. für das Tau-Protein [186,187] und Substanz P [188] eine Änderung der Proteolyse-Resistenz beschrieben, und ( $\gamma$ -Glutamyl)-Polyamine wurden im *Liquor cerebrospinalis* von *Chorea Huntington*-Patienten gefunden [189]. Dennoch gilt eine biologische Rolle für die Polyaminierung bisher nicht als sicher. *In vitro* hingegen sind Polyamine exzellente Substrate für die TGM2-abhängige Transamidierung von Proteinen, so dass insbesondere [ $^3$ H]-Putrescin und das fluoreszente Cadaverin-Derivat MDC (siehe Abbildung 1 B) häufig zur Bestimmung der TGM-Aktivität biologischer Proben herangezogen werden. Umgekehrt wird TGM auch genutzt, um die Konzentrationen biogener Amine (z.B. Tyramin, HA, Putrescin und Cadaverin) in Lebensmitteln durch Bildung der transamidierten Produkte zu ermitteln [190].



**Abbildung 6: Polyamine.** Die biogenen Polyamine Spermidin (A), Cadaverin (B) und Putrescin (C).

Viele Monoamine dienen als TGM-Substrate. So können beispielsweise das Antibiotikum Isoniazid oder der Vasodilator Hydrazalin durch TGM2 kovalent mit zellulären Proteinen verknüpft werden [191]. Besondere Bedeutung fällt im Rahmen dieser Arbeit aber den monoaminergen Neurotransmittern 5-HT, HA, DA und NE zu.

Für Leberextrakte wurde bereits 1959 durch CLARKE *et al.* neben der Inkorporation von Polyaminen wie Putrescin und Spermin die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inkorporation von biogenen Monoaminen beschrieben [192]. Untersucht wurden hier einfache Amine wie Methyl- und Ethanolamin sowie die Neurotransmitter HA, NE und 5-HT. Es wurde ebenfalls von der TGM-abhängigen Inkorporation von HA und anderen Aminen in Insulin *in vitro* berichtet [193]. In

frühen Studien wurden auch kinetische Parameter für die HA-Inkorporation des Modell-Q-Substrates Carbobenzoxy-L-Alanyl-L-glutaminyl-L-Valin-Ethylester durch TGM2 ermittelt. Die Michaeliskonstante  $K_m$  wird für HA mit 0,18 mM angegeben [194].

Obwohl auch *in vivo* proteingebundenes HA in der Leber [195] von Nagetieren nachgewiesen wurde, betrachtete man diese Beobachtungen als *in vitro*-Phänomene und Monoamine primär als kompetitive Inhibitoren der Protein-Quervernetzung durch TGM [196]. Eine regulatorische Rolle für die TGM-vermittelte HA-Inkorporation wurde schließlich 1985 durch FESUS *et al.* vorgeschlagen, nachdem modifizierte Proteine in murinen Mastzellen nachgewiesen werden konnten [197]. Die mögliche physiologische Bedeutung solcher posttranslationaler Modifikationen wurde in den folgenden Jahren allerdings nicht weiter verfolgt.

## 4 Die Serotonylierung als Spezialfall der Monoaminylierung

### 4.1 Die Serotonylierung im Zuge der Thrombozytenaggregation

Die initiale Beobachtung, die zur Entdeckung der physiologischen Funktion der TGM-vermittelten Transamidierung von 5-HT (Serotonylierung, allgemein Monoaminylierung) führte, war die verstärkte Blutungsneigung in einem TPH1-defizienten Mausmodell [21]. Diese Tiere, die kein peripheres 5-HT besitzen, zeigen verlängerte Blutungszeiten und ein verringertes Thromboserisiko [198]. Zurückzuführen sind diese Effekte auf einen Defekt in der Ausschüttung von  $\alpha$ -Granula aus *Tph1*<sup>-/-</sup>-Thrombozyten, der schließlich auf der beeinträchtigten Aktivierung der kleinen GTPasen Rab4 und RhoA beruht (siehe Abbildung 7). Grundlegend war die Beobachtung, dass eine Stimulation des einzigen auf Blutplättchen exprimierten Rezeptors 5-HT<sub>2A</sub> [199] durch  $\alpha$ -Methyl-5-HT nicht zu einer Aggregation führte, wohl aber die pharmakologische Erhöhung des 5-HT<sub>i</sub>. In Gegenwart von 5-HT erfolgt somit sowohl eine Bindung an 5-HT<sub>2A</sub>, was zur Aktivierung von G<sub>q</sub>, PLC und schließlich zur Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> führt. Gleichzeitig wird 5-HT jedoch durch den SERT im Zytosol angereichert und kann als Substrat für die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transamidierung dienen. Tatsächlich konnte nach Aggregation der Thrombozyten eine 5-HT-haltige Proteinbande detektiert werden, die mit RhoA identisch war. Effektorbindungsstudien mit *in vitro* serotonylierten GTPasen zeigten schließlich, dass diese posttranslationale Modifikation in der dauerhaften Aktivierung der Signalproteine resultiert. In 5-HT-defizienten Thrombozyten ist diese aktivierende Modulation nicht möglich, und die Folge ist eine verringerte Thrombozytenaggregation. Zudem bindet serotonyliertes Rab4 leichter an SERT und bewirkt so als Folge hoher extra- und intrazellulärer 5-HT-Konzentrationen eine verstärkte Retention des Transporters im Zytosol [200]. Damit wurde ein Mechanismus der negativen

Rückkopplung beschrieben, der bei hohen 5-HT-Konzentrationen eine Überladung der Zelle verhindert.

Mit diesen Ergebnissen wurde das Konzept der intrazellulären Wirkung von 5-HT durch TGM-vermittelte kovalente Verknüpfung mit Signalproteinen begründet. Es erlaubt die Erklärung einiger bisher enigmatischer und offensichtlich nicht rezeptorabhängiger Effekte von 5-HT, wie z.B. die mitogenen Eigenschaften in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Ätiologie der primären pulmonären Hypertonie [201] oder die Förderung des Wachstums von Prostatakrebszellen [202]. Die TGM-vermittelte Modulation kleiner GTPasen ist wie oben erwähnt von den bakteriellen Toxinen CNF und DNT bekannt, die im Zuge der Infektion einer Wirtszelle u.a. RhoA an der für die GTP-Hydrolyse essenziellen Position Q63 deamidieren und so die Bildung des Actin-Zytoskeletts irreparabel stören [146,144]. Auch wurde über eine, wenn auch nicht näher definierte, Transamidierung von RhoA während der neuronalen Differenzierung von SH-SY5Y-Zellen berichtet [203]. Nach der Entdeckung der Serotonylierung in Maus-Thrombozyten wurde schnell klar, dass es sich hierbei nicht um ein auf diesen Zelltyp begrenztes Phänomen handelt, sondern um einen generellen Regulationsmechanismus.

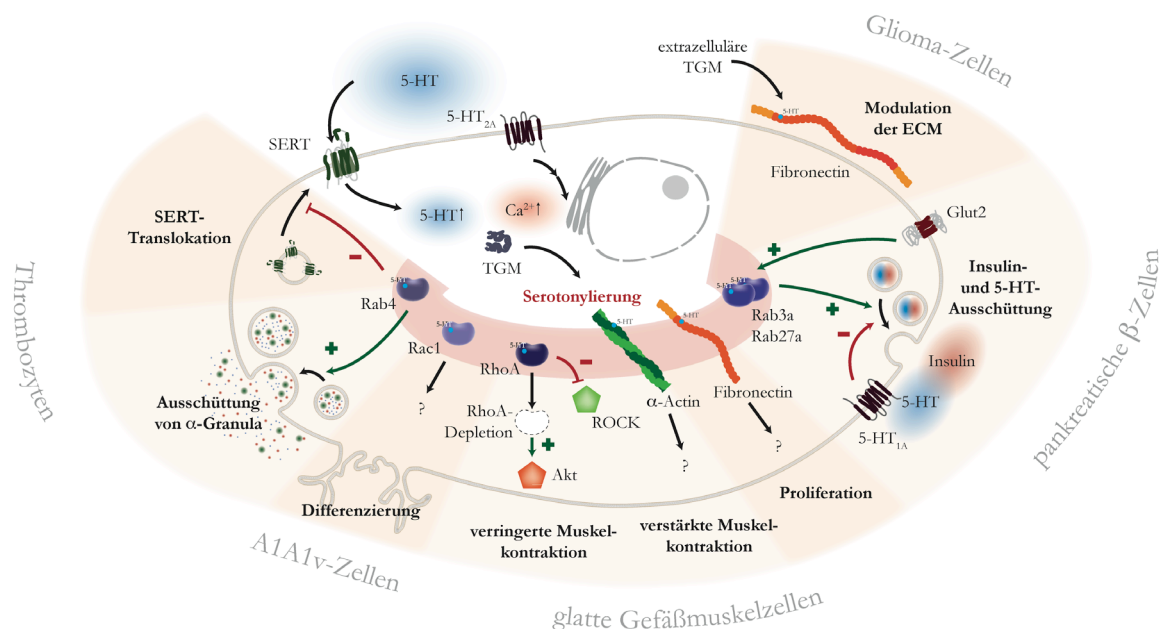


Abbildung 7: Der modulatorische Mechanismus der Serotonylierung wurde bereits in vielen unterschiedlichen Signalwegen beschrieben. Erläuterungen siehe Text.

#### 4.2 Die Monoaminylierung in glatten Gefäßmuskelzellen

Die pulmonäre Hypertonie (PH) ist eine Erkrankung, bei der die Vergrößerung des Lungen-Gefäßwiderstands den Blutstrom aus dem rechten Herzventrikel so weit einschränkt, dass oft

ein Versagen der rechten Herzkammer auftritt [204]. Bei der primären PH (PPH), einer seltenen Form mit bis dato ungeklärter Pathogenese, wird eine stark erhöhte 5-HT-Aufnahme beobachtet, die auf eine Überexpression des SERT zurückgeführt werden konnte [201]. Das Krankheitsbild ist dabei durch eine Hyperplasie von SMCs der Arterien gekennzeichnet. Durch GUILLUY *et al.* konnte schließlich gezeigt werden, dass die mitogene Aktivität von 5-HT in Ratten-SMC auf der Serotonylierung von RhoA beruht [205]. Dabei wirkt das Monoamin zunächst in einer frühen Phase durch Bindung an den 5-HT<sub>1B</sub>- und 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptor, was zur Aktivierung von ROCK führt. In einer späteren Phase aber wird dieser Effekt durch eine starke RhoA-Aktivierung abgelöst, die durch SERT-Inhibitoren verhindert werden kann. Begründet ist diese Aktivierung in einer TGM2-abhängigen Serotonylierung von RhoA, da sie in SMCs aus Tgm2<sup>-/-</sup>-Mäusen und bei Gabe von MDC nicht auftritt. Interessanterweise führt die sehr starke Serotonylierung zu einer Depletion von RhoA durch proteasomale Degradation und schließlich zur Aktivierung der durch RhoA negativ regulierten Serin-Threonin-Kinase Akt (siehe Abbildung 7) [206]. Akt wiederum ist bekannt für seine stimulierende Wirkung auf das Wachstum von SMCs [207].

Die durch pathologisch erhöhte SERT-Expression verstärkte Serotonylierung von RhoA führt also zur Depletion des G-Proteins und, vermittelt von Akt, zu einer verstärkten Proliferation die schließlich in der beobachteten Hyperplasie mündet [205]. Mittlerweile konnte ein analoger Mechanismus bei humanen PPH-Patienten nachgewiesen werden. Auch hier liegen erhöhte RhoA- und ROCK-Aktivitäten sowie eine Serotonylierung der kleinen GTPase vor, und die Inhibition der Monoaminylierung durch Flx oder MDC führt zu einer verringerten Proliferation der SMCs [208].

Ein weiterer Aspekt der Serotonylierung in SMCs wurde von LIU *et al.* beschrieben. Ausgehend von der 5-HT-abhängigen Proliferation und Migration boviner pulmonärer arterieller SMCs untersuchten die Autoren die Serotonylierung von Fibronectin und fanden tatsächlich eine Korrelation zwischen 5-HT<sub>i</sub>, TGM und Proliferation der SMCs: Fibronectin liegt in SMCs serotonyliert vor, und die Inhibition der Transamidierung durch MDC oder *knock-down* von Fibronectin führt zu einer verminderten Proliferation [209].

Auch in systemischen arteriellen Gefäßmuskulzellen, wie sie z.B. in der Mesenterialarterie oder der Brustaorta vorkommen, existiert ein serotonerges System. Diese Zellen exprimieren TPH1 und SERT und sind in der Lage, 5-HT sowohl aufzunehmen als auch auszuschütten [210]. Außerdem weisen Aortazellen eine Expression von TGM2 auf. Kürzlich wurde in einer Studie mit Ratten-Aorten ebenfalls von einer Serotonylierung zellulärer Proteine, darunter die Strukturproteine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Actin, die schwere Kette des Motorproteins Myosin sowie Filamin A, berichtet [211]. Die Autoren nutzten dabei ein Biotin-markiertes 5-HT-Derivat zur

Affinitätsanreicherung und identifizierten die modifizierten Proteinen anschließend mittels Massenspektrometrie (MS). Eine Inhibition der Serotonylierung von  $\alpha$ -Actin mittels Cystamin (CTA) führt, so die Autoren, zu einer Verringerung der 5-HT-induzierten isometrischen Kontraktion (siehe Abbildung 7). Zudem konnten die Autoren erste Hinweise auf eine allgemeinere Rolle der Monoaminylierung in SMCs der Ratte finden. So kann NE-Gabe ebenfalls eine isometrische Kontraktion hervorrufen, und  $\alpha$ -Actin kolokalisiert mit NE in SMCs der Vena cava und in kultivierten Aortazellen. Es liegt daher nahe, auf eine TGM2-vermittelte Norepinephrinylierung von  $\alpha$ -Actin zu schließen, und tatsächlich kann durch CTA die NE-abhängige Kontraktion inhibiert werden [212].

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass in glatten Gefäßmuskelzellen eine Regulation von Proliferation, Migration und Kontraktion durch Serotonylierung und Norepinephrinylierung stattfindet. Die bisher identifizierten Zielproteine der Modifikation sind dabei RhoA, Fibronectin, Actin, Myosin und Filamin A.

### 4.3 Modulation der Insulinausschüttung durch Serotonylierung

In pankreatischen  $\beta$ -Zellen wurde ebenfalls eine Modulation von Signalwegen durch die Serotonylierung von kleinen GTPasen entdeckt [213]. Ausgehend von der Hyperphagie, der veränderten Insulinsekretion und dem resultierenden Diabetes mellitus von *Tpbt*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte aufgedeckt werden, dass die Insulinsekretion serotoninabhängig ist. Tatsächlich ist schon lange bekannt, dass 5-HT zusammen mit Insulin ausgeschüttet wird, doch konnte dieser Umstand bisher durch kein Modell erklärt werden [214]. Wie von PAULMANN *et al.* gezeigt werden konnte, werden im Zuge der Insulinsekretion die für diesen Prozess essenziellen kleinen GTPasen Rab3a und Rab27a serotonyliert und so konstitutiv aktiviert. Diese Modifikation ist Ca<sup>2+</sup>-abhängig, und die Gabe des TGM-Inhibitors CTEA inhibiert in Insulinoma-Zellen sowohl die glukosestimulierte Insulinsekretion als auch die Serotonylierung der beiden GTPasen. Ähnlich der RhoA-Depletion in SMCs werden auch in Insulinoma-Zellen modifizierte Proteine ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut.

Interessanterweise kann 5-HT im Pankreas nicht nur parakrin sondern auch autokrin wirken, indem es mit Insulin kosekretiert wird und an 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bindet. Diese vermitteln durch G<sub>i</sub> eine Verringerung der cAMP-Spiegel, was in einer Inhibition der Insulinsekretion kulminiert [215]. Die bekannte oszillierende Insulinsekretion lässt sich somit durch eine Rückkopplungsschleife erklären, bei der hohe intrazelluläre 5-HT-Konzentrationen zunächst die Sekretion von Insulin- und 5-HT-haltigen Vesikeln befördern. Dies führt zu hohen extrazellulären Konzentrationen des Monoamins, die rezeptorvermittelt eine Inhibition der Sekretion bewirken, bis durch SERT-Aktivität das Gleichgewicht wieder in Richtung 5-HT<sub>i</sub>



verschoben wird und der Zyklus von neuem beginnt [213]. Serotonin wirkt in diesen Zellen also rezeptorunabhängig als Modulator der Insulinsekretion in einem Regelkreis aus stimulierter Sekretion durch Serotonylierung von Rab3a und Rab27a und reprimierter Sekretion durch 5-HT<sub>1A</sub>-Bindung (siehe Abbildung 7).

#### 4.4 Serotonylierung in differenzierenden Zellen

5-HT ist neben anderem für seine Rolle bei der Regulation der Zelldifferenzierung im ZNS und in der Peripherie bekannt. So wird 5-HT<sub>i</sub> u.a. während der Differenzierung von Megakaryozyten [216] und Osteoklasten [217] eine regulatorische Rolle zugeschrieben, da bei letzteren beispielsweise eine Inhibition des SERT die 5-HT-induzierte Differenzierung verhindert. Die Blockade des Transports von 5-HT in zytoplasmatische Vesikel dagegen verstärkt die Differenzierung [217]. Während der frühen Entwicklung des ZNS spielt 5-HT ebenfalls eine entscheidende Rolle [218], z.B. bei der Differenzierung glutamaterger Neuronen [219].

Auch TGM sind an Differenzierungsprozessen beteiligt. Allerdings wird die vermehrte Expression von TGM2 im Zuge der Differenzierung häufig als sekundärer Effekt von Retinolsäure-vermittelten Ereignissen angesehen [220]. In der Zelllinie SH-SY5Y hingegen wurde, wie bereits oben erwähnt, eine TGM-abhängige Transamidierung von RhoA im Zuge der neuronalen Differenzierung beobachtet [203]. Ob es sich hierbei um eine Serotonylierung oder um die Modifikation mit einem anderen endogenen Amin-Substrat handelt, ist hingegen unklar. Unter Zuhilfenahme der Ratten-Zelllinie A1A1v konnten DAI *et al.* kürzlich die Serotonylierung der kleinen GTPase Rac1 nachweisen (siehe Abbildung 7) [221]. Dabei wird durch Stimulation des G<sub>q/11</sub>-gekoppelten 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors und PLC-Aktivierung Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> mobilisiert, das Calmodulin und TGM2 aktiviert [222]. Die Beteiligung der Gewebs-TGM konnte hier durch spezifischen *knock-down* und CTEA-Gabe nachgewiesen werden. Allerdings konnte, obwohl Rac1 bekannterweise die neuronale Differenzierung mit reguliert, keine Veränderung der Rac1-Serotonylierung nach Differenzierung beobachtet werden.

#### 4.5 Extrazelluläre Serotonylierung

Viele TGM sind neben ihrer zytosolischen Lokalisation auch im extrazellulären Raum zu finden, so z.B. fXIIIA und TGM2. Da auch Monoamine extrazellulär vorkommen, liegt die Möglichkeit einer Serotonylierung außerhalb der Zelle nahe. Allerdings sind extrazelluläre 5-HT-Konzentrationen beispielsweise im Blutplasma oder im Nucleus accumbens niedrig (0,04 bzw. 0,20 nM), wohingegen in Thrombozyten-Granula bis zu 0,5 M 5-HT gemessen wurden [223,224,25]. Dennoch wurde bereits 2002 eine kovalente 5-HT-Modifikation von

Proteinen im Blutplasma beschrieben: Von Thrombozyten sekretiertes 5-HT wird TGM-vermittelt kovalent an Fibrinogen gebunden, was zu einer erhöhten Retention prokoagulatorischer Substanzen an der Oberfläche der Zellen führt [225,226]. Ob im Falle dieser sogenannten COAT-Thrombozyten TGM2 oder fXIIIa für die Serotonylierung verantwortlich ist, bleibt allerdings unklar. Eine weitere Erklärung für das Auftreten von serotonylierten Proteinen ausserhalb von Zellen könnte die Sekretion modifizierter Proteine sein, wie sie für das oben beschriebene Fibronectin in SMCs in Frage kommt [209].

Des Weiteren ist die Serotonylierung von Fibronectin durch extrazelluläre TGM auch für C6-Glioma-Zellen beschrieben [227]. Dabei bewirkt die exogene Zugabe von TGM2 zu der Zelllinie eine verstärkte Aggregation von ECM-Proteinen, die in der Serotonylierung von Fibronectin begründet ist (siehe Abbildung 7). Allerdings konnte die extrazelluläre Lokalisation der TGM für das ZNS bisher nicht nachgewiesen werden.

## 5 Zielsetzung

Das biogene Monoamin 5-HT wirkt nicht nur als Neurotransmitter, sondern auch als Gewebshormon. Unter anderem wurde kürzlich unter Zuhilfenahme eines Tryptophan-Hydroxylase 1-defizienten Mausmodells entdeckt, dass 5-HT im Zuge der Thrombozytenaggregation kovalent mit Proteinen verknüpft wird. Diese durch das Enzym TGM katalysierte posttranslationale Modifikation (Serotonylierung) bewirkt bei kleinen GTPasen der Rab-Familie eine verstärkte Effektorbindung. Ein ähnlicher Mechanismus konnte im Folgenden in SMC, pankreatischen  $\beta$ -Zellen sowie Glioma-Zellen und kortikalen Neuronen nachgewiesen werden.

Da die biogenen Monoamine HA, DA und NE ebenfalls eine primäre Aminofunktion besitzen und zudem aus der älteren Literatur bekannt ist, dass die Neurotransmitter und Hormone als Amin-Donor-Substrate für TGM wirken können, sollte in dieser Promotion ergründet werden, ob die allgemeinere Monoaminylierung einen generellen Mechanismus in der Signaltransduktion darstellt. So stellte sich zunächst die Frage nach Spezifität und Reaktivität der TGM-vermittelten Monoaminylierung unterschiedlicher Proteinsubstrate wie kleiner und heterotrimerer GTPasen und Phospholipasen. Zur umfassenden Betrachtung der Abhängigkeit von Amin-Donor-Substrat (5-HT, HA, DA, NE), Enzym (TGM1, TGM2, TGM3, fXIII) und Q-Substrat bot sich eine *in vitro*-Analyse der Inkorporation [ $^3$ H]-markierter Monoamine an. Des Weiteren sollten anhand eines ausgewählten Proteinsubstrates kinetische Parameter sowie der spezifisch modifizierte Q-Rest ermittelt werden. Vertiefende Experimente zum Einfluss der HA-Inkorporation auf GTP-Hydrolyse und Effektorbindung kleiner und heterotrimerer GTPasen sollten außerdem das Verständnis der Modulation bestimmter Signalwege erweitern. Um die Frage nach einer generellen Bedeutung der TGM-vermittelten Protein-Monoaminylierung zu beantworten, sollten weiterhin ausgewählte Zelllinien in Bezug auf Monoamin-Transporter- und TGM-Expression charakterisiert und auf proteingebundene Monoamine überprüft werden. Besonderes Augenmerk verdiente dabei die Dopaminylierung, da das Auftreten kovalent mit DA modifizierter Proteine bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson'schen Krankheit beobachtet worden war.

Welcher Signalweg tatsächlich durch den Mechanismus moduliert wird, kann jedoch nur durch spezifische Isolierung und Identifizierung modifizierter Proteine bestimmt werden. Dies sollte z.B. unter Verwendung von Biotin-markierten Monoamin-Derivaten durch Affinitätsaufreinigung und massenspektrometrische Charakterisierung erfolgen.

## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Materialien

#### 1.1 Chemikalien

##### 1.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka und Merck in *per analysis*-Qualität bezogen. Für Inkorporations- und Hydrolyseversuche wurden Radiochemikalien der Firma GE Healthcare entsprechend Tabelle 2 eingesetzt.

**Tabelle 2:** Radiochemikalien.

Radiochemikalie	spezifische Aktivität
5-Hydroxy[ <sup>3</sup> H]-Tryptamin-Trifluoroacetat	88-109 Ci/mmol
[2,5- <sup>3</sup> H]-Histamin-Dihydrochlorid	51-52 Ci/mmol
[7,8- <sup>3</sup> H]-Dopamin	45-66 Ci/mmol
L-[7,8- <sup>3</sup> H]-Noradrenalin	12 Ci/mmol
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-GTP	~400 Ci/mmol
1-stearoyl-2-[1- <sup>14</sup> C]arachidonyl-L-3-Phosphatidylcholin	56 mCi/mmol

**Tabelle 3:** Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Kaninchen-anti-5-HT (S5545; Charge 106K4764)	Sigma
Maus-anti-Penta-His (34660)	Qiagen
Maus-anti-GST (sc-138)	Santa Cruz Biotechnology
Maus-anti-NPM1 (B0556)	Sigma
Kaninchen-anti-G $\alpha$ 1 (sc-387)	Santa Cruz Biotechnology
Ziege-anti-RGS4 (sc-6203)	Santa Cruz Biotechnology
Maus-anti-GFP (11 814 460 001)	Roche
Ziege-anti-Maus-IgG, HRP konjugiert (A0168)	Sigma
Maus-anti-Kaninchen-IgG, HRP konjugiert (A20744)	Sigma
Esel-anti-Ziege-IgG, HRP konjugiert (sc-2020)	Santa Cruz Biotechnology
Streptavidin-HRP	Thermo Scientific

##### 1.1.2 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit eingesetzte kommerzielle Antikörper sind in

Tabelle 3 zusammengestellt. Selbst hergestellte Antikörper werden in Abschnitt II.5.2.2 beschrieben.

### 1.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzung von Lösungen, Puffern und Medien ist im jeweiligen Abschnitt beschrieben. Dabei handelte es sich im allgemeinen um wässrige Lösungen, die, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur gelagert wurden. Falls angegeben, wurden diese vor Verwendung für 30 min bei 125 °C autoklaviert.

### 1.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen BioTez oder MWG hergestellt. Ihre Sequenz ist im Anhang A in Tabelle 12 wiedergegeben.

## 1.2 Bakterienstämme und Zelllinien

In Tabelle 4 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt, eine Zusammenstellung der eingesetzten Zelllinien findet sich in Tabelle 5.

**Tabelle 4:** Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	(F <sup>+</sup> - endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\delta$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> - m <sub>K</sub> +), $\lambda$ -	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>+</sup> - ompT hsdS(r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -), gal, dcm+	Stratagene

**Tabelle 5:** Zelllinien.

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Quelle
3T3-L1	Maus	präadipozytische Fibroblasten	ATCC, CL-173
Cos-7	Grüne Meerkatze	Nieren-Fibroblasten	ATCC, CRL-1651
HepG2	Mensch	Hepatozyten	ATCC, HB-8065
HPA-SMC	Mensch	glatte Gefäßmuskelzellen	Promo Cell, C-12521
P815	Maus	Mastozytoma	ATCC, TIB-64
PC12	Ratte	Phäochromozytoma	ATCC, CRL-1721
Jurkat	Mensch	Lymphoblasten	ATCC, TIB-152
EF	Maus	embryonale Fibroblasten	eigene Herstellung
ANSC	Maus	adulte neuronale Stammzellen	J. Priller, Charité Berlin

## 2 Molekularbiologische Methoden

### 2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach BIRNBOIM & DOLY [228] mittels alkalischer Lyse oder, wenn eine erhöhte Reinheit erforderlich war, unter Verwendung der NucleoSpin Plasmid oder NucleoBond Xtra Maxi Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen wurde das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben eingesetzt.

#### 2.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Unter Verwendung des TRIzol-Reagenz (Invitrogen) wurde Gesamt-RNA aus Zellkulturen isoliert. Dazu wurden ca.  $10^7$  pelletierte Zellen in 1 ml TRIzol resuspendiert und nach Herstellerangaben verarbeitet. Die RNA wurde dann in RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

RNase-freies Wasser ..... 0,1 % (v/v) DEPC; 12 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschüttelt; autoklaviert

#### 2.1.3 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren wurden mit Hilfe eines BioPhotometers (Eppendorf) bei 260 nm bestimmt. Bei einer OD von 1 nimmt man dabei eine Konzentration von  $50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dsDNA und  $40\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ssRNA an. Mittels des Verhältnis von 260/280 nm lässt sich weiterhin die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. Alternativ wurde die Konzentration von DNA durch Vergleich mit einem Massenstandard (FastRuler; Fermentas) nach Agarose-Gelelektrophorese ermittelt.

#### 2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde 0,7-1,3 % (w/v) Agarose in 0,5 % TBE aufgekocht, mit  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid versetzt und in Gelkammern gegossen. Mit DNA-Ladepuffer versetzte Proben wurden dann für 20 min einer Elektrophorese bei 120 V unterzogen. Banden wurden auf einem UV-Transilluminator (BioRad) durch UV-Licht visualisiert und fotografiert. Als Größenstandards wurden entweder selbst hergestellte  $\lambda$ -DNA/*EcoR* I/*Hind* III-Präparate oder handelsübliche DNA-Standards (Fermentas) verwendet.

TBE-Puffer ..... 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 4 mM EDTA; pH 8,0

6 x DNA Probenpuffer ..... 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 15 % (w/v) Ficoll

## 2.2 Manipulation von Nukleinsäuren

### 2.2.1 Spaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Die enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Fermentas) erfolgte nach Herstellerangaben. Um eine Religation zu verhindern wurden DNA-Fragmente falls erforderlich mittels *Antarctic* Phosphatase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Zur Ligation wurden Vektor und das entsprechende DNA-Fragment zunächst mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten, aufgereinigt und in einem molaren Verhältnis von 1:3 nach Angaben des Herstellers mit T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne DNA-Fragment.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Vervielfältigung von DNA wurden PCR-Ansätze entsprechend Tabelle 6 angefertigt. Zur analytischen Amplifikation wurde dabei eine Taq-Polymerase (laboreigene Herstellung) eingesetzt, während für präparative Arbeiten die Phusion-Polymerase (New England Biolabs) verwendet wurde. Letztere besitzt neben einer dsDNA-bindenden Domäne auch eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und eignet sich daher besonders zur fehlerfreien Vervielfältigung von längeren DNA-Strängen. Die Hybridisierungstemperaturen wurden für analytische Zwecke auf etwa 5 °C unterhalb der Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepasst, während für präparative Zwecke um ca. 2 °C erhöhte Temperaturen gewählt wurden. Die Ansätze wurden auf Eis zusammengestellt und in einen auf 95 °C temperierten Thermocycler (MJ Research, Eppendorf) gestellt. Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

10 x PCR-Puffer..... 100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3; autoklaviert; -20 °C

**Tabelle 6:** Zusammensetzung von PCR-Ansätzen.

analytische PCR		präparative PCR	
10-50 ng	DNA-Matrize	10-50 ng	DNA-Matrize
200 µM	dNTPs	200 µM	dNTPs
2 mM	MgCl <sub>2</sub>	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
je 0,2 µM	Oligonukleotide	je 0,2 µM	Oligonukleotide
2 U	Taq-Polymerase	0,5 U	Phusion-Polymerase
1 x	PCR-Puffer	1 x	Phusion-Puffer
ad 20-50 µl	ddH <sub>2</sub> O	ad 20-50 µl	ddH <sub>2</sub> O

**Tabelle 7:** Typisches PCR-Programm.

Temperatur	Zeit	Zweck	
95 °C	3 min	Initialdenaturierung	
95 °C	30 sek	Denaturierung	] 30 x
50-70 °C	30 sek	Hybridisierung	
72 °C	1 min/kb	Elongation	
72 °C	5 min	Endelongation	
4°C			

### 2.2.3 Sicherung von PCR-Produkten

Für Klonierungen vorgesehene PCR-Produkte wurden durch Einbringen in den Vektor pGEM-Teasy (Promega) gesichert. Dazu mussten die Produkte zunächst mit A-Überhängen versehen werden. Nachdem vorhandene DNA-Polymerasen durch Einfrieren und Auftauen bei -80 °C inaktiviert worden waren, wurde der Ansatz mit 1 x PCR-Puffer, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs sowie 2 U *Taq*-Polymerase (laboreigene Herstellung) versetzt. Die Polymerisation erfolgte dann für 10 min bei 72 °C. Die aufgereinigten Produkte wurden anschließend nach Herstellerangaben für eine Ligation verwendet, durch Transformation in *E. coli* XL1 blue eingebracht und die Bakterien einer Blau-Weiss-Selektion auf IPTG/X-Gal/LB-Agaroseplatten unterzogen.

10 x PCR-Puffer..... 100 mM Tris, 500 mM KCl; pH 8,3; autoklaviert; -20 °C

IPTG/X-Gal/LB-Agarose..... 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Bacto-Agar, 0,1 g/l Ampicillin, 0,3 mM IPTG, 0,005 % X-Gal; autoklaviert; 4 °C

### 2.2.4 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA wurde diese zunächst nach Herstellerangaben mit DNase I (RQ1 RNase-free DNase; Promega) behandelt. Die Transkription erfolgte anschließend mit einer reversen Transkriptase aus murinem Leukämie-Virus (M-MLV) und Random Primers (beides Promega) nach Angaben des Herstellers. Das Produkt wurde entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Als Kontaminationskontrollen dienten Ansätze ohne M-MLV, und der Erfolg der cDNA-Synthese wurde durch Nachweis der Transkription des Haushaltsgens GAPDH mittels PCR überprüft.

### 2.2.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Didesoxymethode [229] durch die Firma MWG Operon.



## 2.3 Arbeiten mit Bakterienkulturen

### 2.3.1 Transformation von Bakterienzellen

Zur Transformation von *E. coli* wurden 50 µl transformationskompetenter Zellen für 5 min auf Eis aufgetaut, mit 10-100 µg DNA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 sek bei 42 °C und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Zur Regeneration der Zellen wurde der Ansatz mit 500 µl vorgewärmtem LB-Medium versetzt und unter Schütteln für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Zentrifugation bei 700 x g durchgeführt und das Bakterienpellet in 80 µl LB-Medium resuspendiert. Die Selektion erfolgte dann durch Ausplattieren auf antibiotikahaltige LB-Agaroseplatten (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Chloramphenicol oder 25 µg/ml Zeocin) und Inkubation bei 37 °C über Nacht. Bei Anwendung der Blau-Weiss-Selektion wurde die betreffende LB-Agaroseplatte vor dem Ausplattieren mit 100 µl 100 mM IPTG und 20 µl 50 g/l X-Gal bestrichen und für 30 min bei 37 °C getrocknet.

LB-Medium..... 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; autoklaviert; 4 °C

LB-Agarose..... 15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium; autoklaviert, auf 60 °C abgekühlt und mit den entsprechenden Antibiotika versehen; 4 °C

### 2.3.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente Bakterienkulturen wurden hergestellt, indem 100 ml einer frischen Übernachtskultur ( $OD_{578}=0,45-0,55$ ) des entsprechenden *E. coli*-Stammes zunächst auf Eis abgekühlt und für 5 min bei 700 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Die Bakterien wurden dann in 20 ml eiskaltem TFB I aufgenommen und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 700 x g und 4 °C wurde der Niederschlag in 4 ml eiskaltem TFB II resuspendiert und sofort in 50 µl-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

LB-Medium..... 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; autoklaviert; 4 °C

TFB I..... 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM KOAc, 15 % (v/v) Glycerol; pH 6,1; sterilfiltriert; 4 °C

TFB II..... 10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS, 15 % (v/v) Glycerol; pH 7,0; sterilfiltriert; 4 °C

### 2.3.3 Langzeitlagerung von Bakterien

Glycerinkulturen von etablierten *E. coli*-Präparationen wurden angelegt, indem 4 ml einer frischen Übernachtskultur für 15 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Der Niederschlag wurde dann in 1 ml LB-Medium resuspendiert, mit 1 ml 87 % Glycerol versetzt, auf 4 °C abgekühlt und mindestens 24 h bei -20 °C aufbewahrt. Die Lagerung erfolgte dann bei -80 °C.

LB-Medium..... 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; autoklaviert; 4 °C

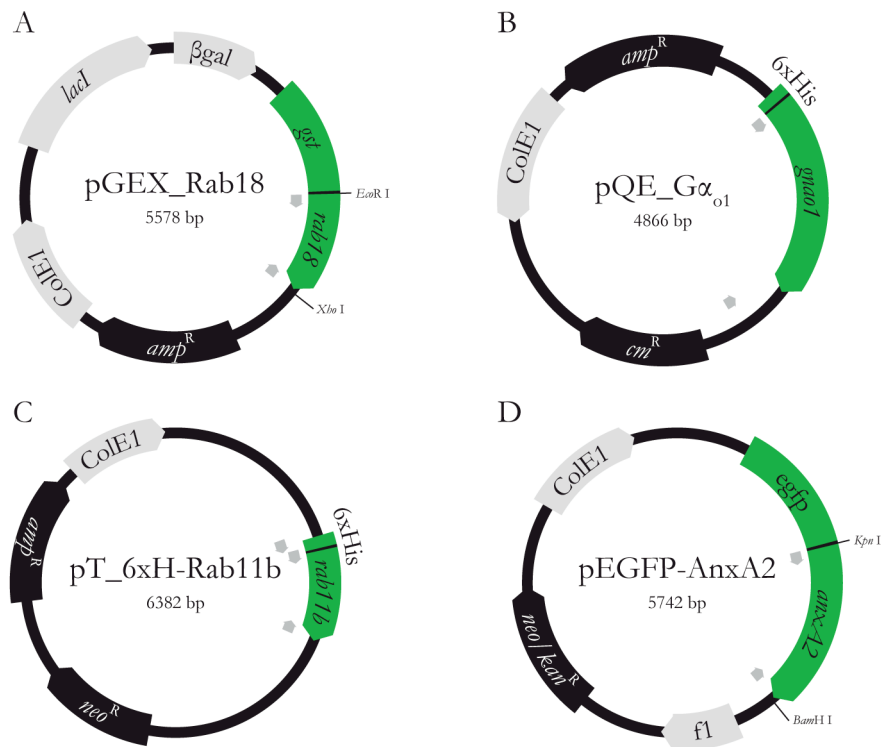
### 3 Klonierungsstrategien

#### 3.1 pGEX-Expressionskonstrukte

Konstrukte zur Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden mit Hilfe des Vektors pGEX-4T-1 (GE Healthcare) hergestellt. Dazu wurde entsprechend Tabelle 8 zunächst eine PCR mit den angegebenen Oligonukleotiden ausgehend von cDNA aus dem aufgeführten Gewebe oder der Zellkultur, oder direkt von Plasmid-DNA durchgeführt. Das Produkt, das nun flankierende Restriktionsschnittstellen enthielt, wurde dann mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt, mit A-Überhängen versehen und in den Vektor pGEM-Teasy (Promega) gesichert. Nach einer Sequenzierung wurde der Plasmid mit den passenden Restriktionsendonukleasen verdaut, das gewünschte Fragment mittels Agarosegelelektrophorese isoliert und in den mit den gleichen Endonukleasen behandelten Vektor pGEX-4T-1 ligiert. Abbildung 8 A zeigt eine für pGEX-Expressionskonstrukte typische Plasmidkarte am Beispiel von Rab18. Nicht aufgeführte Konstrukte lagen aus laboreigener Herstellung bereits vor.

**Tabelle 8:** Klonierungsstrategien für pGEX-Expressionskonstrukte.

ORF	Spezies	Matrize	Oligonukleotide	Restriktionsschnittstellen	Anmerkungen
Rab1b	Maus	3T3-L1 (cDNA)	Rab1b_Eco_fw; Rab1b_Eag_rv	<i>EcoR</i> I & <i>Eag</i> I	-
Rab5a	Maus	Gehirn (cDNA)	mRab5a_fw; mRab5a_rv	<i>Xma</i> I & <i>Xho</i> I	-
Rab10	Maus	Gehirn (cDNA)	mRab10_fw; mRab10_rv	<i>BamH</i> I & <i>Xho</i> I	-
Rab11b	Maus	Gehirn (cDNA)	Rab11b_fw; Rab11b_rv	<i>BamH</i> I & <i>Xho</i> I	-
Rab18	Maus	Gehirn (cDNA)	Rab18_fw; Rab18_rv	<i>EcoR</i> I & <i>Xho</i> I	-
Rab31	Maus	Gehirn (cDNA)	mRab31_fw; mRab31_rv	<i>BamH</i> I & <i>Xho</i> I	-
Rab27core	-	-	Rab27core_fw; Rab27core_rv	<i>EcoR</i> I & <i>Not</i> I	Hybridisierung der beiden Oligonukleotide erzeugt das gewünschte Fragment
NPM1	Maus	ES-Zellen (cDNA)	mNPM1_fw; mNPM1_rv	<i>BamH</i> I & <i>Xma</i> I	



**Abbildung 8: Expressionskonstrukte.** (A) Das Plasmid pGEX\_Rab18 erlaubt die Überexpression von GST-Rab18 in *E. coli*. (B) Das durch T-Klonierung hergestellte Konstrukt pQE\_G $\alpha_{01}$  vermittelt eine Ampicillin- und Kanamycinresistenz und ermöglicht in *E. coli* die Expression von 6xHis-G $\alpha_{01}$ . (C) Das auf pTarget basierende Konstrukt pT\_6xH-Rab11b trägt ein Ampicillin- sowie Neomycinresistenzgen. Säugerzellen, die dieses Plasmid tragen, exprimierten das Fusionsprotein 6xHis-Rab11b. (D) EGFP-Annexin A2 kann mit Hilfe des Konstrukts pEGFP\_AnxA2 in Säugerzellen exprimiert werden. Dabei erlaubt die *neo/kan*<sup>R</sup>-Kassette eine Selektion der Zellen. (A-D) Grau unterlegte Pfeile markieren die Position der verwendeten Oligonukleotide.

### 3.2 pQE-Expressionskonstrukte

Zur Expression von 6xHis-Fusionsproteinen wurden Konstrukte auf der Basis der Vektoren pQE-40 oder pQE-30 (beide Qiagen) hergestellt. Für pQE-Rab3a wurde dabei zunächst eine PCR aus muriner Gehirn-cDNA mit den Oligonukleotiden Rab3a\_fw und Rab3a\_rv durchgeführt. Nach Sicherung des Produktes in pGEM-Teasy (Promega) wurde das entsprechende Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I ausgeschnitten, aufgereinigt und in den zuvor mit den gleichen Endonukleasen geschnittenen Vektor pQE-40 ligiert. Der Vektor pQE\_G $\alpha_{01}$  wurde generiert, indem zunächst mit den Oligonukleotiden Galphao\_fw und GST-Galphao1-rv ausgehend von GST-G $\alpha_{01}$  (laboreigene Herstellung) in einer PCR der entsprechende ORF amplifiziert wurde. Anschließend wurde das aufgereinigte Fragment mit A-Überhängen versehen, nach Herstellerangaben in den Vektor pQE-30UA (Qiagen) kloniert und sequenziert. Abbildung 8 B zeigt exemplarisch die Plasmidkarte von pQE\_G $\alpha_{01}$ .

### 3.3 pTarget-Expressionskonstrukte

Das kommerzielle, T-Vektor-basierte Klonierungssystem pTarget (Promega) erlaubt die Generierung von Expressionskonstrukten für Säugerzellen. Dabei unterliegt die Expression des gewünschten Genprodukts der Kontrolle eines CMV-Promotors, und die Herstellung stabil transgener Zelllinien wird durch die Anwesenheit einer Neomycin-Resistenzkassette ermöglicht. Zur Herstellung von Expressionsvektoren für 6xHis-Fusionsproteine wurde entsprechend Tabelle 9 ausgehend von der angegebenen Matrize mit den aufgeführten Oligonukleotiden zunächst eine PCR zur Amplifikation des gewünschten ORF durchgeführt. Das Produkt wurde dann einer zweiten PCR-Reaktion unterworfen, in welcher mit Hilfe des Oligonukleotids 6xHis\_fw und des jeweiligen spezifischen *Antisense*-Oligonukleotids an der 5'-Seite die Sequenz für das Nonapeptid RGSHHHHHHH sowie ein Startcodon und die Restriktionsschnittstelle für *EcoRI* angefügt wurde. Das Amplikon wurde dann mit A-Überhängen versehen, nach Herstellerangaben in pTarget eingebracht und sequenziert. In Abbildung 8 C ist als Beispiel für pTarget-Expressionskonstrukte die Plasmidkarte von pT\_6xH\_Rab11b abgebildet.

**Tabelle 9:** Klonierungsstrategien für pTarget-Expressionskonstrukte.

ORF	Spezies	Matrize	Oligonukleotide	Anmerkungen
Rab5c	Maus	pGEX_Rab5c	pTRab5c_fw; pTRab5c_rv	-
Rab8a	Maus	3T3-L1 (cDNA)	mRab8a_fw; mRab8a_rv; 6xHRab8a_fw; 6xHRab8a_rv	Zwei-Schritt-PCR zur Voramplifikation
Rab10	Maus	pGEX_Rab10	pTRab10_fw; pTRab10_rv	-
Rab11b	Maus	pGEX_Rab11b	6xHRab11b_fw; 6xHRab11b_rv	-
Rab14	Maus	3T3-L1 (cDNA)	mRab14_fw; mRab14_rv; 6xHRab14_fw; 6xHRab14_rv	Zwei-Schritt-PCR zur Voramplifikation
Rab31	Maus	pGEX_Rab31	pTRab31_fw; pTRab31_rv	-
Cdc42	Maus	pGEX_cdc42	6xHcdc42_fw; 6xHcdc42_rv	-
RhoA	Maus	pGEX_RhoA	6xH-RhoA_fw; mRhoA_rv	-
Rac1	Maus	3T3-L1 (cDNA)	mRac1_fw; mRac1_rv; 6xHRac1_fw; 6xHRac1_rv	Zwei-Schritt-PCR zur Voramplifikation

### 3.4 pEGFP-Expressionskonstrukte

Die Herstellung von pEGFP-Expressionskonstrukten erfolgte, indem nach Tabelle 10 zuerst eine PCR mit den entsprechenden Oligonukleotiden und Matrizen durchgeführt wurde. Das Produkt wurde analog zu Abschnitt II.3.1 aufgereinigt und in pGEM-Teasy eingebracht. Nach Sequenzierung und Restriktion mit den angegebenen Endonukleasen wurde das Amplikon dann in den ebenfalls mit Restriktionsendonukleasen behandelten Vektor pEGFP-C1 (Clontech) ligiert. Abbildung 8 D illustriert die Struktur von pEGFP-Expressionskonstrukten am Beispiel von Annexin A2 (AnxA2).

**Tabelle 10:** Klonierungsstrategien für pEGFP-Expressionskonstrukte.

ORF	Spezies	Matrize	Oligonukleotide	Restriktions-schnittstellen	Anmerkungen
Rab1b	Maus	3T3-L1 (cDNA)	mRab1b_fw; mRab1b_rv	<i>Kpn</i> I & <i>Sac</i> I	
RhoA	Maus	pGEX_RhoA	mRhoA_fw; mRhoA_rv	<i>Xho</i> I & <i>Sac</i> II	
AnxA2	Maus	3T3-L1 (cDNA)	AnxA2_GFP_fw; AnxA2_GFP_rv	<i>Kpn</i> I & <i>Bam</i> HI	
$\alpha$ Eno1	Maus	Niere (cDNA)	AlphaEno1_NoRS_fw; AlphaEno1_NoRS_rv; mAlphaEno1b_fw; mAlphaEno1b_rv	<i>Kpn</i> I & <i>Sac</i> I	Zwei-Schritt-PCR zur Voramplifikation

## 4 Zellkulturen

### 4.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (HeraSafe, Heraeus) durchgeführt. Die Kultur erfolgte mit sterilem Zellkulturmaterial (TPP, Greiner, Sarstedt) in einem Brutschrank (HeraCell, Heraeus) bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>. Um enthaltene Komplementfaktoren zu deaktivieren, wurde fötales Kälberserum (FBS, Gibco) vor Verwendung einmalig für 30 min auf 56 °C erhitzt. Medien und Zusätze wurden nach Sterilfiltration bei 4 °C oder -20 °C gelagert und vor Verwendung auf 37 °C erwärmt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 400 x g und 4 °C für 5 min durchgeführt. Zellzahlen wurden mikroskopisch (Axiovert 40, Zeiss) in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben toter Zellen mit Trypanblau bestimmt.

Die Kultur eukaryotischer Zellen erfolgte wie im folgenden beschrieben, wobei eine Passagierung im allgemeinen alle 2 bis 3 Tage durchgeführt wurde. Dazu wurden adhärent wachsende Zellen mit PBS/EDTA gewaschen, mit Hilfe von 5 % Trypsin/EDTA (Gibco) von der Kulturschale gelöst und nach Inaktivierung durch Zugabe von Kulturmedium in der gewünschten Dichte neu ausgesät. Suspensionszelllinien wurden passagiert, indem die entsprechende Anzahl Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und in frischem Medium aufgenommen wurde. Die Kultur von HPA-SMC erfolgte nach Herstellerangaben in Smooth Muscle Cell Growth Medium mit Supplement Mix (beides PromoCell). EF-, PC12- und ANSC-Zellen wurden in den jeweiligen unten angegebenen Medien kultiviert. Die Zelllinien P815 und Jurkat wurden in Medium R, während die 3T3-L1- und HepG2-Zellen in Medium D in Kultur gehalten wurden. Zur Kultur von PC12-Zellen wurden mit Collagen A (Biochrom) beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Besondere Verfahren in der Kultur der Zelllinien ANSC und EF [230] sowie HPA-SMC [231] wurden bereits beschrieben.

3T3-L1-Zellen wurden in der Weise passagiert, dass niemals eine vollständige Konfluenz erreicht wurde.

PBS/EDTA.....	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5), 2 g/l EDTA; autoklaviert
EF-Medium .....	DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 15 % (v/v) ES-FBS (PAN Biotech), 1 % MEM-NEAA (Gibco), 4 mM L-Gln, 0,6 mM 2-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (Lonza)
PC12-Medium .....	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 2mM L-Gln, 10 % (v/v) HS, 2,5 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (Lonza)
ANSC-Medium .....	DMEM/F12 (1:1), 2 mM L-Gln, 6 g/l Glukose, 10 mM HEPES, 4 mg/l Heparin, 2 g/l BSA Fraktion V, 23 mg/l Insulin, 20 µg/l EGF, 10 µg/l bFGF (PeproTech), 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (Lonza)
Medium R .....	RPMI 1640 mit 2 mM L-Gln, 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (Lonza)
Medium D.....	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 2mM L-Gln, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (Lonza)

#### 4.2 Differenzierung von 3T3-L1-Fibroblasten

Die Differenzierung von 3T3-L1-Fibroblasten zu Adipozyten erfolgte wie beschrieben [232], indem nach Erreichen der vollständigen Konfluenz zunächst 2 Tage weiter kultiviert wurde. Danach folgte eine 2-tägige Behandlung mit Differenzierungsmedium I, gefolgt von 2 Tagen mit Differenzierungsmedium II. Erfolgte die Kultur anschließend wieder in Medium D, zeigten die Zellen nach 2-7 Tagen eine für Adipozyten charakteristische Morphologie.

Medium D.....	DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 2mM L-Gln, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (Lonza)
Differenzierungsmedium I.....	0,5 µM Insulin, 0,5 mM IBMX, 1,02 µM DXM in Medium D
Differenzierungsmedium II .....	0,5 µM Insulin in Medium D

#### 4.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Nach dem Ablösen mit 5 % Trypsin/EDTA (Gibco) wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Resuspendieren in kaltem Einfriermedium auf etwa  $1-1,5 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Je 1,4 ml der Zellsuspension wurde dann in ein Cryo-Röhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Das Einfrieren erfolgte dann in einer Styroporbox bei -80 °C. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37 °C temperiert und sofort mit vorgewärmtem Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden danach zentrifugiert, in Kulturmedium aufgenommen und auf eine Kulturschale gegeben.

PBS.....	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5); autoklaviert
Einfriermedium.....	Kulturmedium mit zusätzlich 20 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) DMSO

#### 4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte mit Hilfe des auf Liposomen basierenden Reagenz Dreamfect (OzBiosciences) nach Herstellerangaben. Zur Generierung transient transfizierter Zelllinien wurden mittels NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) aufgereinigte Plasmide verwendet, während der betreffende Plasmid für stabile Transfektionen zuvor mittels Restriktion linearisiert und ebenfalls aufgereinigt wurde. Mit der Selektion stabil transfizierter Zellen wurde 2-4 Tage nach Transfektion begonnen, wobei das Neomycin-Analogon G418 (Lonza) im Allgemeinen in einer Konzentration von 500 µg/ml eingesetzt wurde.

#### 4.5 Monoaminylierungsexperimente in eukaryotischen Zellen

Zur Quantifizierung von intrazellulären und proteingebundenen Monoaminen wurden zunächst etwa  $1 \times 10^6$  Zellen in eine 12-Kavitäten-Platte eingesät. 5 µCi [<sup>3</sup>H]-markiertes 5-HT, HA, DA oder NE wurden dann in 400 µl Kulturmedium auf die Zellen gegeben und für 3 h weiter kultiviert. Nach Entfernen des Mediums und zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe von 5 % Trypsin/EDTA (Gibco) abgelöst und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann zweimal mit PBS gewaschen und bei -80 °C schockgefroren. Der Zugabe von 100 µl 300 mM PCA folgte die mechanische Lyse mit Hilfe eines Pistills für etwa 30 sek. Mit 400 µl 300 mM PCA wurde die Probe dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das alte Gefäß sowie Pipettenspitze und Pistill sorgfältig mit 1 ml 300 mM PCA nachgespült. Proteingebundene Radioaktivität wurde anschließend durch Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C für 15 min von der zytosolisch vorliegenden Aktivität getrennt. Der Niederschlag wurde schließlich mit 100 µl 10 % SDS versetzt, resuspendiert und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Von allen Fraktionen wurden jeweils 100 µl in ein Szintillationsgefäß (PolyvialsV, Zinsser Analytic) transferiert und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (ReadyProtein+, Beckman Coulter) in einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) für 1 min vermessen.

PBS.....140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5); autoklaviert

## 5 Biochemische Methoden

### 5.1 Isolierung und Analyse von Proteinen

#### 5.1.1 *Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen*

Die Expression von GST-Fusionsproteinen erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die zuvor mit dem Vektor pREP4-groESL (P. Caspers, Hoffmann-LaRoche, Basel) transformiert wor-

den waren. Die Koexpression der beiden Chaperone GroES und GroEL, die durch dieses Konstrukt vermittelt wird, verbessert deutlich die Ausbeute und Reinheit der rekombinanten Proteine [233]. Mit pGEX-Expressionskonstrukten transformierte Bakterienkulturen wurden in 200 ml 2 x YT/Amp/Kan-Medium bis zu einer  $OD_{578}$  von 0,7 kultiviert und die Proteinüberexpression dann durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach 2,5 h Kultur bei 37 °C und 225 rpm wurden die Kulturen geerntet, indem eine Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C für 15 min durchgeführt wurde. Nach Zugabe von 400 µl 50 x Proteaseinhibitor (Complete, Roche) wurden die Bakterien bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Lyse wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS, Resuspendieren und Versetzen mit einer Spatelspitze Lysozym eingeleitet. Nach Invertieren (15 min, 4 °C) und Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (3 x 30 sek). Es wurden daraufhin 2 ml 10 % (v/v) TritonX-100 zugegeben, für 30 min bei 4 °C invertiert und zentrifugiert (12000 x g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit 200 µl gewaschener Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) versetzt und über Nacht bei 4 °C invertiert. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 500 x g und 4 °C wurde die Affinitätsmatrix dann vom Lysat abgetrennt und zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach einem Waschschrift mit 350 µl GroESL-Waschpuffer zum Entfernen der koexprimierten Chaperone [234] folgte die Elution der GST-Fusionsproteine durch dreimaliges Invertieren mit 350 µl GST-Elutionspuffer bei 4 °C für 15 min und Zentrifugation. Abschließend wurden die Eluate, nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung, mit 10 % (v/v) Glycerol versetzt und in 50 µl-Portionen bei -80 °C gelagert.

2 x YT-Medium.....	16 g/l Select Trypton 140, 10 g/l Select Yeast Extract, 5 g/l NaCl; autoklaviert; 4 °C
2 x YT/Amp/Kan-Medium.....	2 x YT-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin
PBS.....	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5); autoklaviert
GroES-Waschpuffer.....	50 mM Triethanolamin, 50 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM ATP; pH 7,5; autoklaviert
GST-Elutionspuffer .....	20 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris/HCl pH 7,4; -20 °C

### 5.1.2 Expression und Aufreinigung von 6xHis-Fusionsproteinen

Die Expression von 6xHis-Fusionsproteinen wurde in Analogie zu II.5.1.1 in *E. coli* BL21(DE3) unter Zuhilfenahme von pREP4-groESL durchgeführt. Um eine verbesserte Proteinausbeute zu erhalten wurde mit einer Autoinduktions-Prozedur gearbeitet [235]. Dazu wurden 200 ml antibiotikahaltiges Autoinduktionsmedium mit 1 ml einer Vorkultur der zuvor mit einem pQE-Expressionsvektor transformierten Bakterien versetzt und bis zum Erreichen des Wachstumsplateaus bei 20 °C und 225 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und gelagert. Die Isolierung von 6xHis-Fusionsproteinen wurde erreicht, indem die Bakterien zunächst in 10 ml eiskaltem Ni-NTA-Lysepuffer



resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und für 15 min bei 4 °C invertiert wurden. Nach einer Ultraschallbehandlung (3 x 30 sek) wurde 500 µl 10 % (v/v) TritonX-100 zugegeben, 30 min bei 4 °C invertiert und schließlich für 20 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zum geklärten Lysat wurden dann 500 µl gewaschene Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gegeben und der Ansatz über Nacht bei 4 °C invertiert. Nach einer Zentrifugation (2000 x g, 5 min, 4 °C) wurde die Affinitätsmatrix zweimal mit 10 ml eiskaltem Ni-NTA-Waschpuffer und einmal mit 500 µl GroESL-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte schließlich durch Zugabe von 400 µl Ni-NTA-Elutionspuffer, 15-minütigem Invertieren bei 4 °C und Zentrifugation. Die Eluate wurden nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung mit 10 % (v/v) Glycerol versetzt und in 50 µl-Portionen bei -80 °C gelagert.

Autoinduktionsmedium .....	22 g/1 NZYM broth (Fluka), 0,5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (w/v) Glukose, 0,2 % α-D-Laktose, 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM NH <sub>4</sub> Cl, 5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin; autoklaviert; 4 °C
Ni-NTA-Aufreinigungspuffer .....	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl; pH 8.0; 4 °C
Ni-NTA-Lysepuffer .....	10 mM Imidazol in Ni-NTA-Aufreinigungspuffer
Ni-NTA-Waschpuffer.....	20 mM Imidazol in Ni-NTA-Aufreinigungspuffer
Ni-NTA-Elutionspuffer .....	250 mM Imidazol in Ni-NTA-Aufreinigungspuffer
GroES-Waschpuffer.....	50 mM Triethanolamin, 50 mM KCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM ATP; pH 7,5; autoklaviert

### 5.1.3 Herstellung von Zellextrakten

Zellextrakte wurden entweder unter Verwendung des nicht-denaturierenden Lysepuffers Z oder des denaturierenden RIPA-Lysepuffers hergestellt. Dazu wurden Zellen geerntet, durch Zentrifugation (400 x g, 5 min, 4 °C) pelletiert und im jeweiligen Lysepuffer aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C für 5 min abgetrennt und das geklärte Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Lysepuffer Z.....	150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM NaVO <sub>3</sub> , 10 % (v/v) Glycerol, 1 x Proteaseinhibitor (Complete, Roche), 1 % (v/v) TritonX-100; 4 °C
RIPA-Lysepuffer.....	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 % (v/v) NP-40, 0,5 % (v/v) DOC, 0,1 % (w/v) SDS; 4 °C

### 5.1.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der BRADFORD-Methode [236] unter Verwendung des BradfordReagent (Sigma) nach Herstellerangaben bestimmt.

### 5.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-PAGE [237,238] in Mini-Protean-II-Kammern (BioRad). Nach dem Versetzen der Proben

mit SDS-Probenpuffer wurden diese für 5 min auf 95 °C erhitzt und mit einem Größenstandard (PageRuler Protein Ladder, Fermentas) auf das vorbereitete Gel aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte dann für 20 min bei 80 V und 1 h bei 200 V. Die Analyse der Gele erfolgte durch Coomassie- oder Silberfärbung, durch Immunoblotting, durch Autoradiographie oder Fluoreszenzdetektion.

Sammelgelpuffer.....	130 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,8), 4,8 % (w/v) Acrylamid/BIS (29:1), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Sammelgelpuffer.....	375 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 8,8), 8-16 % (w/v) Acrylamid/BIS (29:1), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,04 % (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer.....	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
5 x SDS-Probenpuffer .....	0,225 M Tris/HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerol, 5 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M DTT, 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; -20 °C

### 5.1.6 Coomassie- und Silberfärbung

Coomassie-Färbungen wurden unter Verwendung von kolloidalem Coomassie-Farbstoff (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) nach den Angaben des Herstellers vorgenommen. Auf Nitrozellulose-Membranen transferierte Proteine wurden angefärbt, indem mit oben genanntem Farbstoff behandelte Membranen mit WB-Entfärbungslösung über Nacht unter Schütteln inkubiert wurde. Silberfärbungen und Entfärbungen erfolgten mit Pierce Silver Stain Kit for MS (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben.

WB-Entfärbungslösung.....	50 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure
---------------------------	---

### 5.1.7 Immunoblotting

Das Immunoblotting erfolgte nach dem *semidry*-Verfahren (BioRad Trans-Blot SD Cell) unter Verwendung von Nitrozellulose-Membranen (HybondECL, GE Healthcare). Dazu wurden 1,4 mm dickes, mit Transferpuffer gesättigtes Whatman-Papier (Roth), die Membran, das betreffende Gel und eine weitere Lage Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Anode der Apparatur geschichtet. Der Transfer erfolgte dann für 45 min bei einer konstanten Spannung von 16 V. Der Erfolg des Transfers wurde durch Ponceau-Färbung überprüft. Dabei wurde die Membran zunächst mit PBST gewaschen und dann für 5 min mit Ponceau-Lösung inkubiert. Nach einem Entfärbungsschritt mit Wasser und der Analyse erfolgte die vollständige Entfärbung durch Schütteln mit PBST. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden abgesättigt, indem diese für 1 h mit Blockierungspuffer unter Schütteln inkubiert wurde. Danach wurde die Membran für 1 h oder über Nacht mit dem Erstantikörper in Antikörperpuffer behandelt, dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und schließlich für 1 h mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Zweitantikörper in PBST geschüttelt. Die Detektion wurde mit frisch angesetzter ECL-Lösung (Western Lightning

Chemoluminescence Reagent Plus, PerkinElmer) nach drei 10-minütigen Waschschritten mit PBST durchgeführt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms (SuperRX, Fujifilm) und Entwicklung (Agfa Curix 60) konnten die detektierten Banden abschließend dokumentiert werden.

Transferpuffer .....	39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0375 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> , 20 % (v/v) Methanol
Ponceau-Lösung .....	2 g/l Ponceau S, 30 g/l TCA, 30 g/l Sulfosalicylsäure
PBST .....	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 % (v/v) Tween 20
Blockierungspuffer .....	3 % (w/v) BSA in PBST; 4 °C
Antikörperpuffer.....	1 % (w/v) BSA in PBST, 0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in PBST; 4 °C

## 5.2 Immunochemische Methoden

### 5.2.1 Immunopräzipitation und GFP-Affinitätsaufreinigung

Die Präzipitation von NPM1 aus komplexen Proteingemischen erfolgte unter Verwendung einer magnetischen Protein-G-Matrix (Dynabeads Protein G; Invitrogen), indem diese zunächst mit PBS gewaschen und mit dem spezifischen Antikörper Maus-anti-NPM1 für 1 h bei 4 °C in PBS inkubiert wurde. Das jeweilige Zellysate wurde vorbereitet, indem unspezifische Bindungspartner durch Präinkubation mit 10-30 µl der Protein-G-Matrix entfernt wurden. Die Antikörpermatrix wurde nach einem weiteren Waschschriff mit dem gereinigten Zellysate versetzt und für 2 bis 4 h bei 4 °C invertiert. Es folgte ein Waschschriff mit PBS und die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und Immunoblotting oder, im Fall radioaktiver Proben, durch Szintillation. Dazu wurden an die Matrix gebundene Proteine durch Zugabe von 100 µl 10 % SDS und Inkubation für 5 min bei 95 °C eluiert und in 5 ml Szintillationslösung (ReadyProtein+, Beckman Coulter) überführt. Die Quantifizierung erfolgte dann nach 1 h Schütteln in einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) für 1 min.

GFP-Fusionsproteine wurden angereichert, indem das Reaktionssystem GFP-Trap\_M (ChromoTek) nach Angaben des Hersteller verwendet wurde. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

PBS.....	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5); autoklaviert
----------	--

### 5.2.2 Herstellung von Antiseren gegen monoaminylierte Proteine

Antiseren gegen 5-HT- oder HA-modifiziertes DMC wurde generiert, indem nach [231] vorgegangen wurde. Dazu wurde eine *in vitro*-Monoaminylierung (siehe II.5.3.1) mit 1 mg DMC (Sigma), 200 µM 5-HT oder HA sowie 25 mU TGM2 in einem Gesamtvolumen von 1,25 ml durchgeführt. Nach einer Inkubation von abweichend 24 h wurde der Ansatz lyophilisiert und durch die Firma BioGenes zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Für Immunofärbungen wurde die isolierte IgG-Fraktion der gewonnenen Antiseren eingesetzt. Um eine unspezifische Bindung zu minimieren, wurde den Antiseren vor Verwendung 1 g/l TGM2-behandeltes DMC ohne Monoamin zugefügt. Zur Anwendung kamen die Reagenzien dann in einer Verdünnung von 1:500 (Kaninchen-anti-DMC-5-HT) bzw. 1:4000 (Kaninchen-anti-DMC-HA).

### 5.3 TGM-vermittelte Transamidierung

#### 5.3.1 *In vitro*-Monoaminylierung

Die TGM-vermittelte Monoaminylierung wurde *in vitro* untersucht, indem 200 pmol des jeweiligen Proteins mit 1 mM DTT, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, Proteaseinhibitoren (Complete EDTA-free, Roche), und 8 pmol [<sup>3</sup>H]-markiertes Monoamin oder 200 μM MDC sowie 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 30 μl auf Eis kombiniert wurden. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 250 mU rekombinanter Maus-TGM1, 5 mU Meerschweinchenleber-TGM2, 25 mU rekombinanter humaner TGM3, 0,5 U rekombinanter humaner TGM7 (sämtlich Zedira) gestartet und für 30 min bei 30 °C durchgeführt. Für Reaktionen mit 10 mU humanem fXIIIA (Calbiochem) wurden die zu untersuchenden Proteine abweichend mit 50 mM DTT, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, Proteaseinhibitoren, Monoamin und 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 100 μl angesetzt. Die Reaktion wurde zudem für 15 min bei 37 °C durchgeführt.

Für TGM3 und fXIIIA war zur Aktivierung der TGM-Aktivität eine limitierte Proteolyse notwendig. Hierzu wurde 0,7 U TGM3 mit 0,2 μg Dispase II (Roche) und 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 10 μl für 20 min bei 30 °C inkubiert. FXIII wurde aktiviert, indem 1,5 mU Enzym mit 1 U bovinem Thrombin (Calbiochem) für 15 min bei 37 °C in 40 μl TBSC behandelt wurde. Die Inaktivierung der Protease erfolgte dann durch Zugabe von Proteaseinhibitoren.

TBSC ..... 20 mM Tris/HCl, 130 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4; 4 °C

#### 5.3.2 *Quantifizierung von radioaktiv markierten Proteinen durch Fällung*

Eine Quantifizierung der Monoaminylierung erfolgte, indem *in vitro*-Monoaminylierungsansätze durch Zugabe von 1 g/l BSA und 25 % (w/v) PCA abgestoppt und enthaltene Proteine für 2 h auf Eis gefällt wurden. Nicht gebundene [<sup>3</sup>H]-Monoamine wurden dann abgetrennt, indem eine Filtration über GF-C-Filter (Ø 25 mm; Whatman) in einem Absaug-Mehrfachverteiler (Hofer) vorgenommen wurde. Das Filtrat wurde mit 7 ml Filter-Waschpuffer gespült, der trocken gelaufene Filter dann in ein Szintillationsgefäß (PolyvialsV,

Zinsser Analytic) überführt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (ReadyProtein+, Beckman Coulter) versetzt. Die Quantifizierung wurde schließlich nach 1 h Schütteln in einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) für 1 min durchgeführt.

Filter-Waschpuffer.....240 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % (v/v) Tween 20,  
100 mM PCA; 4 °C

### 5.3.3 *Quantifizierung von [<sup>3</sup>H]-markierten Proteinen durch Membrantransfer*

Die Detektion von [<sup>3</sup>H]-monoaminylierten Proteinen aus komplexen Proteingemischen wurde durch Auftrennung mittels SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran (HyBond ECL, GE Healthcare) und anschließende Flüssigszintillation erreicht. Dazu wurden Zellen zunächst mit 100 µM [<sup>3</sup>H]-Dopamin (0,15 Ci/l) und, wenn angegeben, mit 50 µM LLnL oder 0,5 mM CTEA für 3 h inkubiert. Nach der Ernte der Zellen wurde ein Lysat hergestellt, dieses mittels SDS-PAGE separiert und wie in Abschnitt II5.1.7 beschrieben auf eine Membran übertragen. Nach Anfärben mit Coomassie-Farbstoff wurde die Membran entlang der Proteinbahnen in 1 mm breite Streifen geschnitten und die auf jedem Streifen befindliche Radioaktivität einzeln in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (ReadyProtein+, Beckman Coulter) in einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) für 1 min bestimmt.

### 5.3.4 *Detektion von Biotin-markierten Proteinen*

Die Visualisierung und Quantifizierung von mit Biotin-Monoaminen umgesetzten Proteinen erfolgte durch Immunoblotting. Hierzu wurden die jeweiligen Proteingemische mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (siehe II5.1.7) und mit Blockierungspuffer für 1 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 50 ng/ml Streptavidin-HRP in PBST für 1 h geschüttelt und mit ECL-Lösung wie beschrieben entwickelt. Die Quantifizierung der Bandenintensitäten wurde mit Hilfe des Programms TINA (raytest) densitometrisch durchgeführt.

Blockierungspuffer.....3 % (w/v) BSA in PBST; 4 °C

PBST.....140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 % (v/v) Tween 20

### 5.3.5 *Visualisierung von Fluoreszenz-markierten Proteinen*

Um mit dem fluoreszierenden Monoamin-Analogen MDC modifizierte Proteine sichtbar zu machen, wurden diese zunächst durch SDS-PAGE wie in Abschnitt II5.1.5 beschrieben aufgetrennt. Nach einem 10-minütigen Waschschrift in Wasser wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator (BioRad) aufgelegt und die fluoreszierenden Banden mittels der eingebauten

Kamera detektiert und dokumentiert. Zur Kontrolle wurde das Gel abschließend mit Coomassie-Farbstoff angefärbt.

### 5.3.6 *Autoradiographie*

Zur Visualisierung radioaktiv markierter Proteine wurde das Amersham Amplify Fluorographic Reagent (GE Healthcare) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Behandlung mit diesem Reagenz wurde das Gel getrocknet (Model 583 Gel Dryer, BioRad), ein Röntgenfilm (SuperRX, Fujifilm) aufgelegt und bei -80 °C für 16 d exponiert.

## 5.4 **Enzymbiochemische Methoden**

### 5.4.1 *GTP-Hydrolyse*

Die GTP-Hydrolyseaktivität von GTPasen wurde bestimmt, indem 2 µg des nativen oder monoaminylierten GST-Fusionsproteins mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,01 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP für 45 min bei 37 °C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden entsprechende Ansätze zuvor für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 % SDS und Inkubation für 10 min bei 37 °C abgestoppt. Zweimal 1 µl der Reaktionslösung wurden dann auf eine PEI-Zellulose-Platte (Schleicher & Schuell) aufgetropft und bei 42 °C getrocknet. Die Dünnschichtchromatographie wurde mit 0,35 M Ammoniumhydrogencarbonat entwickelt, bei 42 °C getrocknet und nach Auflegen einer Phospho-Bildwandler-Platte (Molecular Dynamics) über Nacht exponiert. Die Analyse erfolgte dann in einem Phospho-Bildwandler (Storm800, Molecular Dynamics).

### 5.4.2 *Aktivitätsbestimmung von GTPasen*

Die Aktivität von GTPasen wurde durch Quantifizierung der Bindung an einen lediglich die aktive Konformation bindenden Interaktionspartner bestimmt. Dies erfolgte entweder mittels Kopräzipitation oder anhand der Bindung an einen immobilisierten Effektor.

Für die Kopräzipitation wurden 6xHis-Cdc42 oder 6xHis-G $\alpha_{o1}$  einer Monoaminylierung mit 200 µM HA und 5 mU TGM2 unterzogen (siehe II.5.3.1) und der Ansatz dann mit 500 µM GTP, GDP oder GMP-PNP in Anwesenheit von 0,5 mM EDTA für 15 min inkubiert. Der Beladung der GTPasen folgte die Initiierung der Hydrolysereaktion durch Zugabe von 5 mM MgCl<sub>2</sub> und, im Fall von 6xHis-Cdc42, von 200 pmol GST-p50RhoGAP $\Delta$  (produziert nach II.5.1.1 mit pGEX\_ p50RhoGAP $\Delta$ ; A. Hall, MSKCC, New York). Nach 15 min bei 37 °C wurden 20 pmol GST-Pak3BD oder GST-RGS4 (gewonnen nach II.5.1.1 mit pGEX\_ Pak3BD bzw. pGEX\_RGS4; laboreigene Herstellung) mit 20 µl gewaschenen Ni-NTA-

Magnetkugeln (Qiagen) in eiskaltem Interaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  zugegeben. Der Ansatz wurde dann für mindestens 4 h bei 4 °C invertiert und mittels eines Magnetständers (Qiagen) separiert. Unspezifisch gebundene Komponenten wurden durch dreimaliges Waschen mit Interaktionspuffer und Wechseln des Reaktionsgefäßes entfernt, und schließlich wurden die an der Matrix gebundenen GTPase-Effektor-Komplexe mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Dabei wurde mit den Antikörpern Maus-anti-5xHis (1:2000), Maus-anti-GST (1:10000) und Ziege-anti-Maus-IgG-HRP (1:80000) gearbeitet. Die Quantifizierung der Interaktion erfolgte durch densitometrische Analyse.

Alternativ wurde für die Interaktion von 6xHis-Cdc42 mit GST-Pak3BD eine auf Multi-Kavitäten-Platten durchführbare Versuchsanordnung etabliert. Dabei wurde eine 96-Kavitäten-Platte mit flachem Boden und MaxiSorp-Oberfläche (Nunc) über Nacht mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GST-Pak3BD in PBSN beschichtet. Nach mehreren Waschschritten mit Wasser und PBSTB wurden 5 pmol der wie oben beschrieben monoaminylierten und mit einem Nukleotid beladenen GTPase zusammen mit 4 pmol GST-p50RhoGAP $\Delta$  zugegeben und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Interaktionspuffer und PBSTB wurde als Erstantikörper 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Maus-anti-5xHis in PBSTA1 hinzugefügt und die Platte für 2 h geschüttelt. Es wurde dann dreimal mit Interaktionspuffer und einmal mit PBSTB gewaschen und der Zweitantikörper Ziege-anti-Maus-IgG-HRP (1:50000) in PBSTA2 zugegeben. Nach 2 h unter Schütteln und intensivem Waschen wurden 100  $\mu\text{l}$  TMB (Thermo Scientific) zugegeben und die Farbreaktion nach Abstoppen mit 100  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 450 nm photometrisch quantifiziert.

Interaktionspuffer.....	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,01 % (v/v) Tween 20, 10 % (v/v) Glycerin; pH 8,0; 4 °C
PBS.....	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
PBSN.....	0,05 % (w/v) $\text{NaN}_3$ in PBS
PBSTA1.....	1 % fettarmes Milchpulver, 0,01 % (w/v) $\text{NaN}_3$ , 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS; 4 °C
PBSTA2.....	1 % fettarmes Milchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS; 4 °C
PBSTB.....	5 % fettarmes Milchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS; 4 °C

#### 5.4.3 Experimente zur Aktivität von $\text{PLA}_2$

Nach CORDELLA-MIELE *et al.* [239] wurde die Aktivität von porciner  $\text{PLA}_2$  (Sigma) durch Quantifizierung der Freisetzung von Arachidonsäure aus 1-stearoyl-2-[1- $^{14}\text{C}$ ]arachidonyl-L-3-Phosphatidylcholin (A-PC) bestimmt. Dazu wurden 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{PLA}_2$  zunächst wie in Abschnitt II.5.3.1 beschrieben mit 200  $\mu\text{M}$  HA und 5 mU TGM2 monoaminyliert und 20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes dann mit 1 mM DOC, 100 mM NaCl, 80 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 10  $\mu\text{M}$  A-PC in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  für 1 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen mit 50  $\mu\text{l}$  2:1 (v/v) Chloroform/Methanol erfolgte die Extraktion der Lipide durch Ausschütteln mit

50  $\mu\text{l}$  Chloroform und 50  $\mu\text{l}$  KCl sowie einer Zentrifugation (12000  $\times g$ , 5 min). Als Kontrolle wurde 2,5  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure (Sigma) direkt zugegeben. Die untere organische Phase wurde dann auf eine Silika-Gel-Platte (Uniplate Silica Gel G, channeled; Analtech) aufgetropft und nach Trocknung in TLC-Lösungsmittel entwickelt. Entstandene Banden wurden anschließend mit Iod angefärbt und nach Ablösen in Szintillationsgefäße mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (ReadyProtein+, Beckman Coulter) überführt. In einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) konnte dann die enthaltene Radioaktivität bestimmt werden.

TLC-Lösungsmittel ..... 70 % (v/v) Petroether, 29 % (v/v) Diethylether, 1 % (v/v) Essigsäure

#### 5.4.4 Experimente zur Kinetik von TGM2

Die kinetischen Eigenschaften von TGM2 wurden mit Hilfe einer Versuchsanordnung untersucht, bei welcher das durch Transamidierung freigesetzte  $\text{NH}_4^+$  äquimolar in der Reaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu L-Glutamat verbraucht wird. Im Zuge dieser durch die GDH vermittelten Gleichgewichtsreaktion wird  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert, was zu einer Abnahme der Absorption bei 340 nm führt (siehe Abbildung 9).

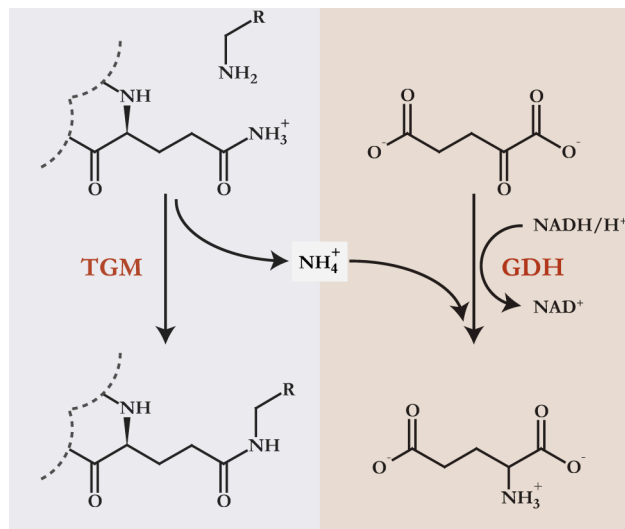


Abbildung 9: Das Prinzip der gekoppelten TGM/GDH-Reaktion zur Bestimmung der Enzymaktivität.

Im Wesentlichen wurde der Versuch wie von DAY UND KEILLOR [240] beschrieben durchgeführt. 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DMC (Sigma) wurden mit 0,04 U/ $\mu\text{l}$  GDH (Roche), 0,16 mM NADH (Sigma), 10 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat (Fluka) und 0-2 mM HA in Puffer K kombiniert und die Reaktion durch Zugabe von 0,15 mU/ $\mu\text{l}$  TGM2 (Zedira) gestartet. Die Abnahme der  $A_{340}$  wurde dann kontinuierlich in einem Spektrophotometer (Beckman) über 40 min hinweg aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Origin (OriginLabs) durch Angleichen



einer Geraden an den linearen Bereich des gemessenen sigmoiden Absorptionsverlaufs, wobei die Steigung dieser Geraden als Reaktionsgeschwindigkeit angesehen wurde.

Puffer K ..... 200 mM MOPS, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA; pH 7,2

#### 5.4.5 *Synthese von DA-biotin*

Biotin-markierte Monoamine konnten erhalten werden, indem im Wesentlichen der Versuchsbeschreibung von WATTS *et al.* [211] gefolgt wurde. Die Synthese erfolgte mit einem dreifachen molaren Überschuss von DA-Hydrochlorid (Sigma) gegenüber Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) in Pyridin. Die Mischung wurde 6-8 h bei 4 °C invertiert, über Nacht bei 4 °C inkubiert und schließlich das Lösungsmittel evaporiert. Die Überreste wurden dann in DMF aufgenommen und überschüssiges Kopplungsreagenz durch Zugabe eines zweifachen molaren Überschusses von BSA in Tris/HCl (pH 8,0) für 30 min bei 30 °C inaktiviert. Nach Präzipitation durch Zugabe von DMF und Zentrifugation (20000 x g, 15 min, 4 °C) wurden die Lösungsmittel evaporiert und das Produkt nach erneutem Aufnehmen in DMF bei -20 °C gelagert. Die Homogenität der Biotin-Monoamine wurde für jede Präparation durch eine *in vitro*-Transamidierung mit DMC und TGM2 (siehe II5.3.1) sowie Detektion durch Immunoblotting (siehe II5.3.4) verifiziert.

#### 5.4.6 *Identifizierung von monoaminylierten Proteinen mittels Massenspektrometrie*

Unter Zuhilfenahme von DA-biotin wurden potenziell monoaminylierte Proteine identifiziert, indem konfluente Kulturschalen von PC12-Zellen oder 3T3-L1-Adipozyten für 3 h mit 0,5 mM BAPA (Thermo Scientific) oder 10 µg/ml DA-biotin (eigene Herstellung) behandelt wurden. Zur Kontrolle wurden entsprechende Ansätze mit 100 µM des TGM-Inhibitors CTEA versehen. Nach der Zellernte und drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen wie in II5.1.3 beschrieben nicht-denaturierend lysiert und über Nacht gegen PBS in einer Dialysekassette (Thermo Scientific) dialysiert. Biotin-markierte Proteine wurden dann isoliert, indem das erhaltene Lysat mit 5-20 µl Streptavidin-gekoppelten Magnetkügelchen (Dynabeads M-280 Streptavidin; Invitrogen) für 1 h bei 4 °C invertiert wurde. Nach Abtrennung der Matrix wurde diese intensiv mit PBS gewaschen und für eine Auftrennung mittels SDS-PAGE verwendet. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte dann durch Silberfärbung (siehe II5.1.6), und exklusiv in nicht mit CTEA behandelten Proben vorhandene Banden wurden mittels eines Skalpells ausgeschnitten. Wenn nötig wurden auch Immunoblots angefertigt, um die Markierung durch Biotin zu verifizieren. In diesen Fällen erfolgte die Detektion durch Streptavidin-HRP wie in II5.3.4 beschrieben.

Ausgeschnittene Proteinbanden wurden entfärbt und nach einem tryptischen Verdau mittels nanoLC-ESI-MS (AG Klose, Charité Berlin) analysiert. Für weitere Untersuchungen berücksichtigt wurden nur solche Proteine, die ausschließlich in nicht mit CTEA behandelten Proben gefunden wurden.

PBS..... 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### 5.4.7 MS-Untersuchung des katalytischen Zentrums von GTPasen

Um die Modifizierung des katalytischen Zentrums von GTPasen zu verifizieren, wurden tryptische Peptide monoaminylierter Proteine massenspektrometrisch vermessen. Dazu wurden 5 µg der rekombinant hergestellten Proteine GST-RhoA, GST-TC10, GST-Cdc42, GST-Rab3c, GST-Rab4, GST-Rab10, GST-Rab27a, GST-MRas, GST-Rab18, GST-Rab11b, GST-Rab5a, GST-Gα<sub>o1</sub> und GST-Gα<sub>q</sub> wie in Abschnitt II.5.3.1 beschrieben mit 200 µM HA und 5 mU TGM2 transamidiert. Anschließend wurde durch die AG Ralser (MPIMG, Berlin) eine Untersuchung der Q1/Q3-Übergänge mittels QTRAP-Massenspektrometrie (QTRAP-MS) durchgeführt. Dabei wird nach Selektion eines bekannten Peptids in Q1 eine Fragmentierung (Q2) durchgeführt (siehe Abbildung 10). Die entstehenden Bruchstücke werden dann in Q3 detektiert, und zwar entweder bei einer definierten Masse oder als Spektrum. Die Technik wird auch als *multiple reaction monitoring* (MRM) bezeichnet.

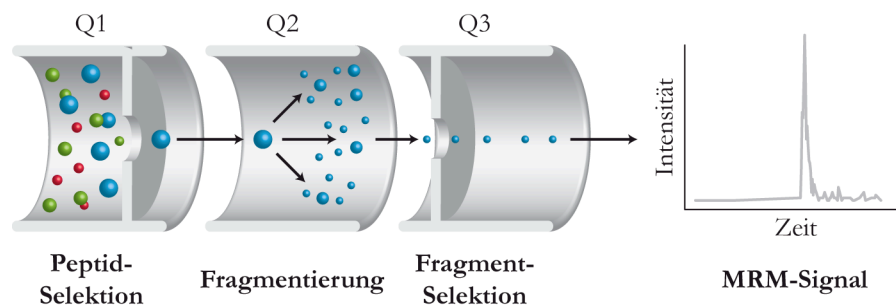


Abbildung 10: Illustration zur Messung von MRM-Übergängen mittels QTRAP-MS.

Zunächst wurden die Proben reduziert, alkyliert und durch Trypsin fragmentiert. Nach einem Reinigungsschritt folgte die Auftrennung der Peptide mittels einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einer C<sub>18</sub>-Säule (300SB-C<sub>18</sub>; Zorbax) mit einem Gradienten von Wasser zu Acetonitril. Das Eluat wurde dann durch Elektrospray-Ionisation (Nanospray III; AB/Sciex) ionisiert und in einem Massenspektrometer analysiert (QTRAP5500; AB/Sciex). Die Massen der hypothetischen modifizierten und unmodifizierten dem katalytischen Zentrum der GTPasen zuzurechnenden Peptide wurden zuvor mit MRM pilot 2.0 (Applied Biosystems) und Chemdraw (Cambridgesoft) berechnet. Fragmentationenspektren der histami-

nylierten und unmodifizierten Peptide wurden im EPI-Modus (*enhanced product ion*) des Spektrometers gemessen.

## 6 Statistik

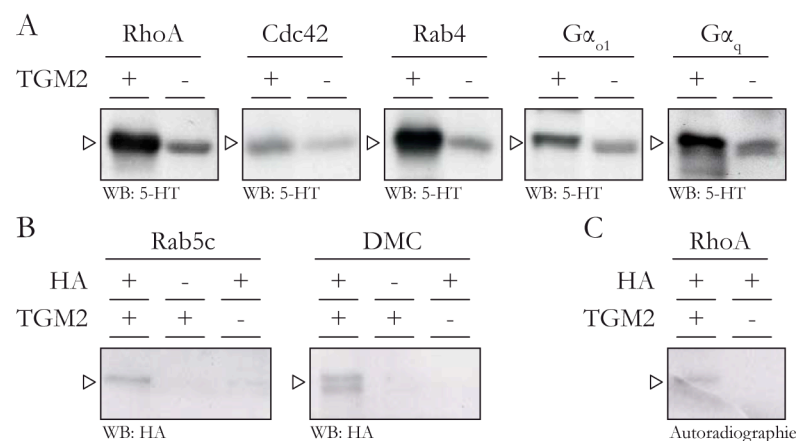
Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Excel (Microsoft) und Origin (OriginLabs). Bei den in Diagrammen gezeigten Werten handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Das Signifikanzniveau zwischen Wertpopulationen wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests nach Student ermittelt, und Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p < 0,05$  wurden als signifikant erachtet.

### III ERGEBNISSE

#### 1 Signalproteine als Substrate für die Monoaminylierung

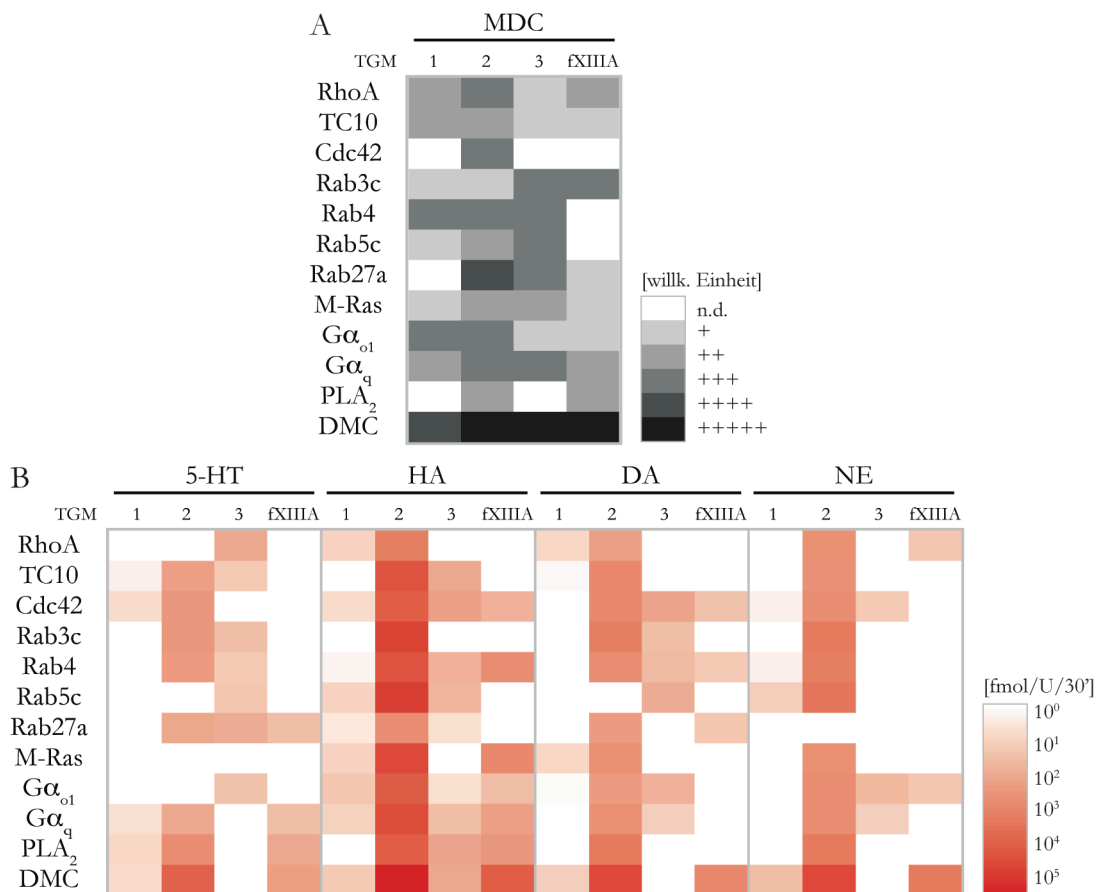
##### 1.1 GTPasen werden *in vitro* durch TGM mit Monoaminen modifiziert

Die Serotonylierung als regulatorische posttranslationale Modifikation wurde zunächst für die monomeren GTPasen RhoA, Rab4 und Rab27 im Kontext der Thrombozytenaggregation bekannt [198], doch werden diese und andere Proteine wie Rac1 [221] auch in anderen Signalwegen serotonyliert [200,205,208,209,213]. Um die generelle Bedeutung des übergeordneten Mechanismus, der als Monoaminylierung zu bezeichnenden Protein-Transamidierung von Monoaminen durch TGM, zu untersuchen, wurden kleine und heterotrimeren GTPasen *in vitro* mit TGM2 und 5-HT sowie HA umgesetzt. Die potenzielle Modifikation wurde dann zunächst durch SDS-PAGE und Immunofärbung sichtbar gemacht. In Abbildung 11 A finden sich die Ergebnisse dieser Versuche, aus denen für RhoA, Cdc42, Rab4,  $G\alpha_{o1}$  und  $G\alpha_q$  eine Serotonylierung abgeleitet werden kann. In Kontrollansätzen wird durch das gegen 5-HT gerichtete Antiserum zwar eine schwache Bande erkannt, doch ist diese in Ansätzen mit TGM2 deutlich verstärkt.



**Abbildung 11: Die Serotonylierung und Histaminylierung von GTPasen kann mit geeigneten Antikörpern sowie durch Autoradiographie nachgewiesen werden.** (A) Für die kleinen und heterotrimeren GTPasen RhoA, Cdc42, Rab4,  $G\alpha_{o1}$  und  $G\alpha_q$  kann eine Serotonylierung gezeigt werden. Verwendet wurden 2  $\mu$ g des GST-Fusionsproteins, die Detektion erfolgte mit der IgG-Fraktion des Antiserums von mit 5-HT-DMC immunisierten Kaninchen. (B) Unter Verwendung der vorgeklärten IgG-Fraktion des Antiserums von mit HA-DMC immunisierten Kaninchen kann die Histaminylierung von 6  $\mu$ g GST-Rab5c und DMC visualisiert werden. Die entsprechende Bande tritt nicht auf, wenn lediglich TGM2 oder HA angeboten werden. (C) Für die kleine GTPase RhoA zeigt sich die Histaminylierung auch in einer Autoradiographie. Dazu wurden 10  $\mu$ g des GST-Fusionsproteins mit 5 mU TGM2 und 2 pmol [ $^3H$ ]-HA transamidiert.

Um eine Histaminierung sichtbar zu machen, wurde unter anderem die kleine GTPase Rab5c und das allgemein als potentes TGM-Substrat angesehene modifizierte Milchprotein DMC untersucht. Hier wurde, wie in Abbildung 11 B dargestellt, eine spezifisch in mit HA und TGM2 behandelten Proben auftretende Bande detektiert. Bei Verwendung von [ $^3\text{H}$ ]-markiertem HA konnte nach SDS-PAGE und Autoradiographie, wie aus Abbildung 11 C ersichtlich, ein spezifisch auftretendes Signal für histaminiertes RhoA beobachtet werden.



**Abbildung 12: *In vitro* werden GTPasen differenziell monoaminiert.** (A) Der TGM-vermittelte Einbau von MDC in kleine und heterotrimere GTPasen sowie PLA $_2$  erfolgt nicht gleichförmig, sondern deutet auf eine Spezifität der TGM gegenüber der Proteinkomponente hin. So kann beispielsweise eine starke MDCylierung von Rab27a mit TGM2 beobachtet werden, wohingegen für Rab3c eine starke Reaktivität von TGM3 und fXIIIa gefunden wurde. Zur Ermittlung der Spezifitäten wurden über SDS-PAGE aufgetrennte Reaktionsansätze densitometrisch quantifiziert. (B) Anhand der Transamidierung [ $^3\text{H}$ ]-markierter Monoamine kann eine hohe Reaktivität von TGM2 für HA bei nahezu allen untersuchten Proteinen beobachtet werden. Bei 5-HT, DA und NE hingegen liegt eine deutliche Spezifität der TGM bezüglich Protein und Monoamin vor. RhoA und Rab27a beispielsweise werden bevorzugt durch TGM3 serotonyliert, während Cdc42 vor allem durch TGM2 serotonyliert wird. DA- und NE-Einbau erfolgt im Wesentlichen durch TGM2, doch auch hier kann eine Spezifität bezüglich der Proteinkomponente abgeleitet werden. So findet sich eine sehr hohe Norepinephrinylierung von 2492 und 2924 fmol/U/30' bei Rab3c bzw. Rab5c, während Rab27a gar nicht umgesetzt wird. Gezeigt sind Inkorporationswerte für 200 pmol GST-Fusionsprotein (außer PLA $_2$  und DMC) aus mehrfach in Tripletten durchgeführten Versuchen. Die entsprechenden Zahlenwerte sind zusätzlich im Anhang in Tabelle 13 dargestellt.

Die Analyse der Substratspezifitäten von TGM1-3 sowie fXIIIa bezüglich der Monoaminylierung von GTPasen und PLA $_2$  zeigt eine deutliche Präferenz von TGM2 für HA (Abbildung 12). Während der Einbau von MDC, wie aus Abbildung 12 A ersichtlich,

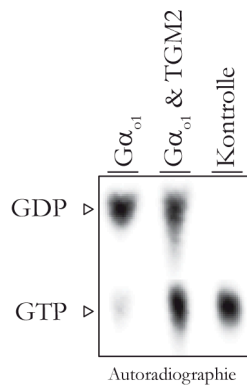
heterogen und für nahezu alle untersuchten Q-Substrat-Proteine nachweisbar ist, ergibt sich für die biogenen Monoamine 5-HT, HA, DA und NE ein anderes Bild. So wird Rab3c beispielsweise durch TGM2 mit 61152 fmol/U/30' HA modifiziert, für 5-HT (362 fmol/U/30'), DA (1701 fmol/U/30') und NE (2492 fmol/U/30') dagegen wurden deutlich niedrigere Werte gefunden. Vergleicht man die HA-Spezifität der vier TGM gegenüber Rab3c, so kann ein signifikanter Einbau von HA lediglich mit TGM2 nachgewiesen werden. Neben der HA-Präferenz von TGM2 zeigt sich vor allem eine Abstufung der generellen TGM-Selektivität (HA>DA>NE>5-HT). Im Vergleich der vier TGM wird die stärkste Monoaminylierung durch TGM2 vermittelt, während TGM3, TGM1 und fXIIIa eine deutlich geringere Aktivität aufweisen. Für einzelne Q-Substrat-Proteine lassen sich aus Abbildung 12 B jeweils optimale Kombinationen mit Monoamin und TGM ableiten. Die Serotonylierung von  $G\alpha_{o1}$  beispielsweise ist bei Verwendung von TGM3 am höchsten, während die Dopaminylierung und Norepinephrinylierung von TGM2 und 3 vermittelt werden. In einigen Fällen, wie z.B. bei Rab5c in Kombination mit 5-HT und DA, tritt keine TGM2-vermittelte Monoaminylierung auf. Statt dessen wird die Dopaminylierung und Serotonylierung von TGM3 katalysiert. Im Allgemeinen zeichnen die in Abbildung 12 B gezeigten Ergebnisse das Bild einer differentiell regulierten Interaktion von TGM, Q-Substrat-Protein und Monoamin. Weiterhin bleibt festzuhalten, dass nicht nur 5-HT sondern auch HA, DA und NE durch TGM kovalent mit Proteinen verknüpft werden können.

## 1.2 Die Aktivität von Cdc42 und $G\alpha_{o1}$ wird durch Histaminylierung reguliert

Nach der Untersuchung der Selektivität der TGM-vermittelten Monoaminylierung war zunächst der Einfluss einer solchen Modifikation auf die katalytische Aktivität des Q-Substrat-Proteins von Interesse. Beispielhaft wurden dazu die GTPasen Cdc42 und  $G\alpha_{o1}$  herangezogen. Da die beiden Proteine 6 und 12 in Frage kommende Q-Reste besitzen, wurde zunächst die wahrscheinlichste Position der Monoaminylierung bestimmt. Ein Sequenzvergleich von 32 kleinen und heterotrimeren GTPasen (Abbildung 13) zeigt einen konservierten Q-Rest in allen untersuchten GTPasen. Da eine Mutation dieses Restes z.B. in RhoA zum Verlust der intrinsischen und GAP-vermittelten GTP-Hydrolyseaktivität führt [241], schien eine Regulation dieser Funktion durch Monoaminylierung wahrscheinlich. Zur Validierung dieser Hypothese wurde zunächst die Veränderung der GTP-Hydrolyseaktivität von  $G\alpha_{o1}$  untersucht.

		10		20		30		
Rac1	D G K P V N L G L W	D T A G	Q	E D Y D R	L R P L S Y P	Q	T D	V F L I 80
Cdc42	G G E P Y T L G L F	D T A G	Q	E D Y D G	L R P L S Y P	Q	T D	V F L V 80
TC10	G G K Q Y L L G L Y	D T A G	Q	E D Y D R	L R P L S Y P	M	T D	V F L I 86
RhoA	D G K Q V E L A L W	D T A G	Q	E D Y D R	L R P L S Y P	D	T D	V I L M 82
Arf1	E Y K N I S F T V W	D V G G	Q	D K I R P	L W R H Y F	Q	N T	Q G L I F 90
Rab18	D G N K A K L A I W	D T A G	Q	E R F R T	L T P S Y Y R G A	Q		G V I L 87
Rab3a	N D K R I K L Q I W	D T A G	Q	E R Y R T	I T T A Y Y R G A M			G F I L 100
Rab3c	N E K R I K L Q I W	D T A G	Q	E R Y R T	I T T A Y Y R G A M			G F I L 108
Rab1b	D G K T I K L Q I W	D T A G	Q	E R F R T	I T S S Y Y R G A H			G I I V 86
Rab10	Q G K K I K L Q I W	D T A G	Q	E R F H T	I T T S Y Y R G A M			G I M L 87
Rab27a	R G Q R I H L Q L W	D T A G	Q	E R F R S	L T T A F F R D A M			G F L L 97
Rab5a	D D T T V K F E I W	D T A G	Q	E R Y H S	L A P M Y Y R G A	Q		A A I V 98
Rab5c	D D T T V K F E I W	D T A G	Q	E R Y H S	L A P M Y Y R G A	Q		A A I V 99
Rab31	G N E L H K F L I W	D T A G	Q	E R F H S	L A P M Y Y R G S A			A A V I 83
Rab4	G G K T V K L Q I W	D T A G	Q	E R F R S	V T R S Y Y R G A A			G A L L 86
Ras	D G E T C L L D I L	D T A G	Q	E E Y S A	M R D	Q	Y M R T G E	G F L C 134
Gα <sub>o1</sub>	T F K N L H F R L F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E D V T			A I I F 224
Gα <sub>o2</sub>	T F K N L H F R L F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E D V T			A I I F 224
Gα <sub>t1</sub>	S F K D L N F R M F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			C I I F 219
Gα <sub>t2</sub>	S V K D L N F R M F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			C I I F 223
Gα <sub>t3</sub>	S F K D L N F R M F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			C I I F 223
Gα <sub>i1</sub>	T F K D L H F K M F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			A I I F 223
Gα <sub>i2</sub>	T F K D L H F K M F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			A I I F 224
Gα <sub>i3</sub>	T F K E L Y F K M F	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			A I I F 223
Gα <sub>z</sub>	T F K E L T F K M V	D V G G	Q	R S E R K	K W I H C F E G V T			A I I F 224
Gα <sub>s</sub>	Q V D K V N F H M F	D V G G	Q	R D E R R	K W I	Q	C F N D V T	A I I F 154
Gα <sub>oif1</sub>	Q V D K V N F H M F	D V G G	Q	R D E R R	K W I	Q	C F N D V T	A I I Y 233
Gα <sub>11</sub>	D L E N I I F R M V	D V G G	Q	R S E R R	K W I H C F E N V T			S I M F 228
Gα <sub>14</sub>	D L E N I I F R M V	D V G G	Q	R S E R R	K W I H C F E S V T			S I I F 197
Gα <sub>q</sub>	D L Q S V I F R M V	D V G G	Q	R S E R R	K W I H C F E N V T			S I M F 228
Gα <sub>12</sub>	V I K K I P F K M V	D V G G	Q	R S Q R Q	K W F	Q	C F D G I T	S I L F 174
Gα <sub>13</sub>	E I K N V P F K M V	D V G G	Q	R S E R K	R W F E C F D S V T			S I L F 245
Consensus	* * k * * * f * * *	D v g g	Q	r * * r *	* w * * c f * g * t			* i i f

**Abbildung 13: Sequenzvergleich von 32 kleinen und heterotrimeren murinen GTPasen im Bereich des katalytischen Zentrums.** Der hier in Position 15 erkennbare Q-Rest ist in allen untersuchten GTPasen konserviert. Er spielt bei fast allen GTPasen eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse von GTP, indem er das nukleophil angreifende H<sub>2</sub>O-Molekül koordiniert (siehe Abschnitt I2.3) [242].

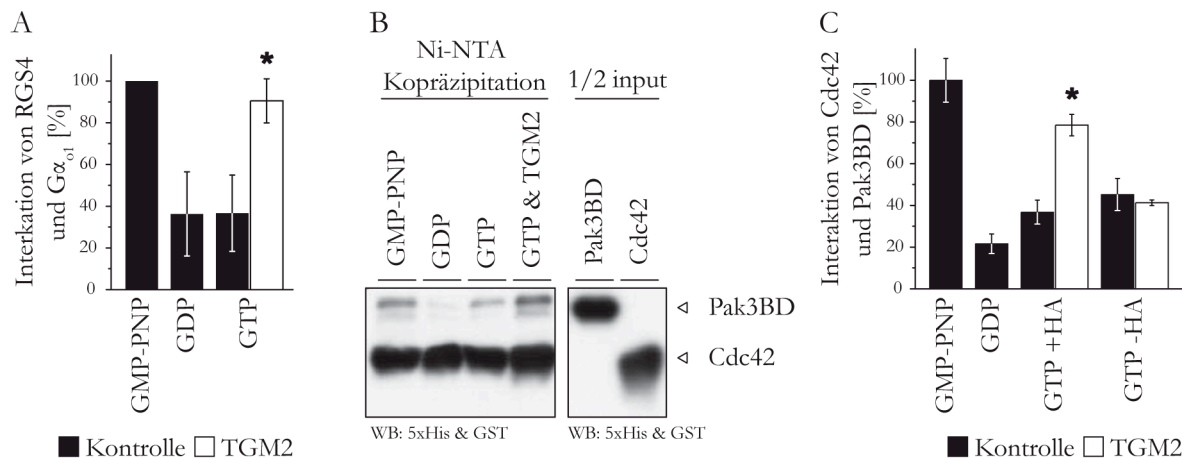


**Abbildung 14: Histaminierung von Gα<sub>o1</sub> reduziert die intrinsische GTP-hydrolytische Aktivität.** In einer Dünnschichtchromatographie ist nach 45 min GST-Gα<sub>o1</sub>-vermittelter [ $\alpha^{32}$ P]-GTP-Hydrolyse eine vollständige Umwandlung zu [ $\alpha^{32}$ P]-GDP zu beobachten. Nach Monoaminylierung mit 5 mU TGM2 und 200  $\mu$ M HA wird deutlich weniger hydrolytische Aktivität detektiert. Eine erkennbare Autohydrolyse des Nukleotids tritt nicht auf.

Wie in Abbildung 14 gezeigt erfolgt in Abwesenheit von  $G\alpha_{o1}$  keine Autohydrolyse von  $[\alpha^{32}P]$ -GTP. Bei Zugabe von GST- $G\alpha_{o1}$  dagegen kann ein nahezu quantitativer Umsatz zu  $[\alpha^{32}P]$ -GDP detektiert werden. Nach Histaminylierung von GST-  $G\alpha_{o1}$  verringert sich die intrinsische GTP-Hydrolyse deutlich und in der Autoradiographie sind etwa gleiche Mengen  $[\alpha^{32}P]$ -GTP und -GDP erkennbar. Die Monoaminylierungs-abhängige Verringerung der hydrolytischen Aktivität könnte in einem vergrößerten Anteil der GTP-gebundenen Konformation ( $GTP \cdot G\alpha_{o1}$ ), die für die Signalweiterleitung nach rezeptorvermitteltem Austausch von GDP nach GTP verantwortlich ist, resultieren [243]. Da diese durch Bindung an Effektorproteine wie z.B. RGS4 (*regulator of G protein signalling 4*) erfolgt, das ausschließlich mit  $GTP \cdot G\alpha$ -Untereinheiten assoziiert und als GAP fungiert (siehe Abschnitt I2.2) [136], wurde die RGS4- $G\alpha_{o1}$ -Interaktion experimentell untersucht.

Wie in Abbildung 15 A zu erkennen ist, bewirkt die TGM2-vermittelte Histaminylierung eine Erhöhung des RGS4-gebundenen  $G\alpha_{o1}$ -Anteils von 36 % auf 90 % bezogen auf die maximal gebundene Proteinmenge. Letztere wurde durch Verwendung des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons GMP-PNP ermittelt. In Analogie zu  $G\alpha_{o1}$  wurde auch der Einfluss der Histaminylierung auf die Funktion der kleinen GTPase Cdc42 untersucht. Abbildung 15 B gibt beispielhaft einen Immunoblot des *pulldown* von 6xHis-Cdc42 mit dem Effektor GST-Pak3BD (*p21-activated kinase 3 binding domain*) in Anwesenheit von p50RhoGAP wieder. Pak3 bindet ausschließlich an GTP-gebundene Rho-GTPasen und wird häufig für Aktivitätsstudien herangezogen [244,245]. Erkennbar sind dabei mit  $GDP \cdot Cdc42$  vergleichsweise niedrige Mengen an gebundenem Pak3BD, und bei Verwendung von  $GTP \cdot Cdc42$  eine Erhöhung des gebundenen Effektorproteins nach Histaminylierung. Dieses Ergebnis konnte auch mit einer alternativen Methode verifiziert werden, wobei GST-Pak3BD an der Oberfläche einer Mult-Kavitäten-Platte immobilisiert und mit entsprechend vorbehandeltem 6xHis-Cdc42 inkubiert wurde. Nach Normalisierung auf die GMP-PNP-Bindung ist dem in Abbildung 15 C dargestellten Ergebnis zu entnehmen, dass die Menge an gebundenem  $GTP \cdot Cdc42$  durch die Histaminylierung von 36 % auf 78 % gesteigert wird. Diese kann in Anwesenheit von TGM2 ohne HA nicht beobachtet werden. Demgegenüber binden bei Vorinkubation mit GDP lediglich 21 % des 6xHis-Cdc42 an den immobilisierten Effektor. In Abwesenheit von p50RhoGAP konnte nur eine sehr geringe GTPase-Aktivität detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich damit ein Zusammenhang zwischen TGM2-abhängiger Histaminylierung, verringerter GTP-Hydrolyse und somit verstärktem Verbleiben der GTPase in der GTP-gebundenen, aktiven Konformation zeigen.

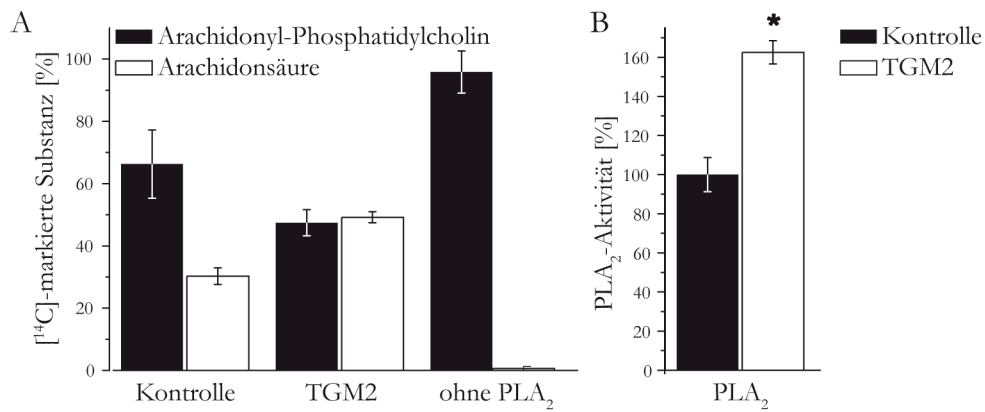




**Abbildung 15: TGM2-vermittelte Histaminierung verringert die GTPase-Aktivität von Cdc42 und G $\alpha_{o1}$  und bewirkt eine verstärkte Interaktion mit Effektorproteinen.** (A) Durch *pull-down* von 6xHis-G $\alpha_{o1}$  und GST-RGS4 kann eine signifikante Steigerung der GTPase-Effektor-Interaktion gezeigt werden. (B) und (C) Die Interaktion von 6xHis-Cdc42 mit immobilisiertem GST-Pak3BD wird durch TGM2-abhängige Histaminierung von 36 % auf 78 % gesteigert. In Abwesenheit von HA tritt keine Erhöhung der Interaktion auf. Diese Beobachtung kann auch mittels Ni-NTA-*pull-down* verifiziert werden. \*p < 0,05, dargestellt sind jeweils repräsentative Experimente aus mindestens 3 Wiederholungen.

### 1.3 Die Histaminierung von PLA<sub>2</sub> als Hydrolyse-aktivierende Modifikation

Die systematische Untersuchung der Selektivität von TGM brachte u.a. eine Histaminierung von PLA<sub>2</sub> durch TGM2, TGM3 und fXIIIa zu Tage (siehe III.1.1). Da ausserdem von CORDELLA-MIELE *et al.* [239] bereits eine Steigerung der lipolytischen Aktivität durch den Einfluss von TGM2 und fXIIIa beschrieben wurde, sollte eine mögliche Monoaminierungs-abhängige Veränderung der Eigenschaften von PLA<sub>2</sub> ergründet werden. Die Ergebnisse der gemessenen Lipolyse von [<sup>14</sup>C]-Arachidonyl-Phosphatidylcholin sind in Abbildung 16 A wiedergegeben. In der Negativkontrolle kann in Abwesenheit von PLA<sub>2</sub> keine Lipolyse beobachtet werden, während nach Zugabe von PLA<sub>2</sub>, jedoch ohne TGM2 und HA etwa 30 % des eingesetzten Lipids als [<sup>14</sup>C]-Arachidonsäure vorlagen. In Ansätzen mit TGM2 und HA steigerte sich dieser Wert auf 49 %. Parallel dazu verringerte sich das detektierte [<sup>14</sup>C]-Arachidonyl-Phosphatidylcholin von 66 % auf 47 %. Die Differenz zu 100 % erklärt sich durch systematische Verluste. Abbildung 16 B gibt die relative Veränderung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität in Abhängigkeit der Histaminierung wieder. Die Aktivitätssteigerung beträgt dabei 62 %. Die von CORDELLA-MIELE *et al.* [239] beschriebene TGM-vermittelte Dimerisierung von PLA<sub>2</sub> konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



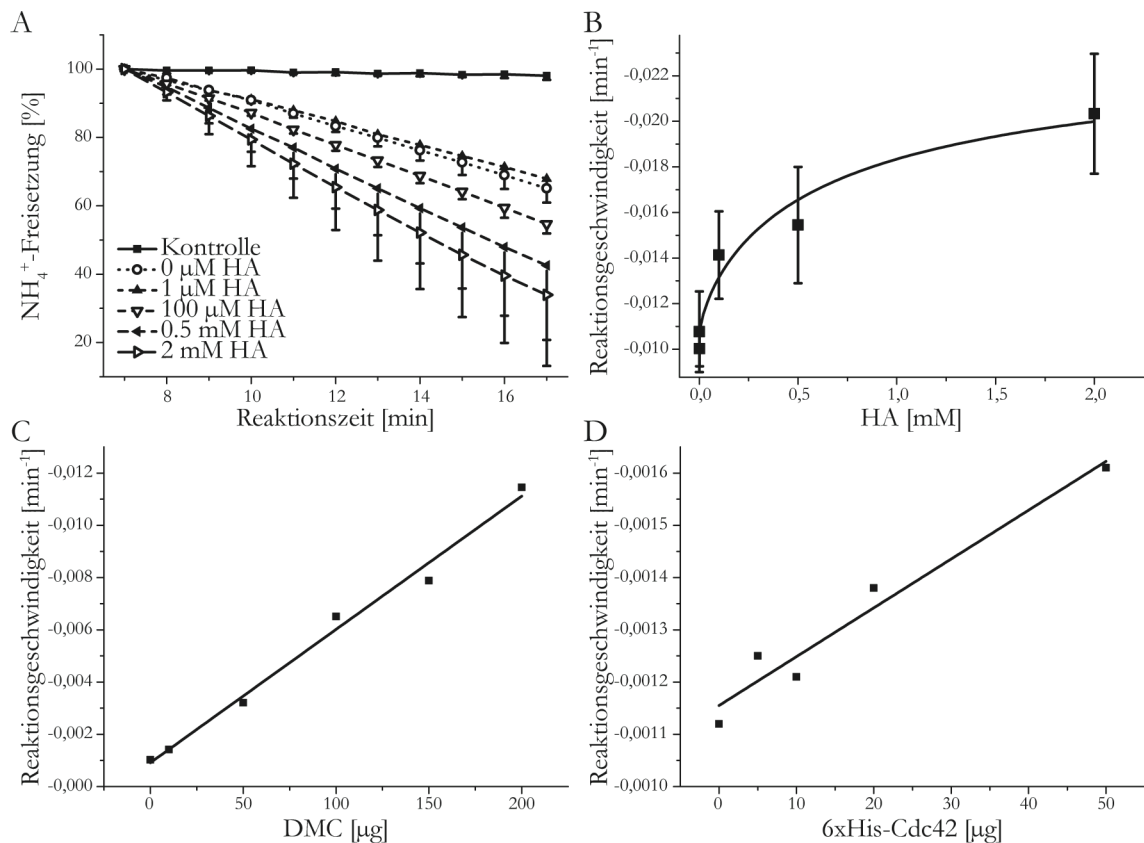
**Abbildung 16: Die  $\text{PLA}_2$ -vermittelte Lipolyse von Arachidonyl-Phosphatidylcholin wird durch TGM2-abhängige Histaminierung stimuliert.** (A) Die Freisetzung von  $[^{14}\text{C}]$ -Arachidonsäure durch  $\text{PLA}_2$  wird durch HA und TGM2 verstärkt. Eine Autohydrolyse kann nicht beobachtet werden. (B) TGM2-vermittelte Histaminierung führt zu einer etwa 1,6-fachen Erhöhung der  $\text{PLA}_2$ -Aktivität. \* $p < 0,05$ , dargestellt ist ein Experiment aus mindestens 3 Wiederholungen.

## 2 Die Kinetik der Transamidierung mit Monoaminen

### 2.1 HA ist ein spezifisches Substrat für TGM2

Um den Charakter der Monoaminierung als regulierende posttranslationale Modifikation genauer zu beschreiben, sollten weiterhin die kinetischen Eigenschaften der Histaminierung untersucht werden. Dabei wurde auf eine von DAY & KEILLOR [240] entwickelte Versuchsanordnung zurückgegriffen (siehe Abschnitt II.5.4.4). Messgröße ist dabei die Freisetzung von  $\text{NH}_4^+$ , die proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit der Transamidierung ist.

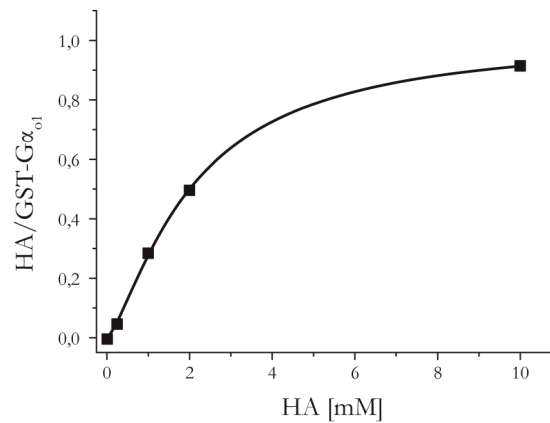
Abbildung 17 A und B zeigen den Einfluss steigender HA-Konzentrationen auf die Geschwindigkeit der Transamidierung von DMC und damit auf die Aktivität des Enzyms TGM2. Ohne TGM2 wird kein  $\text{NH}_4^+$  freigesetzt, nach Zugabe von TGM2 alleine zeigt sich eine basale Steigung und damit Reaktionsgeschwindigkeit von  $-0,01 \text{ min}^{-1}/100 \mu\text{g}$ . Diese steigt durch Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  bis  $2 \text{ mM}$  HA in einer Sättigungskurve bis auf  $-0,02 \text{ min}^{-1}/100 \mu\text{g}$  an. Die Transamidierung wird somit durch HA aktiviert und das Monoamin kann als ein spezifisches Substrat für TGM2 angesehen werden. In Abbildung 17 C und D ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Proteinmenge gezeigt. Hier ergibt sich für DMC und 6xHis-Cdc42 im untersuchten Bereich ein linearer Zusammenhang, wobei sich die gemessenen Werte um eine Größenordnung unterscheiden. Weiterhin konnte für DMC ein Anstieg der Enzymtätigkeit von  $0,021 \text{ min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  beobachtet werden, während für 6xHis-Cdc42 lediglich  $9 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  gemessen wurden. Da die Mengen an verfügbarem 6xHis-Cdc42 limitiert waren, konnten für dieses Protein keine Experimente zur HA-Abhängigkeit der Transamidierung durchgeführt werden.



**Abbildung 17: HA verstärkt konzentrationsabhängig die katalytische Aktivität von TGM2.** (A) Im Laufe der Transamidierung von 100 µg DMC mit HA wird NH<sub>4</sub><sup>+</sup> gebildet, das in einer gekoppelten TGM2/GDH-Versuchsanordnung anhand der NADH-Oxidation nachgewiesen werden kann. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist dabei von der angebotenen HA-Konzentration abhängig, ohne TGM2 (Kontrolle) erfolgt kein Abbau von NADH. (B) Wird der Betrag der Steigungen aus (A) gegen die verwendete HA-Konzentration aufgetragen, zeigt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der TGM2-Aktivität mit einer Sättigung bei etwa 0,02 min<sup>-1</sup>. (C, D) In Anwesenheit von 2 mM HA ergibt sich eine lineare Steigerung der TGM2-Aktivität mit zunehmender Substratmenge. Bei 50 µg wird eine Reaktionsgeschwindigkeit von 0,03 min<sup>-1</sup> mit DMC und von 0,0016 min<sup>-1</sup> mit 6xHis-Cdc42 erreicht. (A-D) Gezeigt ist jeweils ein Experiment aus mindestens drei Wiederholungen.

## 2.2 Die Stöchiometrie der TGM2-vermittelten Monoaminylierung

Neben der Spezifität der TGM2-vermittelten Histaminylierung ist auch die Stöchiometrie einer solchen Reaktion von Interesse. Daher wurden Versuche durchgeführt, bei denen unter saturierenden Bedingungen GST-Gα<sub>01</sub> und HA mit TGM2 umgesetzt wurden. Geht man von einer quantitativen Reaktion aus, sollte bei steigenden HA-Konzentrationen hyperbolisch ein Plateau erreicht werden. Teilt man den ermittelten Wert durch die Menge des eingesetzten Proteins, sollte sich nach Korrektur unspezifischer Anteile ein ganzzahliges Verhältnis ergeben, das indikativ für die Stöchiometrie der Reaktion ist. In Abbildung 18 ist das Ergebnis eines wie oben beschrieben durchgeführten Versuchs dargestellt. Im Bereich von 0 mM bis 10 mM HA ergibt sich eine Sättigungskurve, an die eine HILL-Gleichung angepasst werden kann. Die numerische Lösung der Gleichung ergibt ein Maximum von 1,02 und damit ein äquimolares Verhältnis von Gα<sub>01</sub> und HA.



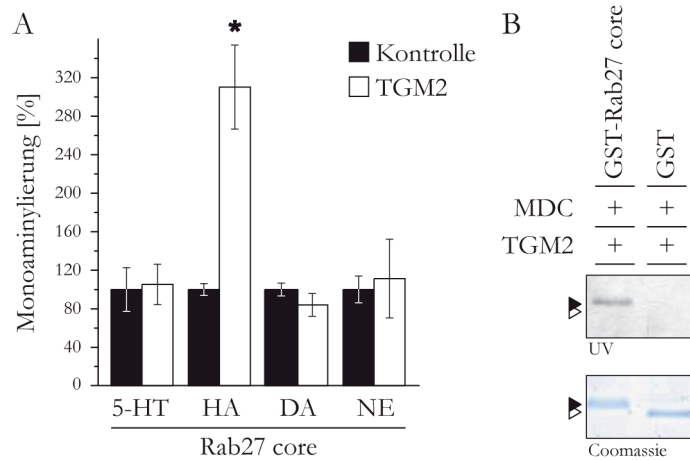
**Abbildung 18: Durchschnittlich wird jedes Mol GST-G $\alpha_{01}$  mit einem Mol HA modifiziert.** Die Bestimmung der Stöchiometrie der Monoaminierung durch *in vitro*-Transamidierung von GST-G $\alpha_{01}$  mit HA und TGM2 unter Sättigungsbedingungen ergibt nach Korrektur der mit GST alleine gemessenen Werte eine Sättigungskurve. Diese kann mit einer HILL-Gleichung beschrieben werden und strebt dem Wert 1,02 zu.

### 2.3 Der katalytische Q-Rest wird in GTPasen spezifisch monoaminiert

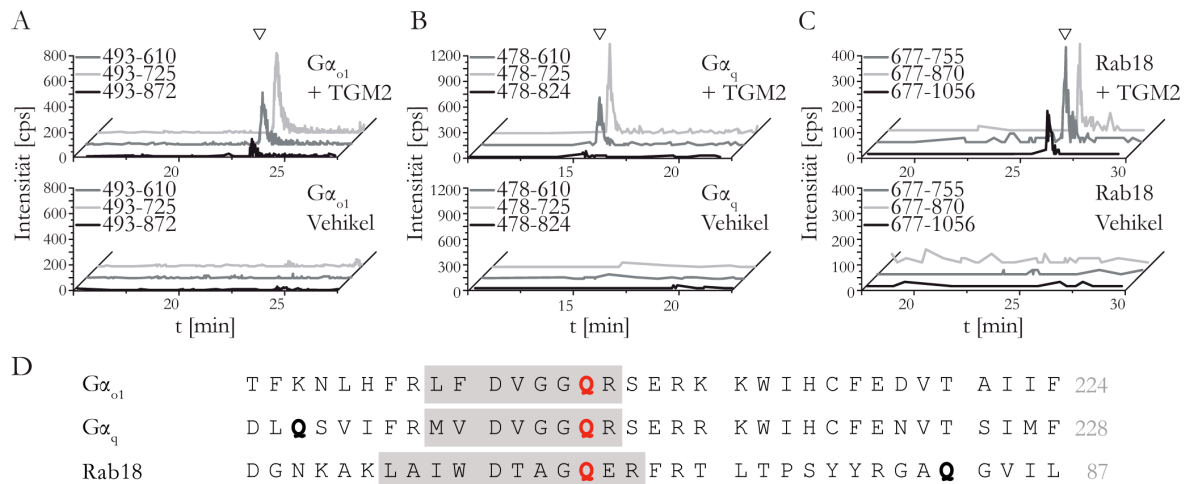
Zur Bestimmung des modifizierten Q-Restes wurde zunächst ein Teil der in Abschnitt III.1.2 bestimmten konservierten Sequenz von Rab27 kloniert. Der den katalytischen Q-Rest enthaltende Bereich LWDTAGQERFRS (Rab27 core) wurde dabei in einen pGEX-Expressionsvektor eingebracht, der mit einem zusätzlichen Q-freien Verbindungsabschnitt versehen war. Das Fusionsprotein wurde dann in *in vitro*-Monoaminierungsexperimenten auf die Inkorporation von [ $^3$ H]-Monoaminen und MDC untersucht. Wie in Abbildung 19 A zu erkennen wird GST-Rab27 core durch TGM2 sehr effizient histaminiert. Um auszuschließen, dass die Modifikation an einem Q-Rest des Fusionspartners stattfindet, wurden zudem Versuche mit GST als Kontrolle durchgeführt. In Abbildung 19 B ist das Ergebnis der TGM2-vermittelten Inkorporation von MDC dargestellt, aus dem eine spezifische Modifikation des aus Rab27 stammenden Peptids zu entnehmen ist. Demgegenüber konnte keine Monoaminierung von GST nachgewiesen werden.

Neben dem Nachweis der Monoaminierung mittels Inkorporation von radioaktiv oder Biotin-markierten Monoaminen sollte eine direkte Demonstration der Modifikation des katalischen Q-Restes erfolgen. Dazu wurde eine massenspektrometrische Methode gewählt, bei der zum Einen tryptische Peptide der GTPasen G $\alpha_{01}$ , G $\alpha_q$  und Rab18 auf die berechnete, durch Histaminierung zu erwartende Massendifferenz untersucht wurden. Zum Anderen wurden solche Peptide durch gezielte Fragmentierung und Detektion des Fragmentspektrums sequenziert. Bei dieser MRM- oder Q1/Q3-Methode wird mit einem speziellen QTRAP-Massenspektrometer zunächst das erwartete Peptid selektiert (Q1), dieses fragmentiert (Q2) und entweder ein spezielles Produkt in Q3 detektiert oder ein Fragmentspektrum aufgenommen (siehe Abbildung 10 in Abschnitt II.5.4.7). Zum Nachweis der Modifikation von G $\alpha_{01}$  wurde nach tryptischem Verdau das dem katalytischen Zentrum entsprechende

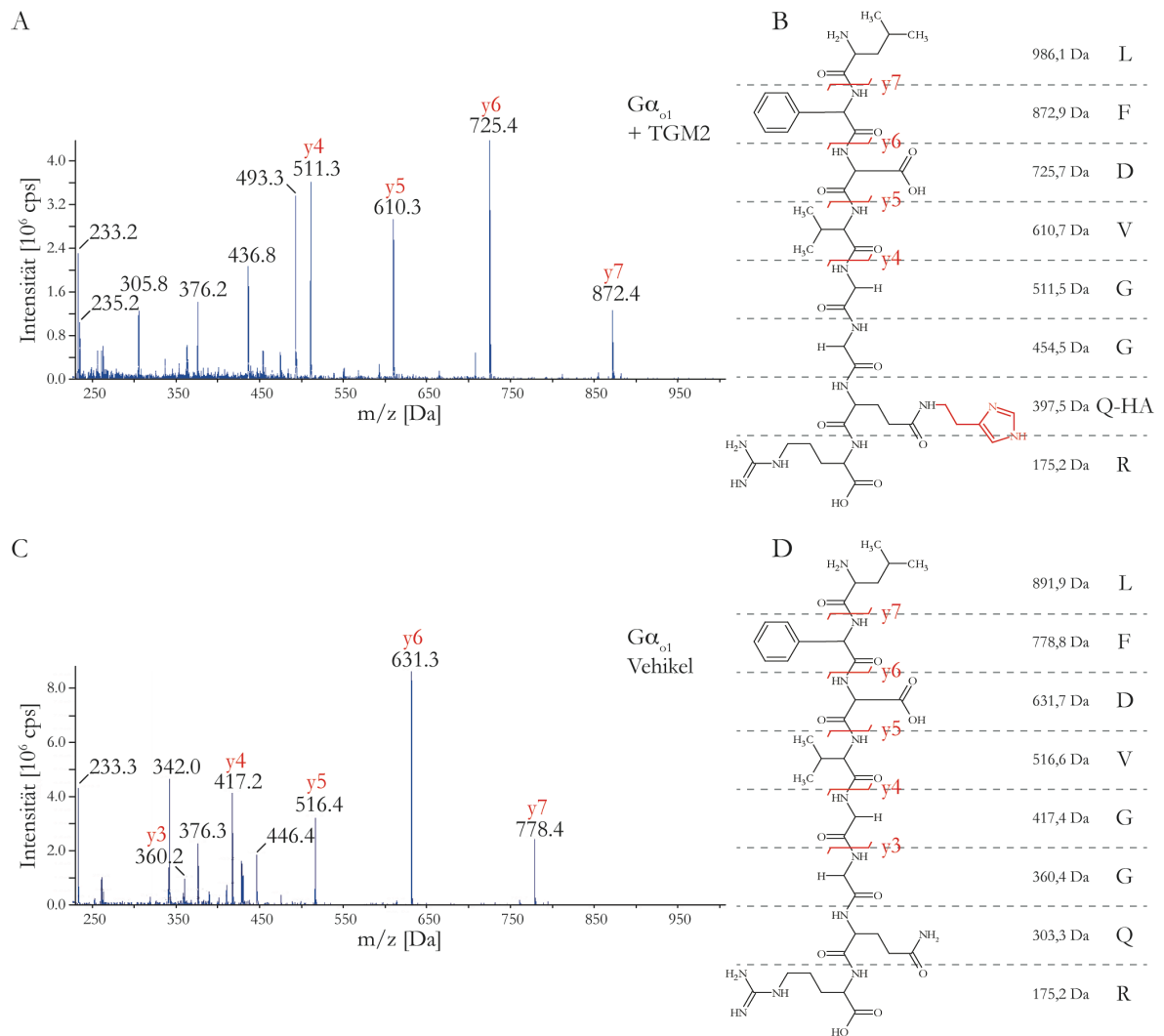
Peptid LFDVGGQR in Form der drei MRM-Übergänge 493-610, 493-725 und 493-872 untersucht.



**Abbildung 19: Das zentrale Q-haltige Peptid LWDTAGQERFRS aus Rab27 wird TGM2-abhängig monoaminyliert.** (A) Bei der *in vitro*-Monoaminylierung von 80 pmol GST-Rab27 core mit TGM2 zeigt sich eine starke Inkorporation von HA. \*p < 0,05 TGM2 vs. Kontrolle (B) In Gegenwart von TGM2 wird MDC kovalent mit GST-Rab27 core verknüpft, nicht jedoch mit GST alleine. (A-B) Gezeigt ist jeweils ein Experiment aus mindestens drei Wiederholungen.



**Abbildung 20: Die katalytischen Q-Reste der GTPasen Gα<sub>o1</sub>, Gα<sub>q</sub> und Rab18 werden TGM2-abhängig histaminyliert.** (A) Für die drei untersuchten MRM-Übergänge 493-610, 493-725 und 493-872 des tryptischen Peptids LFDVGGQR aus Gα<sub>o1</sub> ist im Chromatogramm jeweils ein einzelnes Signal erkennbar. Dieses tritt in Ansätzen ohne TGM2 nicht auf. (B) Auch das tryptische Peptid MVDVGGQR (Gα<sub>q</sub>) wird TGM2-abhängig histaminyliert, wie aus dem Chromatogramm der MRM-Übergänge 478-610, 478-725 sowie 478-824 ersichtlich ist. (C) Das tryptische Peptid LAIWDTAGQER aus Rab18 liegt nach Monoaminylierung mit TGM2 und HA modifiziert vor, wie durch Nachweis der MRM-Übergänge 677-755, 677-870 und 677-1056 gezeigt. (D) Sequenzen der untersuchten GTPasen im Bereich des katalytischen Zentrums. Markiert sind die in (A-C) vermessenen Peptide.



**Abbildung 21: Das Fragmentationsspektrum des  $G\alpha_{o1}$ -Peptids LFDVGGQR belegt die TGM2-vermittelte Histaminierung des Q-Restes an Position 205.** (A-B) Das MS/MS-Spektrum der MRM-Übergänge zeigt ein Fragmentationsspektrum welches für das hypothetische histaminierete Peptid LFDVGG(Q-HA)R aus dem katalytischen Zentrum von  $G\alpha_{o1}$  typisch ist. Erkennbar sind dabei die an der Peptidbindung gespaltenen Fragmente y4 (511,3 Da), y5 (610,3 Da), y6 (725,4 Da) und y7 (872,4 Da). (C-D) Im Kontrollansatz ohne TGM2 können im Fragmentationsspektrum der MRM-Übergänge die Fragmente y3 (360,2 Da), y4 (417,2 Da), y5 (516,4 Da), y6 (631,3 Da) und y7 (778,4 Da) nachgewiesen werden. Diese sind indikativ für ein nicht modifiziertes LFDVGGQR-Peptid.

Wie in Abbildung 20 A dargestellt wurde in den unbehandelten Proben kein histaminieretes Peptid detektiert, während in TGM2 enthaltenden Proben die drei erwarteten Fragmente auftraten. Analog dazu wurde auch  $G\alpha_q$  untersucht. Hier konnten ebenfalls die drei für histaminieretes  $G\alpha_q$  typischen MRM-Übergänge 478-610, 478-725 und 478-824 gefunden werden. In Kontrollproben traten diese nicht auf (siehe Abbildung 20 B). Für die kleine GTPase Rab18 wurde das tryptische Peptid LAIWDTAGQER (siehe Abbildung 20 D) fragmentiert. Wie in Abbildung 20 C gezeigt wurden hier ebenfalls drei MRM-Übergänge gefunden, die für histaminieretes Rab18 indikativ sind und nicht in unbehandelten Proben auftraten. Neben

dem Nachweis von monoaminylierten Peptiden wurde auch nach deamidierten Fragmenten gesucht, die jedoch nicht nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Um die Identität der tryptischen Peptide zu bestätigen und die genaue Position des modifizierten Restes zu ermitteln, wurden Fragmentspektren des modifizierten und unmodifizierten  $G\alpha_{o1}$ -Peptids LFDVGGQR aufgenommen, die in Abbildung 21 wiedergegeben sind. Typischerweise erfolgt die Fragmentierung dabei an der Peptidbindung, was für ein Oktapeptid in acht detektierbaren Produkten resultiert. Wie in Abbildung 21 A zu erkennen ist, konnten vier gemessene Massensignale den in Teilabbildung B dargestellten Fragmenten zugeordnet werden. Durch diesen Fingerabdruck konnte das histaminylierte  $G\alpha_{o1}$ -Peptid somit zweifelsfrei identifiziert werden. Als Kontrolle wurde ebenfalls das nicht modifizierte Peptid analysiert. Wie aus Abbildung 21 C zu erkennen, konnten hier fünf der maximal möglichen 8 Fragmente zugeordnet werden. Auch hier stimmen die Massen mit den in Teilabbildung D aufgeführten theoretischen Fragmentgrößen überein. Die gefundene Massendifferenz von modifiziertem und nichtmodifiziertem  $G\alpha_{o1}$ -Peptid beträgt, berücksichtigt man alle gefundenen Fragmente, 94,03 Da. Die durch Histaminylierung zu erwartende Differenz beträgt 94,12 Da.

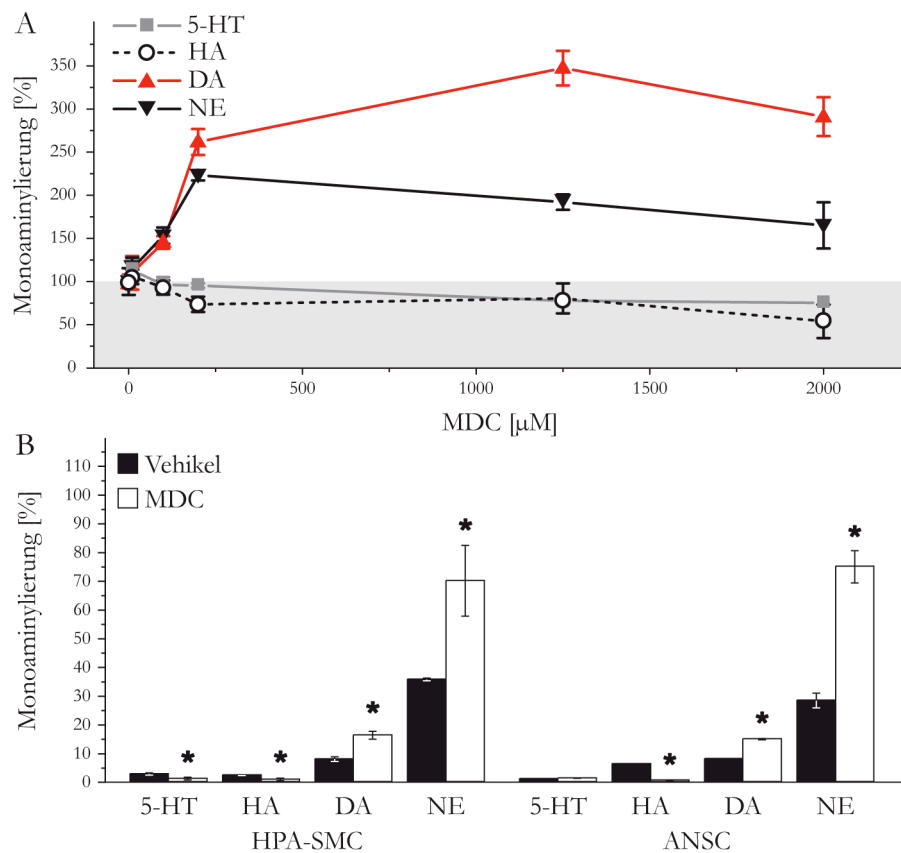
#### 2.4 Die Inhibition der Monoaminylierung durch MDC

Das fluoreszierende Cadaverin-Derivat MDC gilt als kompetitiver Inhibitor von TGM [246]. Da in einigen Experimenten unerwartete Effekte nach Zugabe dieses Stoffes auftraten, wurde eine Analyse der inhibitorischen Eigenschaften von MDC auf die Monoaminylierung *in vitro* und in Zellkulturen durchgeführt. Dazu wurde zunächst die TGM2-vermittelte Inkorporation von [ $^3$ H]-markiertem 5-HT, HA, DA und NE in die kleine GTPase GST-Arf1 untersucht.

Wie aus Abbildung 22 A ersichtlich führt die Anwesenheit von 200-2000  $\mu$ M MDC bei Serotonylierung und Histaminylierung zu einer Inhibition. Im Fall der Dopaminylierung und Norepinephrinylierung dagegen kann eine deutliche Aktivierung der Reaktion bis auf 346 % (DA) bzw. 222 % (NE) des Kontrollwertes beobachtet werden. Diese erreicht ihr Maximum bereits bei 200  $\mu$ M MDC und verringert sich auch bei Zugabe hoher Konzentrationen des Kompetitors kaum.

In Abbildung 22 B sind die Ergebnisse von Inkorporationsexperimenten mit [ $^3$ H]-markierten Monoaminen in humanen pulmonären glatten Muskelzellen (HPA-SMC) und murinen adulten neuronalen Stammzellen (ANSC) in Abhängigkeit von 0,5 mM MDC dargestellt. Dabei wurden die Zellen mit dem Monoamin inkubiert und die proteingebundene Radioaktivität durch Säurefällung des Zellhomogenats bestimmt. Erkennbar ist für 5-HT (HPA-SMC) und HA (HPA-SMC, ANSC) eine signifikante Reduktion der Monoaminylierung,

Dopaminylierung und Norepinephrinylierung dagegen steigen unter Einfluss von MDC signifikant bis zu einer Verdoppelung des Kontrollwertes an.



**Abbildung 22: Dopaminylierung und Norepinephrinylierung wird, anders als Serotoninylierung und Histaminylierung, durch MDC aktiviert.** (A) Die TGM2-vermittelte Monoaminylierung von GST-Arf1 wird *in vitro* durch MDC beeinflusst. Dabei kann eine starke Aktivierung der Inkorporation von DA und NE sowie eine Hemmung der Inkorporation von 5-HT und HA beobachtet werden. (B) Die Aktivierung der Dopaminylierung und Norepinephrinylierung durch 0,5 mM MDC kann auch in den zwei Zelllinien HPA-SMC und ANSC nachgewiesen werden. \* $p < 0,05$  (A,B) dargestellt sind jeweils repräsentative, in Dreifachbestimmung ausgeführte Experimente aus mehreren Wiederholungen.

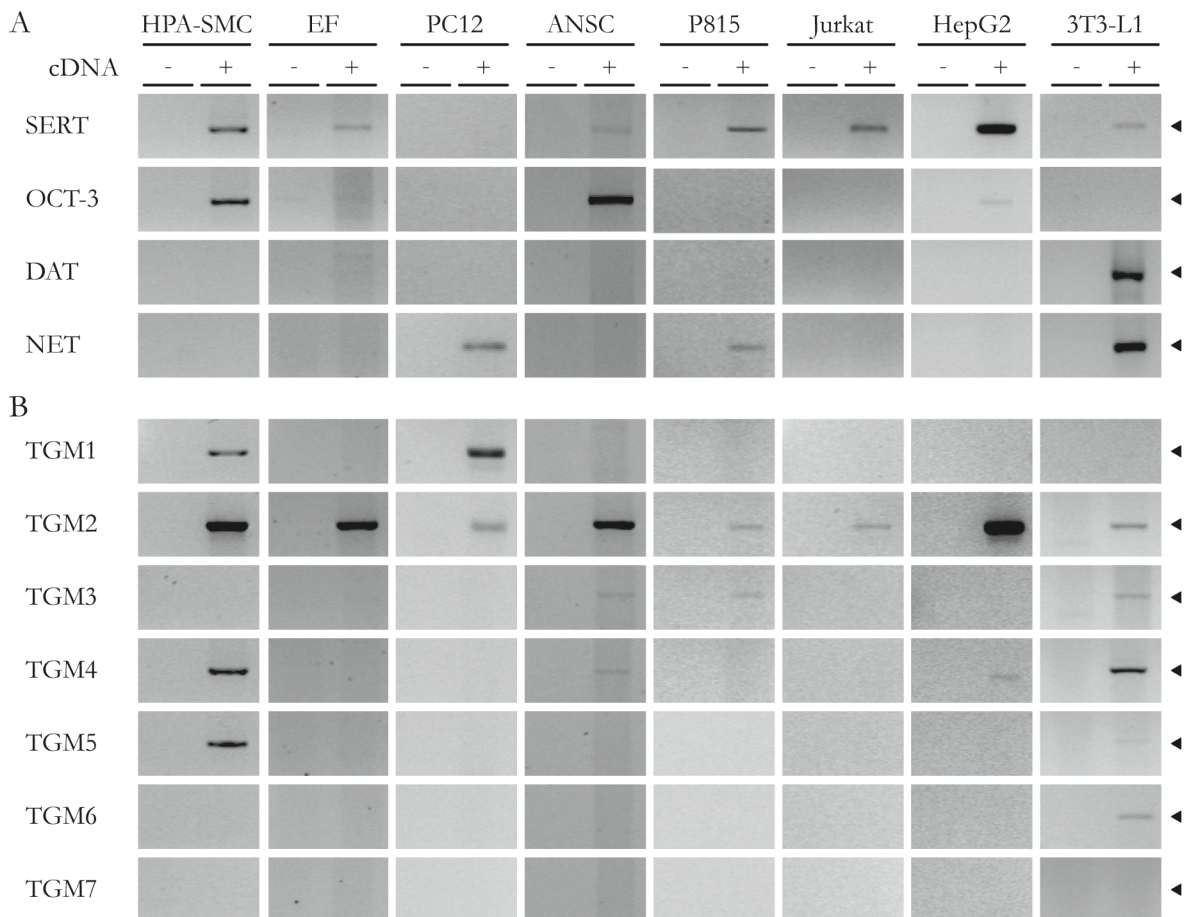
### 3 Die Rolle der Monoaminylierung in zellulären Prozessen

#### 3.1 Monoaminylierung kann in vielen Zelllinien nachgewiesen werden

##### 3.1.1 Die Expression von TGM und Monoamin-Transportern in Zelllinien

Monoamin-Transporter müssen als wichtige Bestandteile der zellulären Monoaminylierungs-Maschinerie gelten, da für diese erhöhte intrazelluläre Monoamin-Konzentrationen nötig sind [198]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher acht Zelllinien in Bezug auf die Expression von Monoamin-Transportern charakterisiert werden. Das Ergebnis der PCR-Versuche zur Amplifizierung von Transporter-cDNA ist in Abbildung 23 A dargestellt.





**Abbildung 23: Die Expression von Monoamin-Transportern und TGM variiert in den untersuchten Zelllinien.** (A) Während Transkripte des Transporters SERT in den meisten Zelllinien nachgewiesen werden konnten, wird OCT-3 nur in HPA-SMC, ANSC und HepG2 exprimiert. NET trat lediglich in PC12, P815 und 3T3-L1-Adipozyten auf, und DAT konnte ausschließlich in 3T3-L1-Adipozyten gefunden werden. (B) Die am weitesten verbreitete TGM ist TGM2, wobei Transkripte für TGM3 und 4 ebenfalls in 3 bzw. 4 Zelllinien gefunden wurden. Die Expression von TGM1, 5, und 6 dagegen konnte jeweils nur in einzelnen Fällen gezeigt werden und TGM7 war in keiner Zelllinie nachweisbar. Gezeigt sind analytische Fragmente, deren Identität durch Sequenzierung bestätigt wurde.

Der 5-HT-Transporter SERT (5HTT; SLC6A4) wird in HPA-SMC, embryonalen Maus-Fibroblasten (EF), ANSC, Jurkat-T-Zellen, der Hepatozytoma-Zelllinie HepG2 sowie in 3T3-L1-Adipozyten exprimiert. Dagegen kann der HA-Transporter OCT-3 (HAT; EMT) lediglich in HPA-SMC, ANSC und HepG2 nachgewiesen werden. Während der DA-Transporter DAT (SLC6A3) ausschließlich in 3T3-L1-Adipozyten detektiert werden kann, liegt eine Expression des NE-Transporters NET (SLC6A2) in der Phäochromozytoma-Zelllinie PC12, in der Mastozytoma-Zelllinie P815 sowie in zu Adipozyten differenzierten 3T3-L1-Zellen vor.

Neben Monoamin-Transportern erfüllen TGM als die Modifizierung katalysierende Enzyme eine zentrale Aufgabe im Kontext der Monoaminylierung. Die Charakterisierung der Expression von TGM in den relevanten Zelllinien ist daher nützlich für das Verständnis dieses regulativen Mechanismus. Wie in Abbildung 23 B dargestellt konnte TGM1 in den Zelllinien

HPA-SMC und PC12 nachgewiesen werden. Transkripte der als ubiquitär geltenden TGM2 wurden in allen untersuchten Zelllinien gefunden. Eine Expression von TGM3 findet in ANSC, P815 und 3T3-L1-Adipozyten statt, während TGM4-Transkripte in HPA-SMC, ANSC, HepG2 und 3T3-L1-Adipozyten vorliegen. Die schlechter charakterisierten TGM 5, 6 und 7 konnten nur in einzelnen Zelllinien bzw. gar nicht nachgewiesen werden. So wird TGM5 in HPA-SMC und 3T3-L1-Adipozyten und TGM6 lediglich in letzteren exprimiert. Zu bemerken bleibt weiterhin, dass in 3T3-L1-Adipozyten fünf der sieben untersuchten TGM gefunden werden konnten, wohingegen andere Zelllinien nur eine (EF, Jurkat), zwei (PC12, P815, HepG2), drei (ANSC) oder vier (HPA-SMC) TGM-Spezies exprimieren.

### 3.1.2 Zelllinien inkorporieren 5-HT, HA, DA und NE in unterschiedlichen Mengen

Da alle untersuchten Zelllinien, wie in Abschnitt III.3.1.1 beschrieben, eine oder mehrere TGM sowie unterschiedliche Monoamin-Transporter exprimieren, sind hier die Grundvoraussetzungen für eine Monoaminylierung zellulärer Proteine gegeben. Um festzustellen, welche Zellen tatsächlich biogene Monoamine inkorporieren und in wie weit dies TGM-abhängig geschieht, wurden wiederum Versuche mit [<sup>3</sup>H]-markiertem 5-HT, HA, DA und NE durchgeführt. Dazu wurde mit Monoaminen inkubiert, geerntet, die Zellen nach Waschen durch Behandlung mit PCA aufgeschlossen und die Proteinfraktion abgetrennt. Im Überstand sollten sich säurelösliche Bestandteile der Zytosols wie aufgenommene freie Monoamine befinden, während nahezu alle zellulären Proteine gefällt und im Zentrifugat detektiert werden. Abbildung 24 A zeigt zunächst das Ergebnis der Experimente zur Aufnahme von Monoaminen in die acht erwähnten Zelllinien. Beachtenswert ist dabei die hohe Aufnahme von NE in PC12 (44,36 pmol) und ANSC (38,05 pmol) sowie die mit 23,35 pmol ebenfalls hohe Aufnahme von HA in ANSC. Die meisten Zelllinien nehmen allerdings deutlich weniger [<sup>3</sup>H]-Monoamin auf, wie z.B. 5-HT in HPA-SMC (4,78 pmol). Insbesondere Jurkat, HepG2 und 3T3-L1-Adipozyten nehmen vergleichsweise geringe Monoamin-Mengen von unter 1 pmol auf. Betrachtet man die in Abbildung 24 B gezeigte Inkorporation der besagten Monoamine, so fällt zuerst auf, dass eine Monoaminylierung in allen Zelllinien nachweisbar ist. Besonders hohe Inkorporationswerte wurden für PC12 (1562 fmol DA und 1180 fmol NE), Jurkat (1221 fmol NE) und ANSC (1182 fmol NE) ermittelt.

Generell lässt sich keine direkte Anhängigkeit von Aufnahme und Inkorporation ableiten, da z.B. in Jurkat-Zellen von 1,95 pmol aufgenommenem NE 1,22 pmol proteingebunden vorlagen, während von 23,35 pmol in ANSC vorhandenem HA lediglich 0,11 pmol in der Proteinfraktion nachgewiesen werden konnten. Sehr geringe Monoaminylierungen wurden in HPA-SMC, HepG2 und 3T3-L1-Adipozyten gemessen.

A

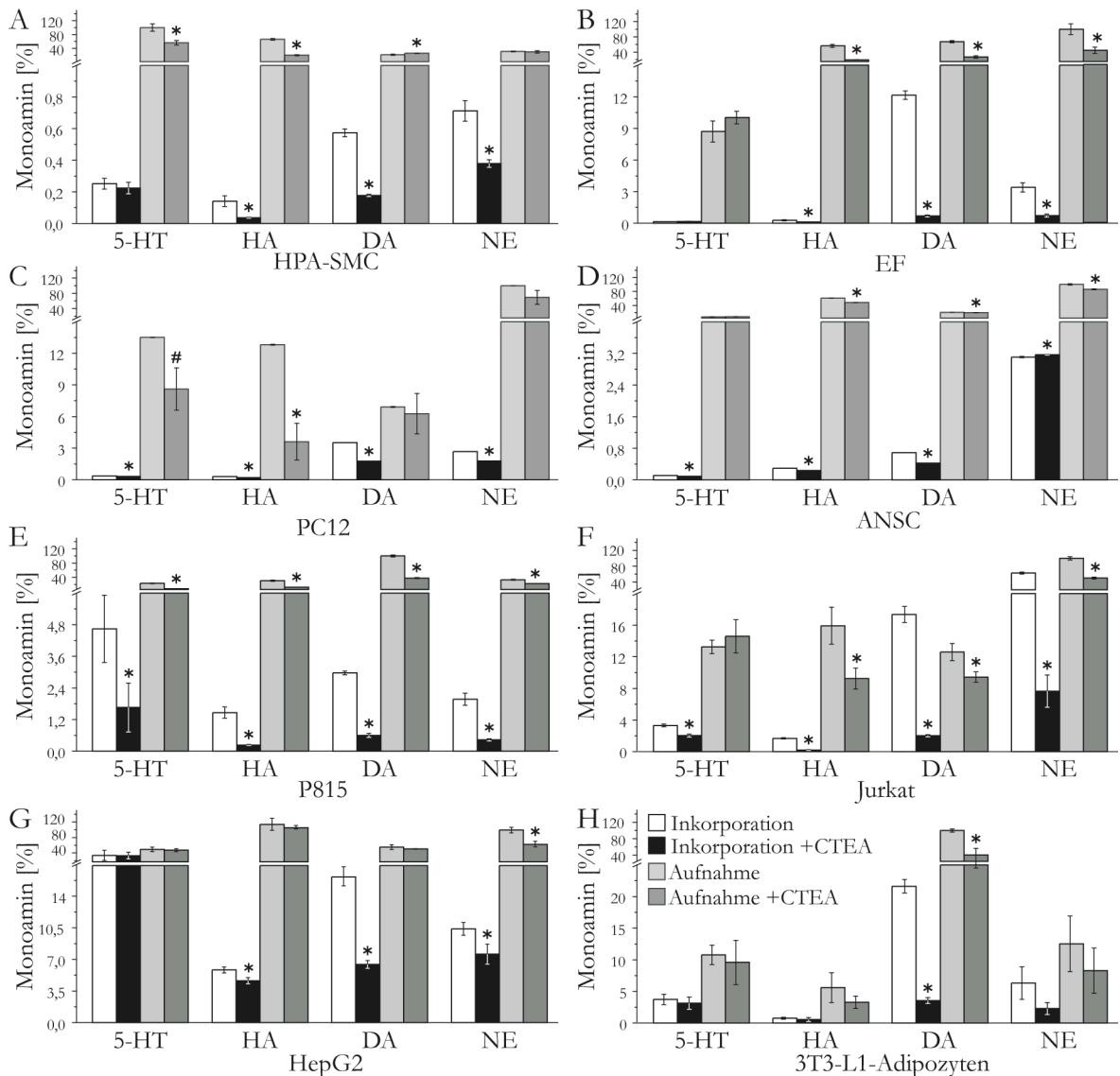
		Monoamin-Aufnahme [pmol]							
		HPA-SMC	EF	PC12	ANSC	P815	Jurkat	HepG2	3T3-L1
5-HT		4,78 ± 0,52	0,59 ± 0,07	5,99 ± 0,01	3,02 ± 0,04	0,42 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01
HA		3,16 ± 0,12	3,83 ± 0,27	5,68 ± 0,02	23,35 ± 0,09	0,56 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,03 ± 0,01
DA		1,01 ± 0,08	4,59 ± 0,19	3,06 ± 0,02	7,83 ± 0,02	1,83 ± 0,05	0,25 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,60 ± 0,02
NE		1,48 ± 0,05	6,82 ± 0,96	44,34 ± 0,06	38,05 ± 0,78	0,61 ± 0,02	1,95 ± 0,08	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,03

B

		Monoaminylierung [fmol]							
		HPA-SMC	EF	PC12	ANSC	P815	Jurkat	HepG2	3T3-L1
5-HT		12,0 ± 1,6	10,0 ± 0,4	163,5 ± 1,5	42,8 ± 0,6	85,0 ± 23,4	64,5 ± 3,4	76,7 ± 34,8	22,5 ± 5,0
HA		6,7 ± 1,6	18,9 ± 4,2	135,3 ± 0,5	111,6 ± 1,0	26,8 ± 3,9	32,5 ± 1,7	13,1 ± 0,9	4,6 ± 0,9
DA		27,4 ± 1,2	829,0 ± 27,6	1562,0 ± 4,4	261,5 ± 1,0	54,4 ± 1,3	337,9 ± 19,8	36,2 ± 2,8	130,5 ± 6,5
NE		34,0 ± 3,1	232,1 ± 30,5	1180,7 ± 4,8	1182,6 ± 6,6	36,1 ± 4,2	1221,1 ± 50,1	23,3 ± 1,9	38,1 ± 15,5

**Abbildung 24: Die Aufnahme und Inkorporation von biogenen Monoaminen variiert stark zwischen den untersuchten Zelllinien.** (A) Die höchsten Aufnahmeraten wurden für NE in PC12 und ANSC gemessen, gefolgt von einer hohen HA-Aufnahme in ANSC. Die Aufnahme von DA und 5-HT war im Vergleich dazu gering. Die Zelllinien P815, Jurkat, HepG2 sowie 3T3-L1-Adipozyten zeigten für alle Monoamine eine deutlich geringere Aufnahme als HPA-SMC, EF, PC12 und ANSC. (B) Nach Säurefällung der Proteinfraktion traten in den meisten untersuchten Zelllinien hohe DA- und NE-Inkorporationen auf. Einzig in HPA-SMC wurden kaum inkorporierte Monoamine gefunden. Die höchsten Inkorporationswerte wurden in PC12 (DA und NE) ANSC (NE) und Jurkat (NE) gemessen, die HA-Inkorporation war im Vergleich dazu generell niedrig. (A-B) Gezeigt sind repräsentative Werte eines von mindestens 3 Experimenten. Eine Übersicht der zugrunde liegenden Experimente findet sich auch in Abbildung 25. Die dargestellten Grauwerte beruhen auf logarithmischer Auftragung.

Eine Überprüfung der TGM-Abhängigkeit der ermittelten Monoamin-Inkorporation sollte anschließend durch Vergleich mit CTEA-behandelten Zellen erfolgen. Dazu wurden die erwähnten acht Zelllinien vor Zugabe der [<sup>3</sup>H]-Monoamine mit 0,5 mM CTEA präinkubiert und dann eine Analyse der Aufnahme und Inkorporation wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 im Vergleich mit den bereits in Abbildung 24 aufgeführten Werten als relative Veränderungen dargestellt. Dabei wurde auf die in der jeweiligen Zelllinie höchste Monoamin-Aufnahme normalisiert. Zunächst fällt auf, dass durch Zugabe von CTEA nicht nur die Monoaminylierung, sondern in einigen Fällen auch die Monoamin-Aufnahme gehemmt wird. Dies trat vor allem bei HA auf, wie z.B. die Reduktion der Aufnahme auf 28 % bei PC12, bei HPA-SMC (31 %) oder EF (35 %). Demnach ähnelt die Transportcharakteristik des kompetitiven Inhibitors CTEA am ehesten den Eigenschaften von HA. Eine starke Inhibition findet sich allerdings in Einzelfällen ebenfalls bei 5-HT (66 % in P815), DA (62 % in P815) und NE (55 % in EF).



**Abbildung 25: Die Monoaminylisierung kann in vielen Zelllinien detektiert werden und ist nicht direkt abhängig von der aufgenommenen Monoamin-Menge.** (A) HPA-SMC nehmen hauptsächlich 5-HT auf, intrazelluläres HA, DA und NE sind aber auch nachweisbar. Es kann eine niedrige signifikant TGM-abhängige DA- und NE-Inkorporation beobachtet werden, 5-HT und HA werden dagegen kaum inkorporiert. Die Aufnahme von 5-HT und HA ist CTEA-abhängig verringert. (B) IL2-aktivierte Jurkat T-Zellen zeigen nur geringe Aufnahme von 5-HT, HA und DA, intrazelluläres NE hingegen lässt sich nachweisen. Eine Inkorporation von 5-HT und HA ist dementsprechend kaum vorhanden. Dopaminylisierung und Norepinephrynylierung erreichen Werte von 17 % respektive 63 % des intrazellulären NE und sind signifikant TGM-abhängig. (C) Die Phäochromozytoma-Zelllinie PC12 nimmt vor allem NE auf, zu geringeren Teilen aber auch 5-HT, HA und DA. Eine signifikant durch CTEA verringerte Catecholamin-Inkorporation ist detektiert, Serotonylisierung und Histaminylisierung sind dagegen nur schwach vorhanden. (D) Murine ANSC zeigen eine ähnliche Aufnahme für alle vier untersuchten Monoamine und eine NE-Inkorporation von 3 %. Diese ist allerdings nicht durch CTEA hemmbar sondern wird sogar leicht verstärkt. (E) Murine EF-Zellen nehmen HA, DA und NE auf, während 5-HT nur zu vergleichsweise geringen Mengen transportiert wird. Detektiert ist weiterhin eine starke DA- und NE-Inkorporation (12 % bzw. 3 %), die signifikant TGM-abhängig ist. 5-HT und HA werden kaum inkorporiert. (F) 3T3-L1-Adipozyten nehmen vergleichsweise große Mengen DA auf und inkorporieren vor allem DA (22 %). Die Aufnahme und Inkorporation der anderen Monoamine bleibt demgegenüber gering. (G) In HepG2-Hepatozyten zeigt sich vor allem eine deutliche 5-HT-Aufnahme und – Inkorporation, die allerdings nicht durch CTEA gehemmt wird. Daneben kann auch Aufnahme und Inkorporation von HA, DA und NE beobachtet werden. (H) Die Aufnahme aller untersuchten Monoamine in P815-Zellen ist vergleichbar hoch, während die stärkste Inkorporation für 5-HT detektiert werden kann. Diese und die HA-, DA- und NE-Inkorporation ist CTEA-abhängig verringert. (A-H) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mehreren Wiederholungen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf die höchste Monoamin-Aufnahme in jeder Zelllinie normalisiert. \* $p < 0,05$  CTEA vs. Kontrolle; # $p = 0,051$  CTEA vs. Kontrolle.

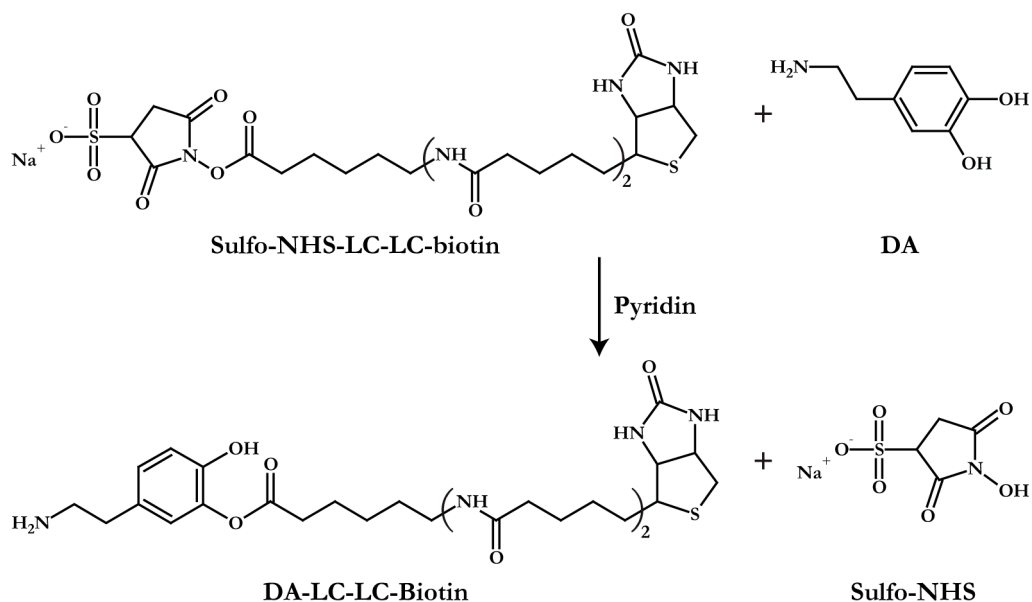
Die durchschnittliche CTEA-abhängige Inhibition der Monoamin-Aufnahme aller Zelllinien beträgt  $47 \pm 23$  % für HA,  $32 \pm 16$  % für NE,  $26 \pm 31$  % für DA und  $16 \pm 29$  % für 5-HT. Falls die gemessene Monoamin-Inkorporation TGM-abhängig ist, sollte unter CTEA-Einfluss eine deutliche Verringerung des proteingebundenen [ $^3$ H]-Monoamins auftreten. Die in Abbildung 25 dargestellten Befunde stützen diese Annahme. So kann für DA in fast allen Zelllinien eine starke CTEA-abhängige Inhibition gefunden werden, wie z.B. in EF (94 %), Jurkat (88 %), 3T3-L1 (84 %), P815 (80 %) und HPA-SMC (69 %). Die DA-Inkorporation kann daher als TGM-vermittelte Dopaminylierung angesehen werden. Eine ähnliche Situation findet sich für NE, wobei hier starke Inhibitionswerte für Jurkat (88 %), EF (79 %), P815 (78 %) und 3T3-L1 (64 %) auftreten. Die CTEA-Abhängigkeit der HA-Inkorporation kann ebenfalls belegt werden, da in Jurkat, P815 und HPA-SMC (88 %, 84 % bzw. 74 %) eine deutliche Verringerung der proteingebundenen Radioaktivität vorlag. Für die bisher am besten charakterisierte Serotonylierung dagegen wurde nur in einzelnen Fällen eine deutliche CTEA-Abhängigkeit detektiert, wie z.B. in P815-Zellen eine Reduktion auf 36 %. Betrachtet man die durchschnittliche Verringerung der Monoamin-Inkorporation in Gegenwart von CTEA für alle Zelllinien, so findet sich eine hohe Inhibition für DA (70 %), ähnliche Werte für NE und HA (52 % bzw. 50 %) und eine geringe Inhibition für 5-HT (18 %). Diejenigen Zelllinien, in denen die höchste durchschnittliche CTEA-abhängige Inhibition der Monoaminylierung zu finden ist, nämlich P815 (77 %), Jurkat (76 %) und EF (52 %), exprimieren auch relativ wenige Monoamin-Transporter und TGM (siehe Abbildung 23). Zusammenfassend lassen sich daher aufgrund der hohen und CTEA-abhängigen [ $^3$ H]-Monoamin-Inkorporation in vielen Zelllinien die Norepinephrinylierung und besonders die Dopaminylierung als häufig auftretende Phänomene identifizieren.

### 3.2 Identifikation von Zielproteinen der Monoaminylierung

#### 3.2.1 *Die Synthese und Charakterisierung von Biotin-modifizierten Monoaminen*

Die kovalente Verknüpfung von DA mit Proteinen ist seit längerem bekannt [247,55], wurde aber bisher nicht als TGM-vermittelte Reaktion betrachtet. Als reaktive Spezies wird vielmehr ein DA-Chinon betrachtet, das zelluläre Makromoleküle kovalent modifizieren kann. Um ausschließlich Proteine zu identifizieren, die TGM-abhängig dopaminyliert vorliegen, sollte ein Reagenz hergestellt werden, das zum Einen die mögliche Bildung eines Chinons verhindert und zum Anderen für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie geeignet ist. Dazu wurde ein Biotin-markiertes DA-Derivat dargestellt. In Abbildung 26 ist die Synthese unter Verwendung des kommerziellen Kopplungsreagenz Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin

skizziert. Das Produkt DA-LC-LC-Biotin (im folgenden als DA-biotin bezeichnet) zeichnet sich durch einen relativ großen Abstand zwischen der für die Transamidierung essenziellen primären Aminogruppe und dem Biotin-Rest aus. Eine Veränderung der chemischen Eigenschaften des DA soll damit verhindert werden. Ähnliche Synthesestrategien wurden ebenfalls für NE und 5-HT verfolgt, wobei im Fall von 5-HT die Reaktivität der freien Hydroxylgruppe gegenüber dem Biotin-Kopplungsreagenz als gering eingeschätzt wurde. Es wurde weiterhin erwogen, 5-HT-Biotin unter Verwendung von mittels N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (fmoc) geschütztem 5-HT darzustellen. Nach Inkubation mit NHS-LC-Biotin ließ sich das gewünschte Produkt allerdings weder in der Dünnschichtchromatographie noch in einem Transamidierungsversuch nachweisen (Daten nicht gezeigt).



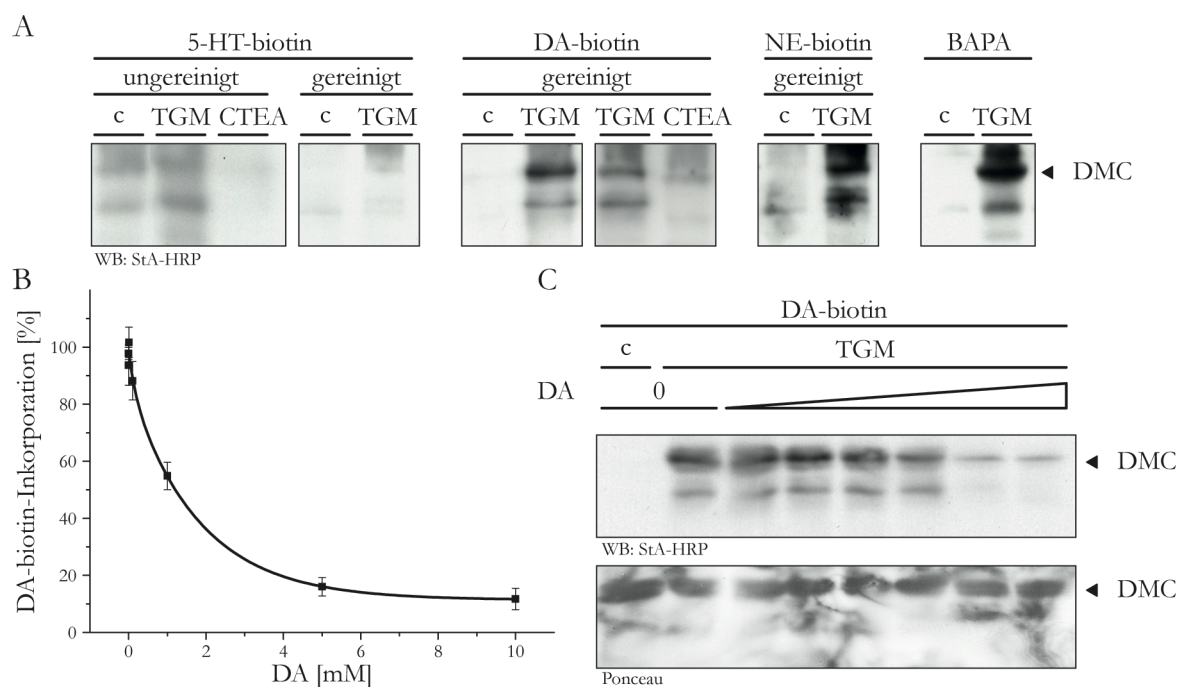
**Abbildung 26: Synthese von DA-biotin.** Die Herstellung von DA-LC-LC-Biotin erfolgte durch Kopplung von Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin mit DA. Die entstehenden Nebenprodukte sind nicht dargestellt.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der *in vitro*-Monoaminylierungsversuche von DMC mit Biotin-markierten Monoaminen zusammengefasst. In Teilabbildung A ist zunächst erkennbar, dass ungereinigtes 5-HT-biotin auch in Proben ohne TGM2 an das Q-Substrat-Protein DMC gebunden vorliegt. Dies deutet auf eine unspezifische Komponente hin. Die synthetisierten Biotin-Monoamine wurden daraufhin durch Absättigung des ungebundenen Sulfo-NHS-LC-LC-Biotins mittels BSA und Proteinfällung gereinigt. Er zeigt sich, dass 5-HT-biotin nach diesem Schritt nicht mehr als Substrat für TGM2-vermittelte Transamidierung fungiert. Gereinigtes DA-biotin dagegen kann TGM2-abhängig an DMC gebunden werden, wie mittels *in vitro*-Monoaminylierung mit anschließender Detektion des Biotin-Restes durch Immunoblotting mit Streptavidin-HRP gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 27 A). Die auftretende Bande



kann zudem durch Inkubation des Reaktionsansatzes mit 10 mM CTEA reprimiert werden. Die Synthese von funktionalem NE-biotin gelang ebenfalls.

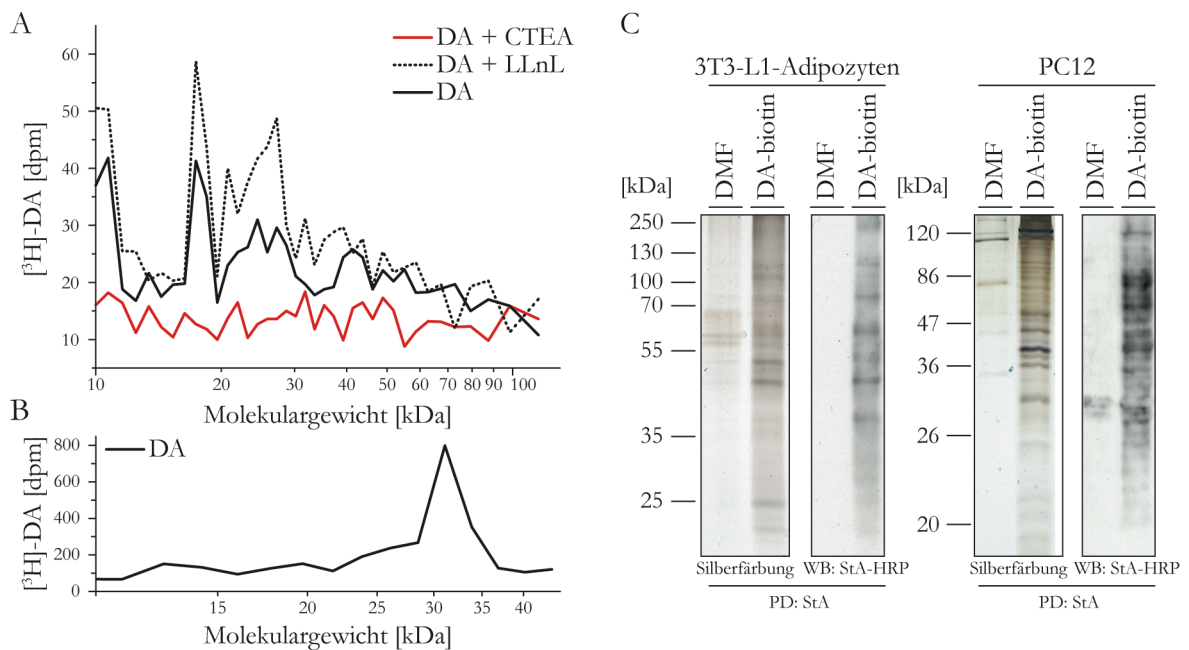
Da in den folgenden Versuchen mit DA-biotin gearbeitet werden sollte, wurde diese Substanz zunächst weiter charakterisiert. Dazu wurde die kompetitive Inhibition der DA-biotin-Inkorporation in DMC durch freies DA untersucht. Dies geschah zu Einem unter Verwendung von immobilisiertem DMC (Abbildung 27 A) und zum Anderen mittels der oben beschriebenen Immunoblotting-Methode (Abbildung 27 B). Die Reaktion kann demnach konzentrationsabhängig durch DA gehemmt werden, wobei die maximale Inhibition bei 88 % liegt. Ein ähnliches Ergebnis findet sich auch bei Immunofärbung: Bei in der Ponceau-Färbung gleich bleibenden DMC-Mengen nimmt die Markierung mit DA-biotin konzentrationsabhängig ab. Die beiden Ergebnisse deuten daher auf eine ähnliche Reaktivität der Aminogruppe beider Substanzen, des Biotin-markierten und des freien DA, hin. Im Folgenden wurde die Substanz zur *de novo*-Identifizierung von potenziell dopaminylierten Proteinen aus lebenden Zellen verwendet.



**Abbildung 27: Die Eigenschaften der Biotin-modifizierten Monoamine.** (A) Ungereinigtes 5-HT-biotin zeigt auch in Abwesenheit von TGM2 eine Bindung an DMC die bei Zugabe von TGM2 verstärkt und in Anwesenheit von 10 mM CTEA vollständig reprimiert wird. Gereinigtes 5-HT-biotin wird TGM2-abhängig nicht an DMC gebunden. Gereinigtes DA-biotin zeigt eine intensive TGM2-vermittelte Bindung an DMC, die durch CTEA stark verringert wird. Gereinigtes NE-biotin wird ebenfalls ausschließlich in Anwesenheit von TGM2 an DMC gebunden. Als Kontrolle diente die BAPAYlierung von DMC durch TGM2. (B) und (C) Unmodifiziertes DA ist in der Lage, die TGM2-vermittelte Kopplung von DA-biotin an DMC dosisabhängig bis auf etwa 10 % zu reduzieren. Dies konnte sowohl durch Quantifizierung von immobilisiertem DA-biotin-DMC (B) als auch mittels Immunoblotting (C) gezeigt werden. (A-C) c – Kontrolle ohne TGM2, TGM – 5 mU TGM2, CTEA – 5 mU TGM2 + 10 mM CTEA. Gezeigt sind jeweils repräsentative Experimente aus mindestens drei Wiederholungen.

### 3.2.2 Die Inkorporation von [ $^3\text{H}$ ]-DA und DA-biotin in PC12- und 3T3-L1-Zellen

Zur Identifizierung von potenziell dopaminylierten Proteinen aus lebenden Zellen wurden die Phäochromozytoma-Zelllinie PC12 und die Präadipozyten-Zelllinie 3T3-L1 gewählt, da beide eine Selektivität für die Dopaminylierung zeigten (siehe Abbildung 24 B). Um zunächst festzustellen, ob die DA-Inkorporation auf ein Protein beschränkt ist oder mehrere Proteine dopaminyliert werden, wurden 3T3-L1-Adipozyten mit [ $^3\text{H}$ ]-DA inkubiert und die erhaltenen Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese in 1 mm breite Streifen geschnitten und darauf haftende Radioaktivität durch Szintillation quantifiziert. Erkennbar sind in Abbildung 28 A diskrete Inkorporations-Maxima bei etwa 18 kDa und 10 kDa. Im höhermolekularen Bereich sind dagegen keine Maxima zu erkennen. Als Kontrollproben wurden Zellen mit dem TGM-Inhibitor CTEA und dem Calpain-Inhibitor LLnL inkubiert, da proteasomaler Abbau als möglicher inaktivierender Mechanismus beschrieben wurde [205,213].



**Abbildung 28: DA-biotin und DA werden in 3T3-L1-Adipozyten und PC12-Zellen in einzelnen Proteinbanden inkorporiert.** (A) In 3T3-L1-Adipozyten zeigt sich nach Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-DA und Transfer des aufgetrennten Lysates auf eine Nitrozellulose-Membran eine bandenähnliche Struktur von dopaminylierten Proteinen. Die meisten der gefundenen Signale werden durch 0,5 mM CTEA verringert und durch 50  $\mu\text{M}$  LLnL verstärkt. (B) Mit TGM2 und [ $^3\text{H}$ ]-DA monoaminyliertes DMC wird nach SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran als distinktes Maximum detektiert. (C) In Lysaten von mit DA-biotin behandelten Zellen finden sich nach Affinitätsaufreinigung mit einer Streptavidin-Matrix diskrete Proteinbanden, die sowohl durch Silberfärbung wie durch Immunoblotting detektiert werden können. Wurden die Zellen lediglich mit dem Vehikel DMF inkubiert, lassen sich deutlich weniger Banden nachweisen. (A-C) StA – Streptavidin. Gezeigt sind repräsentative Experimente aus mindestens drei Wiederholungen.

In Gegenwart von CTEA zeigt sich eine deutliche Reduktion der gemessenen Radioaktivität auf durchschnittlich 15 dpm, und die beschriebenen Maxima werden durch die Inhibition der Monoaminylierung unterdrückt. Im Gegensatz dazu erhöhen sich die erkennbaren Maxima



durch Inhibition des proteasomalen Abbaus auf bis zu 60 dpm. Um die verwendete Methode zu verifizieren wurde ein ähnliches Experiment mit dem Kontrollprotein DMC durchgeführt. Dazu folgte einer *in vitro*-Monoaminylierung mit [<sup>3</sup>H]-DA die oben beschriebene Analyse. Wie in Abbildung 28 B wiedergegeben konnte so ein einzelnes Maximum von 800 dpm bei etwa 30 kDa detektiert werden.

Die Identifizierung von dopaminylierten Proteinen erfolgte anschließend durch Inkubation von PC12- und 3T3-L1-Zellen mit DA-biotin oder dem Lösungsmittel DMF alleine. Nach einer Affinitätsaufreinigung wurden die erhaltenen Isolate in eine SDS-PAGE eingesetzt und die aufgetrennten Proteine entweder durch Silberfärbung visualisiert oder die Dopaminylierung durch Immunfärbung spezifisch nachgewiesen. Im Ergebnis zeigen sich diskrete Banden, die zu großen Teilen sowohl in der Immunfärbung mit Streptavidin-HRP, als auch in der Silberfärbung vorhanden sind (Abbildung 28 C). In Kontrollproben sind dem gegenüber nur vereinzelt schwache Banden sichtbar. Bemerkenswert ist weiterhin, dass sich die beobachteten Proteinmuster für die beiden untersuchten Zelllinien deutlich unterscheiden. So finden sich bei 3T3-L1-Adipozyten die stärksten Signale bei etwa 25, 40 und 50 kDa, während in PC12-Zellen eine prominente Bande bei etwa 40 kDa von einer starken Färbung im höhermolekularen Bereich begleitet wird. Diese Proteine zeigen in der Immunfärbung allerdings keine Reaktivität. Proteine, die sowohl in der Silber- wie in der Immunofärbung auftraten und durch CTEA reprimierbar waren (Daten nicht gezeigt) wurden anschließend aus dem entfärbten Gel isoliert und mittels nanoLC-ESI-MS identifiziert.

### 3.2.3 *Proteine unterschiedlichster Funktion werden in PC12- und 3T3-L1-Zellen monoaminyliert*

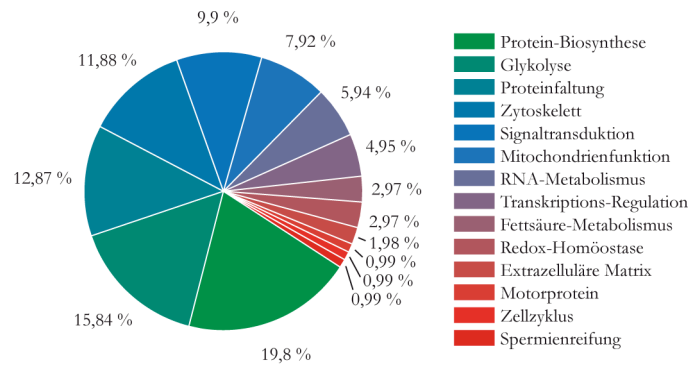
Neben den in Abschnitt III.2.2 beschriebenen Versuchen wurden auch Isolationen mit dem synthetischen Monoamin BAPA durchgeführt. Eine vollständige Liste der mit DA-biotin und BAPA identifizierten Proteine findet sich im Anhang (Tabelle 14), eine verkürzte Liste mit in besonders großer Menge oder Häufigkeit gefundenen Proteinen ist in Tabelle 11 wiedergegeben. Zunächst fällt auf, dass einige Proteine wie Nucleophosmin 1 (NPM1, B23),  $\alpha$ -Enolase, Tubulin, Actin und ATP-Synthase sowohl in unterschiedlichen Zelllinien als auch mit beiden Substanzen gefunden wurden. Betrachtet man weiterhin die unterschiedlichen Funktionsgruppen der identifizierten Proteine (Abbildung 29), so finden sich einige Proteine, die an Biosynthese und Faltung von Proteinen beteiligt sind (19,8 % bzw. 12,87 %). Daneben sind aber auch viele Proteine vertreten, die Synthese und Metabolismus von RNA regulieren (4,95 % bzw. 5,94 %). Enzyme aus unterschiedlichen Synthese- und Abbauwegen wie der Glykolyse (15,84 %) oder dem Fettsäure-Metabolismus (2,97 %) finden sich ebenso wie Strukturproteine des Zytoskeletts (11,88 %) oder Motorproteine (0,99 %). Auffällig ist die

Anwesenheit von mitochondrialen Proteinen (7,92 %), darunter verschiedene ATP-Synthase-Untereinheiten. Die Monoaminylierung von kleinen GTPasen wie Rab1, Rab18, Arf1 und anderen Signalproteinen (9,9 %) kann hier nochmals bestätigt werden.

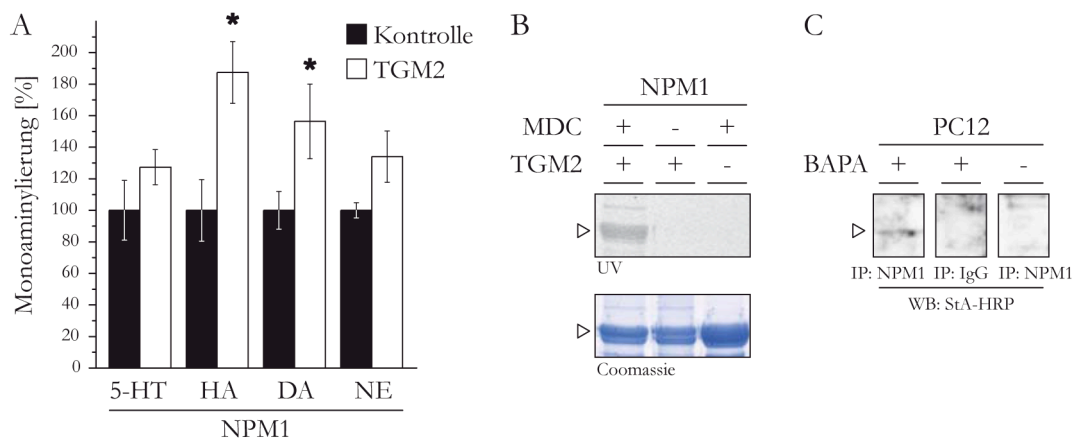
Zusammengenommen sind damit 41,8 % der identifizierten Proteine an Genexpression und Proteinherstellung beteiligt. Aus dieser Gruppe sind besonders NPM1 und das PAI-1 mRNA-Bindeprotein (PAI1BP) hervorzuheben, da beide in mehreren Zelllinien monoaminyliert vorlagen. Aus der Gruppe der glykolytischen Enzyme wurden Lactat-Dehydrogenase und  $\alpha$ -Enolase mehrfach detektiert, und die Gruppe der Strukturproteine besteht ausschließlich aus unterschiedlichen Isoformen von Actin und Tubulin. Im Weiteren wurden die putativ monoaminylierten Proteine NPM1, AnxA2,  $\alpha$ -Enolase, PAI1BP und Rab1b näher untersucht.

**Tabelle 11: Liste der wichtigsten potenziell monoaminylierten Proteine.**

Abkürzung	Protein	Zelllinie	Substanz	Funktion
ACTA_RAT	Actin, aortic smooth muscle	PC12	DA-biotin	Zytoskelett
ACTA_MOUSE	Actin, aortic smooth muscle	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett
ACTB_RAT	Actin beta	PC12	BAPA	Zytoskelett
ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	PC12	DA-biotin	Zytoskelett
ACTB_HUMAN	Mutant beta-actin (beta'-actin)	Jurkat	BAPA	Zytoskelett
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett
ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor 1	HPA-SMC	BAPA	Signaltransduktion
ENOA_RAT	Alpha-enolase	PC12	DA-biotin	Glykolyse
ENOA_RAT	Alpha-enolase	PC12	BAPA	Glykolyse
ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Glykolyse
ANXA1_MOUSE	Annexin A1 (AnxA1)	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion
ANXA2_MOUSE	Annexin A2 (AnxA2)	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion
ATPB_RAT	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit	PC12	BAPA	Mitochondrienfunktion
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Mitochondrienfunktion
ATPG_RAT	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	PC12	DA-biotin	Mitochondrienfunktion
LDHA_MOUSE	Lactate dehydrogenase 1, A chain	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Glykolyse
LDHA_MOUSE	Lactate dehydrogenase 1, A chain	ES	BAPA	Glykolyse
NPM_RAT	Nucleophosmin 1 (NPM1)	PC12	DA-biotin	Proteinfaltung
NPM_HUMAN	Nucleophosmin 1 (NPM1)	HPA-SMC	BAPA	Proteinfaltung
NPM_MOUSE	Nucleophosmin 1 (NPM1)	ES	BAPA	Proteinfaltung
PAIRB_HUMAN	PAI-1 mRNA-binding protein (PAI1BP)	Jurkat	BAPA	RNA-Metabolismus
PAIRB_MOUSE	PAI-1 mRNA-binding protein (PAI1BP)	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	RNA-Metabolismus
RAB1A_HUMAN	RAB1A, member RAS oncogene family	Jurkat	BAPA	Signaltransduktion
RAB18_MOUSE	RAB18, member RAS oncogene family	ES	BAPA	Signaltransduktion
RAB1B_MOUSE	Ras-related protein Rab-1B	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion
TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain	PC12	DA-biotin	Zytoskelett
TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett
TUBA2M_MOUSE	tubulin alpha isotype M-alpha-2	ES	BAPA	Zytoskelett
TBA1A_HUMAN	tubulin alpha	Jurkat	BAPA	Zytoskelett
TBB5_HUMAN	Tubulin beta	Jurkat	BAPA	Zytoskelett
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett



**Abbildung 29: Proteine unterschiedlichster Funktionsgruppen werden monoaminyliert.** Nach Identifizierung mit DA-biotin und/oder BAPA wurden jedem Protein eine allgemeine Funktionsbeschreibung basierend auf der *Gene Ontology*-Kategorisierung zugeordnet. Demnach sind monoaminylierte Proteine an diversen Prozessen der Zelle beteiligt.



**Abbildung 30: NPM1 wird *in vitro* durch TGM2 und in PC12-Zellen monoaminyliert.** (A) Unter Verwendung von TGM2 und [ $^3$ H]-markierten Monoaminen wird GST-NPM1 histaminyliert und dopaminyliert. Die erkennbare Norepinephrinylierung war nicht signifikant, ebenso wie die schwache Serotoninylierung. \* $p < 0,05$  TGM2 vs. Kontrolle (B) GST-NPM1 wird *in vitro* durch MDC und TGM2 modifiziert. Die dafür indikative Fluoreszenz tritt nicht auf, wenn lediglich MDC oder TGM2 alleine eingesetzt wurden. (C) Durch Stimulation mit BAPA kann in PC12-Zellen modifiziertes NPM1 nachgewiesen werden. Nach Immunopräzipitation gegen NPM1 zeigt sich in Gegenwart von BAPA eine StA-reaktive Bande im Immunoblot, die in Abwesenheit von BAPA oder bei Immunopräzipitation mit einem Kontrollantikörper nicht auftritt. IP – Immunopräzipitation, StA – Streptavidin. (A-C) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mehreren Wiederholungen.

### 3.2.4 Die Monoaminylierung des Nukleoli-lokaliserten Proteins NPM1

Zur Charakterisierung von NPM1 wurde die entsprechende cDNA aus murinen ES-Zellen amplifiziert und wie in Abschnitt II.3.1 beschrieben in ein pGEX-Expressionskonstrukt eingebracht. Nach Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurde dieses für *in vitro*-Inkorporationsversuche verwendet. Wie in Abbildung 30 A dargestellt wird NPM1 TGM2-vermittelt monoaminyliert. Am deutlichsten ist eine Histaminylierung zu erkennen, doch liegt auch eine signifikante Dopaminylierung vor. Dieses Ergebnis konnte unter Verwendung von MDC verifiziert werden, da nach Inkubation mit MDC und TGM2 eine fluoreszente NPM1-Bande detektiert werden kann (Abbildung 30 B). Diese tritt nicht auf, wenn lediglich TGM2 oder MDC zugegeben worden waren. Demnach ist NPM1 *in vitro* ein Substrat für die TGM2-

abhängige Monoaminylierung. Weiterhin wurde die Modifizierung des Proteins in lebenden Zellen untersucht. Obwohl die vermutete Dopaminylierung weder in *wt*- noch in EGFP-NPM1 exprimierenden PC12-Zellen nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde eine BAPAylierung gefunden. Dazu wurden *wt*-PC12-Zellen mit 200  $\mu$ M BAPA inkubiert und einer Immunopräzipitation mit Maus-anti-NPM1 unterzogen. Wie in Abbildung 30 C dargestellt tritt im Immunoblot eine Biotin-reaktive Bande nur dann auf, wenn die Zellen zuvor mit BAPA behandelt worden waren und mit dem spezifischen Antikörper gearbeitet wurde.

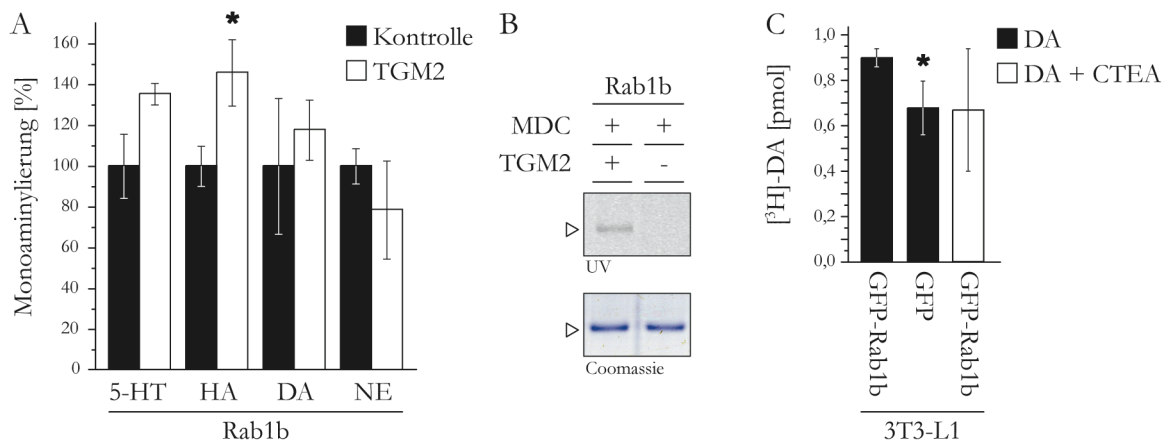
### 3.2.5 *Die kleine GTPase Rab1b wird in 3T3-L1-Zellen monoaminyliert*

Als weiteres putativ monoaminyliertes Protein wurde in 3T3-L1-Adipozyten die kleine GTPase Rab1b identifiziert. Zur Untersuchung derselben wurden zunächst wie in den Abschnitten II3.1 und II3.4 beschrieben pGEX- und pEGFP-Expressionskonstrukte hergestellt. Aufgereinigtes GST-Rab1b wurde dann *in vitro* auf seine Eignung als Substrat für die Monoaminylierung untersucht. Wie in Abbildung 31 A erkennbar wird Rab1b TGM2-vermittelt histaminyliert. Eine signifikante Inkorporation von 5-HT, DA oder NE konnte nicht detektiert werden. Unter Verwendung des fluoreszenten Monoamin-Derivats MDC konnte ebenfalls eine Monoaminylierung nachgewiesen werden (Abbildung 31 B). Die entsprechende Bande tritt nur in Gegenwart von TGM2 auf. Eine prinzipielle Monoaminylierung von Rab1b kann damit als belegt gelten, auch wenn nicht die erwartete Dopaminylierung gefunden wurde. Zur weiteren Charakterisierung wurden daher Zellkulturversuche durchgeführt. Aufgrund der niedrigen endogenen Expression von Rab1b in 3T3-L1-Adipozyten (Daten nicht gezeigt) wurden diese Experimente mit transient mit pEGFP-Rab1b transfizierten 3T3-L1-Zellen durchgeführt. Nach der Inkubation mit [ $^3$ H]-DA wurde eine GFP-Affinitätsaufreinigung durchgeführt und die gebundene Radioaktivität durch Szintillation bestimmt. Demnach tritt in 3T3-L1-Zellen eine nachweisbare Dopaminylierung von Rab1b auf (Abbildung 31 C), da in Proben aus mit pEGFP-C1 transfizierten Kontrollzellen signifikant weniger [ $^3$ H]-DA detektiert werden konnte. Die Inhibition der Transamidierung durch CTEA resultierte zwar in einer Verminderung der Dopaminylierung, die allerdings nicht statistisch signifikant war.

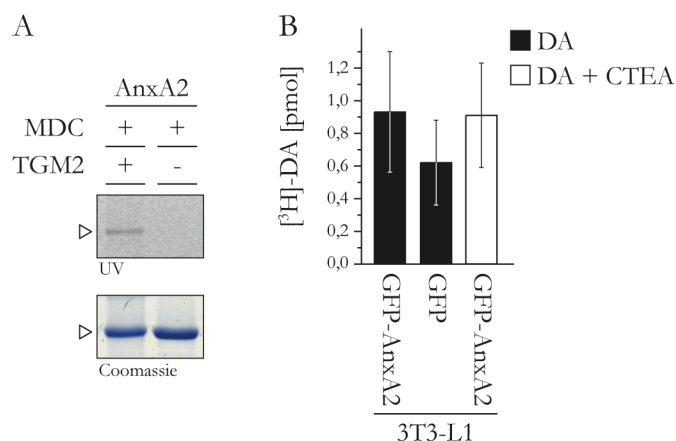
### 3.2.6 *Die Proteine AnxA2, $\alpha$ -Enolase und PAI1BP*

Als weitere Kandidaten für eine zelluläre Monoaminylierung wurden die Proteine AnxA2,  $\alpha$ -Enolase und PAI1BP ausgewählt. Zur Analyse sollten zunächst Expressionskonstrukte hergestellt werden, wobei die Klonierung von PAI1BP auch unter Verwendung verschiedener

Gewebetypen nicht gelang. Für die beiden verbliebenen Proteine wurden erfolgreich pGEX- und pEGFP-Konstrukte generiert. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse für AnxA2 dargestellt. Wie aus Teilabbildung A zu entnehmen wird GST-AnxA2 durch TGM2 *in vitro* mit MDC modifiziert. Die indikative Bande konnte nicht detektiert werden, wenn dem Ansatz kein Enzym zugegeben wurde. Die Untersuchung der Dopaminierung von EGFP-AnxA2 exprimierenden 3T3-L1-Zellen ist in Teilabbildung B wiedergegeben. Es konnte gegenüber den GFP-haltigen Kontrollproben keine signifikant erhöhte Dopaminierung festgestellt werden.



**Abbildung 31: Die kleine GTPase Rab1b wird *in vitro* durch TGM2 und in 3T3-L1-Fibroblasten monoaminierliert.** (A) Eine *In vitro*-Monoaminierung von 200 pmol GST-Rab1b mit 5 mU TGM2 ergibt nur für HA eine signifikante Inkorporation. \* $p < 0,05$  TGM2 vs. Kontrolle (B) In Gegenwart von TGM2 wird GST-Rab1b *in vitro* mit MDC modifiziert. Die fluoreszente Bande ist in der Kontrollprobe ohne TGM2 nicht zu erkennen. (C) Mit Lysaten von transient mit pEGFP-Rab1b oder pEGFP-C1 transfizierten 3T3-L1-Zellen wurde nach Inkubation mit  $^3\text{H}$ -DA eine GFP-Affinitätsaufreinigung durchgeführt. In Eluaten, die Rab1b enthielten, befand sich signifikant mehr Radioaktivität als in Kontrollproben. Wurden zelluläre TGM2 zuvor mit CTEA inhibiert, so fand sich eine nicht signifikante Reduktion. \* $p < 0,05$  TGM2 vs. Kontrolle (A-C) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mehreren Wiederholungen.



**Abbildung 32: Durch TGM2 wird AnxA2 *in vitro* mit MDC modifiziert.** (A) Nach Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  MDC und 5 mU TGM2 lässt sich für GST-AnxA2 eine fluoreszente Bande nachweisen. Diese tritt in Abwesenheit von TGM2 nicht auf. (B) 3T3-L1-Zellen wurden transient mit pEGFP-AnxA2 oder pEGFP-C1 transfiziert, mit  $^3\text{H}$ -DA inkubiert und einer GFP-Affinitätsaufreinigung unterzogen. In AnxA2-haltigen Proben kann keine signifikant erhöhte Radioaktivität nachgewiesen werden. (A-B) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus mehreren Wiederholungen.

## **IV DISKUSSION**

### **1 Biogene Monoamine als Amin-Substrate von TGM**

#### **1.1 HA, DA, NE und 5-HT sind Substrate für die TGM-vermittelte Transamidierung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die TGM-vermittelte Protein-Inkorporation der biogenen Monoamine 5-HT, HA, DA und NE biochemisch untersucht werden, um anschließend zu ermitteln, ob ein solcher Prozess biologische Relevanz hat. Obwohl bereits ab 1959 sowohl über die *in vitro* TGM-abhängige Inkorporation von HA in Proteine wie Insulin als auch über eine kovalente Verknüpfung von HA mit Leberproteinen berichtet wurde [193,195,248], existieren nur wenige Studien zur Eignung von biogenen Monoaminen als TGM-Substrate [249,250,196,197].

Dies erstaunt besonders, da HA aufgrund seiner hohen Affinität sogar als kompetitiver TGM-Inhibitor bezeichnet wurde und die intrazelluläre Präsenz von HA ebenfalls nicht unbekannt ist (siehe Abschnitt I1.3) [196]. Nachdem die Bedeutung der Serotonylierung erkannt worden war (siehe Abschnitt I4), lag eine genauere Untersuchung der Rolle o.g. Monoamine somit nahe. Zunächst lässt sich feststellen, dass alle vier untersuchten Monoamine ebenso wie MDC Substrate für die TGM-vermittelte Protein-Monoaminylierung sind. So wurden, betrachtet man lediglich TGM2 und das Modellsubstrat DMC, für 5-HT (9,4 nmol/U/30'), DA (38,4 nmol/U/30'), NE (41,0 nmol/U/30') und HA (309,6 nmol/U/30') signifikante Mengen kovalent verknüpften Monoamins detektiert (Abbildung 12 B; S. 65); für 5-HT und HA konnte die Modifikation zudem unter Verwendung eines eigens hergestellten Antikörpers durch Immunoblotting visualisiert werden (Abbildung 11; S. 64).

Interessant ist zum einen, dass zumindest *in vitro* die Reaktivität der TGM für das physiologisch bedeutsame Substrat 5-HT um den Faktor 30 niedriger ist als für HA, die beiden Catecholamine zeigen eine intermediäre Reaktivität. Diese Reihenfolge ist konkordant mit der bereits 1959 ermittelten TGM2-vermittelten Inkorporation von HA, NE und 5-HT in Leberproteine [192]. Zum anderen tritt eine deutliche Substratspezifität des Enzyms zutage, die in Anbetracht der Vielzahl bekannter Amin-Substrate nicht erwartet worden war [183]. Daher sollte zukünftig unter dem Gesichtspunkt der chemischen Eigenschaften von 5-HT, DA, NE und HA eine eingehende Analyse zur Bindung an das katalytische Zentrum des Enzyms erfolgen. Möglicherweise lässt sich die Präferenz für HA mit dem relativ kleinen aromatischen System des Imidazols erklären, das gegenüber dem Dihydroxyphenylsystem der

Catecholamine und dem Indolsystem des 5-HT weniger Raum benötigt, zumal da die aromatischen Systeme der letztgenannten Monoamine auch Hydroxylgruppen tragen.

Erwähnenswert erscheint zudem, dass NE trotz zusätzlicher Seitenketten-OH-Funktion eine ähnliche Reaktivität aufweist wie DA. Allerdings wurde in einer Kristallstrukturanalyse der aktiven Konformation von TGM2 ein sog. Acyl-Akzeptor-Tunnel entdeckt, der die Spezifität des Q-Substrats bestimmt. Demgegenüber ist die Bindungsstelle des Acyl-Akzeptor- d.h. des Amin-Substrats relativ frei zugänglich [251]. Die Affinität des Amin-Substrats muss also von komplexeren Zusammenhängen als der bloßen Größe des Moleküls bestimmt werden, beispielsweise durch spezifische Interaktion mit AS-Resten in der Nachbarschaft des aktiven Zentrums.

Neben TGM2 wurden auch TGM1, 3 und fXIIIA untersucht, wobei das letztgenannte Enzym vor allem wegen seiner möglichen Rolle bei der Generierung von COAT-Thrombozyten interessierte. Es konnte allerdings keine Inkorporation von 5-HT in Fibrinogen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man das Modellsubstrat DMC, spiegelt FXIIIA Substratpräferenz von TGM2 in etwa wieder (HA>NE≈DA>5-HT). Für TGM1 dagegen zeigte sich eine andere Reihenfolge, nämlich NE>HA>DA>5-HT, wobei 5-HT nicht signifikant inkorporiert wurde. Bei Verwendung von TGM3 konnte lediglich eine Histaminnylierung beobachtet werden. Die Größenordnung der Monoamin-Inkorporation in DMC war für TGM1, 3 und fXIIIA zudem um mindestens das 25-fache niedriger als für TGM2. Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der mangelnden Vergleichbarkeit der in der Einheit U angegebenen Enzymaktivität, die Beobachtung könnte aber auch auf eine größere Substratspezifität der erstgenannten TGM hindeuten.

Interessanterweise unterschied sich die gemittelte MDC-Inkorporation der vier TGM kaum (Abbildung 12 A; S. 65). Demnach sind 5-HT, HA, DA und NE für TGM2 spezifische Amin-Donor-Substrate (und HA für fXIIIA), MDC dagegen wirkt als unspezifisches Substrat. Wie in Abschnitt I3.1 ausgeführt sind Funktion und Lokalisation von TGM4 – 7 unbekannt, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann dass eines dieser Enzyme ebenfalls spezifisch Monoamine in Proteine inkorporiert. In Zukunft sollte daher eine umfassende Analyse der Monoaminnylierung unter Einbeziehung aller bekannten TGM erfolgen.

Ausgehend von der oben beschriebenen Beobachtung wurde die *in vitro*-Analyse auf 12 Q-Substratproteine ausgedehnt. Bei der Auswahl wurde von bereits bekannten TGM-Substratproteinen, nämlich kleinen GTPasen und PLA<sub>2</sub>, ausgegangen [198,239], und aufgrund der Existenz des in Abbildung 13 auf S. 67 gezeigten hochkonservierten Q-Restes wurde die Auswahl um die beiden heterotrimeren GTPasen Gα<sub>o1</sub> und Gα<sub>q</sub> erweitert. Nach Generierung von spezifischen Kaninchen-Antikörpern gegen 5-HT- und HA-modifiziertes DMC gelang

der Nachweis der Serotonylierung für die GTPasen RhoA, Cdc42, Rab4,  $G\alpha_{o1}$  und  $G\alpha_q$  (Abbildung 11 A; S. 64) sowie der Histaminylierung von Rab5c (Abbildung 11 B). Für DA und NE konnten keine spezifischen Antikörper erhalten werden. Versucht wurde ebenfalls die Detektion einiger monoaminylierter Zielproteine durch Autoradiographie unter Verwendung von [ $^3$ H]-markierten Monoaminen. Aufgrund der für 5-HT, DA und NE vergleichsweise niedrigen zu erwartenden Inkorporationsraten und der, auch bei Verwendung von speziell entwickelten Verstärkungsreagenzien, schlechten Detektionseffizienz von Tritium konnte lediglich für RhoA eine Histaminylierung nachgewiesen werden (Abbildung 11 C).

Demgegenüber ist die Detektion der [ $^3$ H]-Monoaminylierung durch Szintillation zuverlässiger (Abbildung 12 B; S. 65). Betrachtet man die TGM2-vermittelten Reaktionen, so entspricht die Reaktivität der Monoamine für die meisten Proteine in etwa der für DMC oben diskutierten Reihenfolge HA>DA $\approx$ NE>5-HT. Ausnahmen sind z.B. Rab27a (HA $\approx$ DA $\approx$ 5-HT; kein NE) und Rab5c (HA>NE; kein 5-HT & DA).

Im Vergleich der unterschiedlichen Proteine zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede: Zwischen der TGM2-vermittelten Histaminylierung von Rab5c (74049 fmol/U/30') und Rab27a (617 fmol/U/30') liegt der Faktor 100. Als besonders gute Substrate lassen sich Rab3c, Rab5c und M-Ras klassifizieren. Für die restlichen Monoamine und TGM2 sind die besten Q-Substrate pPLA<sub>2</sub>, Rab3c und Cdc42 (5-HT), pPLA<sub>2</sub>, Rab3c und Cdc42 (DA) sowie Rab5c, Rab3c und pPLA<sub>2</sub> (NE). Allerdings muss bei der Interpretation dieser Beobachtungen Sorgfalt walten, da Differenzen zu den oben beschriebenen Autoradiographie- und Immunoblot-Ergebnissen bestehen.

Bei der Betrachtung der unter Verwendung von TGM1, 3 und fXIIIa erzielten gemittelten Ergebnisse fällt eine ähnliche Reihenfolge der Monoamin-Reaktivitäten auf, wobei einzelne Proteine wie z.B. Rab27a Ausnahmen bilden. TGM2 weist für die Monoaminylierung der großen Mehrzahl der untersuchten Proteine jedoch die weitaus höchste Reaktivität auf.

Eine wichtige Feststellung ist die deutlich unterschiedliche Monoaminylierung der untersuchten Proteine durch eine bestimmte TGM. Diese deutet darauf hin, dass die Monoamin-Inkorporation spezifisch erfolgt und im Prinzip die Grundlage für einen zellulären Regulationsmechanismus darstellen kann, wie er für 5-HT bereits beschrieben wurde [198,200,205,209,211,213,221,252,227].

## 1.2 Die spezifische Protein-Histaminylierung durch TGM2

Nachdem wie oben beschrieben die differentielle Monoaminylierung unterschiedlicher Substratproteine durch mehrere TGM nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach Spezifität und Stöchiometrie dieser Reaktion. Als Modell wurde die TGM2-abhängige



Histaminierung gewählt, da diese *in vitro* deutlich höhere Umsatzraten aufwies als andere Modifikationen. Methodisch sollte zunächst eine kinetische Untersuchung der HA-Inkorporation in Cdc42 und DMC erfolgen, gefolgt von der Bestimmung der Stöchiometrie der Reaktion und abschließend der Identifizierung des modifizierten Q-Restes.

Wie in Abschnitt III.2.1 gezeigt, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit erfolgreich durch Messung des freigesetzten  $\text{NH}_4^+$  bestimmt werden (Abbildung 17 A). Nach Auftragung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die eingesetzte HA-Konzentration ergibt sich so ein  $K_m$ -Wert von 0,15 mM. Dieser ist in guter Übereinstimmung mit dem, allerdings für ein anderes Q-Substrat ermittelten, literaturbekannten Wert von 0,18 mM [194].

Nicht zu vernachlässigen ist bei diesen Experimenten die basale Hydrolyseaktivität von TGM2, die im vorliegenden Experiment mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von  $-0,01 \text{ min}^{-1}/100 \mu\text{g}$  zu Buche schlägt. Die Hydrolyse als Nebenreaktion von TGM ist bekannt (siehe Abschnitt I.3.3), und wird mit einem  $K_m$  von 1,4 mM angegeben [253]. Vergleicht man die kinetische Konstante der Histaminierung mit anderen Amin-Donoren wie Methylamin (13,1 mM; [240]), Putrescin (0,4 mM; [254]) oder MDC (1,1  $\mu\text{M}$ ; [253]), so kann HA mit Recht als spezifisches TGM-Substrat bezeichnet werden. Obwohl für 5-HT, DA und NE keine kinetischen Untersuchungen durchgeführt werden konnten, kann aufgrund der im Vergleich zu HA in Inkorporationsexperimenten geringeren Reaktivität (Abbildung 12 B; S. 65) auf eine höhere Michaelis-Menten-Konstante geschlossen werden.

Neben der Histaminierung von DMC sollte auch eine Untersuchung der kleinen GTPase Cdc42 erfolgen, die durch das bakterielle Toxin CNF1 deamidiert wird [147]. Das verwendete Detektionssystem war jedoch nicht empfindlich genug, eine HA-abhängige Veränderung der geringen durch Transamidierung der GTPase generierten  $\text{NH}_4^+$ -Mengen zu detektieren. Da es sich bei dem verwendeten 6xHis-Cdc42 um ein rekombinant hergestelltes Protein mit limitierten Mengen und Konzentrationen handelt, konnten somit keine kinetischen Parameter ermittelt werden. Einzig die Reaktionsgeschwindigkeit bei 2 mM HA kann für 6xHis-Cdc42 mit  $9 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  angegeben werden (Abbildung 17 D; S. 71). Für DMC liegt dieser Wert bei  $0,021 \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  und damit um den Faktor 18 höher.

Um die Stöchiometrie der Histaminierung exemplarisch für ein Protein zu bestimmen, wurde wegen der möglichen Beteiligung des Proteins an der Autoregulation des VMAT2  $\text{G}\alpha_{o1}$  gewählt. Als Ergebnis der unter saturierenden Bedingungen durchgeführten Inkorporationsversuche wurde ein Verhältnis von 1,02 Molekülen HA zu 1 Molekül  $\text{G}\alpha_{o1}$  und damit eine Stöchiometrie von 1 ermittelt (Abbildung 18; S. 72). Allerdings sollte der Befund mit einer alternativen Methode bestätigt werden, da bei den nach HAUERT *et al.* [255] durchgeführten Versuchen ein hoher systematischer Fehler erwartet werden muss. Um aussagekräftig zu sein,

ist eine Versuchsführung bei saturierenden Bedingungen erforderlich, diese jedoch kann nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Weiterhin muss eine Korrektur der unspezifischen Bindung an GST und das verwendete Labormaterial durchgeführt werden, die für weitere Fehlerquellen sorgt.

Mit dem Ergebnis einer stöchiometrischen Zahl von 1 für  $G\alpha_{o1}$  und dem Wissen um einen hochgradig konservierten Q-Rest im katalytischen Zentrum der meisten GTPasen (Abbildung 13; S. 67) liegt die Vermutung nahe, dass GTPasen spezifisch an diesem Rest modifiziert werden. Um die These zu prüfen wurde zunächst ein das zentrale Q enthaltene Dodecapeptid aus Rab27 untersucht. Dieses kann TGM2-vermittelt histaminyliert und MDCyliert werden (Abbildung 19; S. 73). Wie aus Teilabbildung B ersichtlich findet die Modifikation ausschließlich am Dodecapeptid statt und nicht am deutlich größeren Fusionspartner GST. Das Ergebnis stärkt somit die Vermutung, dass der zentrale Q-Rest von GTPasen nicht nur wie bereits für RhoA gezeigt durch TGM deamidiert werden kann [144], sondern auch ein spezifisches Substrat für die Monoaminylierung ist.

Um eine endgültige Aussage über die Identität des modifizierten AS-Restes treffen zu können, standen zwei Methoden zur Verfügung, nämlich die sequenzielle Mutagenese aller Q-Reste des betreffenden Proteins oder eine massenspektrometrische Identifizierung eines histaminylierten Peptids. Da letztere deutlich weniger arbeitsintensiv ist und im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung stand, wurden die Experimente mit mehreren GTPasen unter Zuhilfenahme der MIDAS (*MRM-initiated detection and sequencing*)-Technologie durchgeführt [256]. Wie in Abschnitt II.5.4.7 ausgeführt wird das modifizierte Protein dazu tryptisch verdaut und das Kandidatenpeptid, das in diesem Fall den katalytischen Q-Rest enthielt, durch die MRM-Methode detektiert.

Im Fall einer Histaminylierung sollte sich dabei eine Massenverschiebung von +94,115 Da ergeben. Aufgrund verschiedener Ursachen wie ungenügender Proteinmenge und unpassendem Molekulargewicht des tryptischen Peptids konnten von den eingesetzten 13 Proteinen lediglich  $G\alpha_{o1}$ ,  $G\alpha_q$  und Rab18 analysiert werden. Cdc42 beispielsweise konnte nicht untersucht werden, da das den interessierenden Q-Rest enthaltende tryptische Peptid mit 4379 Da weit ausserhalb des Messbereichs von 50 – 1200 Da lag.

Wie in Abbildung 20 auf S. 73 dargestellt konnte für alle drei untersuchten GTPasen eine TGM-abhängige Histaminylierung am katalytischen Q-Rest nachgewiesen werden. Dabei wurden für jedes Protein mindestens drei charakteristische Fragmente (sog. MRM-Übergänge) untersucht, indem das Messfenster des Massenspektrometers jeweils auf eine hypothetische Fragmentgröße eingestellt wurde. In Abwesenheit von TGM2 konnten die entsprechenden Fragmente nicht detektiert werden. Zur weiteren Bestätigung wurde für das zentrale tryptische

Peptid von  $G\alpha_{o1}$  ein Fragmentspektrum aufgenommen (Abbildung 21 A und C; S. 74), das im modifizierten Fall vier, im unmodifizierten Fall fünf eindeutig identifizierbare Fragmente zeigt. Die Fragmentgrößen entsprechen dabei den Vorhersagen (Abbildung 21 B und D), so beträgt beispielsweise die Differenz zwischen den beiden  $\gamma$ -Fragmenten 94,1 Da. Der durch Histaminierung zu erwartende Massenunterschied von 94,12 Da ergibt sich aus der molaren Masse von HA (111,15 Da) abzüglich der Masse des freiwerdenden  $NH_3$  (17,03 Da).

Nachdem für alle vier Fragmente eine sehr gute Übereinstimmung mit der erwarteten molaren Masse gefunden wurde, kann die Histaminierung des katalytischen Q-Restes der heterotrimeren GTPase  $G\alpha_{o1}$  als gesichert gelten. Ähnliches kann für  $G\alpha_q$  und Rab18 festgestellt werden. Die verwendete MIDAS-Methode ist somit gut geeignet, neuartige posttranslationale Proteinmodifikationen zweifelsfrei nachzuweisen [256]. Da die o.g. Versuche mit *in vitro* modifizierten Proteinen durchgeführt wurden, bleibt allerdings die Frage nach möglichen *in vivo* histaminierten AS-Resten offen. Da die Komplexität des Proteoms eine direkte Untersuchung von Zelllysaten verhindert, kann eine Antwort nur durch Anreicherung des betreffenden Proteins gefunden werden.

Dazu könnte mittels Immunopräzipitation z.B.  $G\alpha_{o1}$  aus dem Hypothalamus von Mäusen isoliert werden, der sowohl eine hohe histaminerge Aktivität als auch eine beachtenswerte  $G\alpha_{o1}$ -Expression aufweist [257]. Alternativ könnte eine Anreicherung von unterschiedlichen histaminierten Proteinen erfolgen, indem eine Immunopräzipitation mit dem 81D4-Antikörper durchgeführt wird. Dieser monoklonale IgM-Antikörper wurde zur Detektion von  $\epsilon$ ( $\gamma$ -Glutamyl)-lysyl-Isopeptidbindungen entwickelt, zeigt aber eine Kreuzreaktivität auch mit ( $\gamma$ -Glutamyl)-serotonylresten [222,258].

Auf diese Weise würden zwar auch quervernetzte Proteine angereichert, doch sollten diese großen Moleküle in einer SDS-PAGE leicht abzutrennen sein. Der Vorteil der Methode läge in der *de novo*-Identifikation von monoaminierten Proteinen, da im Vorhinein kein Kandidatenprotein definiert werden muss. Sollte die Komplexität nicht genügend reduziert werden können, bietet sich als Alternative die Untersuchung von überexprimierten, mit einer Affinitätsmarkierung versehenen Proteinen aus Zellkulturen an, die nach einer HA-Behandlung aufgereinigt werden könnten. Eine wichtige Rolle kommt hier der Wahl eines geeigneten Gewebetyps zu, der sowohl HA zytosolisch anreichert (z.B. wegen Expression von OCT-3) als auch eine Expression von TGM aufweist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Expression des Transporters zwar in den Zelllinien HPA-SMC, ANSC und HepG2 nachgewiesen, doch war lediglich in ANSC eine deutlich erhöhte HA-Aufnahme zu beobachten. Was eine Monoaminierung von GTPasen mit 5-HT, DA und NE betrifft, kann aufgrund der bekannten Deamidierung des katalytischen Q-Restes von RhoA, Cdc42 und

Rac1 durch CNF1 und der funktionellen Seronylierung von RhoA ein analoger Mechanismus als wahrscheinlich angesehen werden [144,147,198].

### 1.3 Die Wirkung kompetitiver Inhibitoren auf die Monoaminylierung

Als Inhibitoren von TGM-vermittelten Reaktionen werden einerseits irreversible Peptid-Inhibitoren wie Boc-DON, hydrazid-basierte Substanzen und 2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium-Derivate verwendet, deren Wirkung meist auf einer kovalenten Bindung an den katalytischen Cystein-Rest basiert [259-261]. Andererseits werden kompetitive Substrate wie MDC oder CTEA als Inhibitoren eingesetzt, wobei CTEA die reduzierte, weniger potente Form von CTA darstellt [262]. Beide wirken als alternative Amin-Substrate mit  $IC_{50}$ -Werten von 1,9 bzw. 73  $\mu$ M [260,263,264].

In vielen Studien werden kompetitive Substrate den wirksameren irreversiblen Inhibitoren vorgezogen, da diese wegen der nur begrenzt spezifischen Bindung an Cystein-Reste besonders in zellulären Systemen anfällig für Kreuzreaktionen sind. Allerdings sind auch für MDC und CTA/CTEA Nebenwirkungen bekannt, so inhibiert CTA beispielsweise Caspase-3 in einer nicht-kompetitiven Weise [265]. CTEA kann wegen seiner freien Thiolgruppe eine antioxidative Wirkung entfalten, die bei oxidativem Stress (z.B. MPTP-induzierter Neurodegeneration oder Strahlenkrankheit) positive Effekte zeitigen kann [266,267].

Die Substanz wird bereits als Medikament zur Behandlung von Cystin-Stoffwechselerkrankungen eingesetzt [268], zur Zeit geprüft werden ihre neuroprotektiven Eigenschaften bei *Chorea Huntington*-Patienten [269]. Wie in Abschnitt I3.2 erläutert gilt eine Beteiligung von TGM2 an dieser Krankheit als wahrscheinlich, und CTEA als TGM-Inhibitor verbessert in Modelltieren tatsächlich den Krankheitsverlauf [176,270].

MDC muss als deutlich schlechter charakterisiert angesehen werden, obwohl die Substanz in vielen Studien eingesetzt wird. Bekannt ist beispielsweise die vermutlich auf TGM-Inhibition basierende Zytotoxizität von MDC in Kulturen primärer Neuronen [271]. Zu den nicht mit TGM in Verbindung gebrachten Wirkungen der Substanz zählt die Inhibition der 17-Ketosteroid-Reduktase und die Stimulierung der Phosphatidylinositol-Synthese [272,273].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit CTEA und MDC gearbeitet. So wird in Abbildung 27 A auf S. 83 deutlich, dass die TGM2-abhängige Inkorporation von 5-HT-biotin und DA-biotin in DMC durch CTEA-Zugabe inhibiert wird. Ebenso konnte für die Monoaminylierung unterschiedlicher Zellen eine CTEA-Abhängigkeit nachgewiesen werden, am deutlichsten zu erkennen für DA (Abbildung 25; S. 80). Auffällig ist allerdings, dass in vielen Fällen auch die Aufnahme biogener Monoamine durch CTEA verringert wird, wie z.B. für 5-HT in HPA-SMC oder für DA in 3T3-L1-Adipozyten (Abbildung 25 A bzw. H).

Diese Beobachtung ist möglicherweise mit einer Konkurrenz um unspezifische zytoplasmatische Transportsysteme zu erklären, da CTEA bekanntermaßen den Polyamin-Transport inhibiert [274]. Eine Hemmung des spezifischen Monoamin-Transports erscheint unwahrscheinlich, da der Effekt nicht bei jeder Zelllinie in gleicher Weise auftrat; trotz SERT-Expression zeigten HepG2-Zellen beispielsweise keine, P815-Zellen hingegen eine starke Inhibition des 5-HT-Transports. Im Durchschnitt aller Zelllinien konnte die deutlichste Hemmung für die HA-Aufnahme (47 %) beobachtet werden, gefolgt von NE- (32 %), DA- (26 %) und 5-HT-Aufnahme (16 %). Da die HA-Transportsysteme vergleichsweise unspezifisch sind, erscheint diese Beobachtung sinnvoll.

Ebenfalls als kompetitiver Inhibitor oder alternatives TGM-Substrat bekannt ist MDC [203,205,246], das in der vorliegenden Arbeit vor allem zum Nachweis der TGM-Aktivität eingesetzt wurde [227]. So wird das fluoreszente Cadaverin-Derivat z.B. TGM2-abhängig mit Rab27-Peptid LWDTAGQERFS verknüpft (Abbildung 19 B; S. 73).

Wie in Abschnitt III.2.4 dargestellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit ein unerwarteter Einfluss von MDC auf Dopaminierung und Norpinephrinierung *in vitro* und in Zellkultur beobachtet werden. Im Gegensatz zu Serotonierung und Histaminierung wird die TGM2-abhängige Inkorporation dieser Monoamine nicht wie erwartet gehemmt, sondern deutlich verstärkt (Abbildung 22 A; S. 76). Analog dazu zeigt sich unter MDC-Einfluss eine erhöhte DA- und NE-Inkorporation in HPA-SMC und ANSC (Abbildung 22 B). Die fehlende Inhibition ließe sich durch eine höhere Affinität von DA und NE gegenüber TGM erklären, auch wenn dies den verglichen mit HA niedrigeren Inkorporationsraten widerspräche. Ob die MDC-vermittelt erhöhte TGM-Aktivität auf einer allosterischen Wirkung beruht, muss im Dunkeln bleiben. Prinzipiell möglich wäre auch eine TGM-unabhängige Reaktion, wie z.B. die für DA beschriebene Bildung eines Chinon-Derivats mit nachfolgender kovalenter Modifikation von Proteinen [275,276]. In Abwesenheit von TGM2 trat jedoch kein DA- oder NE-Einbau auf (Daten nicht gezeigt), und in vielen Zelllinien konnte eine deutliche CTEA-vermittelte Inhibition der Modifikation beobachtet werden (Abbildung 25; S. 80).

Festzuhalten bleibt abschließend, dass die Wirkung der kompetitiven Inhibitoren MDC und CTA/CTEA auf TGM nicht geklärt ist. Nötig ist eine grundsätzliche Charakterisierung der Hemmbarkeit der zellulären Monoamin-Transportsysteme und der Transamidierung unterschiedlicher Amin-Substrate.

## 2 Zielproteine der TGM-vermittelten Monoaminylierung

### 2.1 Die Monoaminylierung kleiner GTPasen

#### 2.1.1 *Rho-GTPasen werden durch Monoaminylierung reguliert*

Als Q-Substrate für Monoaminylierungsreaktionen sind bisher  $\alpha$ -Actin [211,212], Fibronectin [209,227] und die kleinen GTPasen RhoA [198,205,252], Rac1 [221,222], Rab3a [198,213], Rab4 [198,200] und Rab27a [198,213] beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit sollten daher weitere Kandidaten als Substratproteine identifiziert werden. Dazu wurden zunächst 10 kleine und heterotrimere GTPasen ausgewählt, die murinen Orthologe kloniert und durch Überexpression in *E. coli* rekombinant hergestellt (siehe Abschnitt II3). In einer Versuchsreihe wurde dann ihre Eignung als Q-Substrat für TGM1-3 und fXIIIA mittels *in vitro*-Monoaminylierung mit 5-HT, HA, DA und NE überprüft (Abbildung 12; S. 65). Aus der Familie der Rho-GTPasen wurden RhoA, TC10 und Cdc42 untersucht.

RhoA zeigte die mit 1493 fmol/U/30' höchste Monoaminylierung für HA und TGM2, eine Serotonylierung konnte nur für TGM3 detektiert werden (120 fmol/U/30'). Auch die TGM2-abhängige DA- und NE-Inkorporation war mit 201 bzw. 500 fmol/U/30' nachweisbar. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit der literaturbekannten Regulation der RhoA-Aktivität durch TGM-vermittelte Serotonylierung in Thrombozyten und SMCs, da zumindest in letzteren die Beteiligung von TGM2 direkt nachgewiesen werden konnte. Für TC10 konnte eine starke Histaminylierung (25200 fmol/U/30'), gefolgt von DA-, NE- und 5-HT-Inkorporation festgestellt werden.

Cdc42, dessen CNF1-abhängige Regulation durch Deamidierung des katalytischen Q-Restes bekannt ist [147], wies *in vitro* eine mittlere HA-Inkorporation von 11912 fmol/U/30' sowie TGM2-vermittelte DA-, NE- und 5-HT-Inkorporation auf. Aufgrund des bekannten Modulationsmechanismus wurden mit dieser GTPase weiterführende Versuche durchgeführt, um den Einfluss der Monoaminylierung auf die Funktion des Enzyms zu überprüfen.

Wie in Abbildung 15 B und C auf S. 69 wiedergegeben liegt Cdc42 nach Histaminylierung verstärkt in einem GTP-gebundenen Zustand vor, was sich in einer deutlich erhöhten Bindung an die Bindedomäne des Effektors Pak3 ausdrückt. Da der Effekt nicht bei Zugabe von TGM2 alleine auftritt, kann ausgeschlossen werden dass der verstärkten Effektorbindung eine Deamidierung zugrunde liegt. Das Ergebnis lässt sich daher gut mit dem Modell einer TGM-vermittelten posttranslationalen Modifikation des katalytischen Q-Restes an Position 61 (Abbildung 13; S. 67) durch HA erklären. Diese resultiert im Verlust der intrinsischen und GAP-vermittelten GTPase-Aktivität, und der Anteil von GTP•Cdc42 an der

Gesamtpopulation der GTPase vergrößert sich signifikant. Daraus folgt schlussendlich eine verstärkte Aktivierung nachgeordneter Signalwege, wie z.B. der MAPKs Erk oder JNK [277,278]. Zum Nachweis der Effektorbindung wurde eine neuartige Versuchsplattform etabliert, da sich der klassischerweise verwendete *pull-down* als nicht empfindlich und reproduzierbar genug erwies. In Analogie zu einem kommerziellen G-LISA (Cytoskeleton) wurde der Effektor dazu auf 96-Kavitäten-Platten immobilisiert und gebundenes 6xHis-Cdc42 mittels Antikörperbindung bestimmt. Diese Methode ermöglichte die sensible, reproduzierbare und, gegenüber dem traditionellen semiquantitativen Immunoblot, tatsächlich quantitative Bestimmung der Protein-Protein-Interaktion. Prinzipiell sollte diese Herangehensweise auch auf andere GTPase-Effektor-Kombinationen übertragbar sein.

### 2.1.2 *Rab-, Ras- und Arf-GTPasen sind Substratproteine für TGM-vermittelte Monoaminylierung*

Beispielhaft für Rab-GTPasen wurden in dieser Arbeit Rab1b, Rab3c, Rab4, Rab5c und Rab27a untersucht. Da Rab1b unter Verwendung von DA-biotin aus 3T3-L1-Adipozyten isoliert werden konnte, wurde dieses Protein in Hinsicht auf eine TGM2-vermittelte Monoaminylierung *in vitro* analysiert (Abbildung 31; S. 89).

Neben einer signifikanten Histaminylierung konnte auch die Inkorporation von MDC detektiert werden. Da nach EGFP-Rab1b-Überexpression aus DA-exponierten 3T3-L1-Adipozyten modifiziertes Rab1b isoliert werden konnte, kann auf eine endogene Dopaminylierung des Proteins geschlossen werden, obwohl *in vitro* keine TGM2-vermittelte DA-Inkorporation festgestellt werden konnte. In Adipozyten scheint somit eine andere der fünf exprimierten TGM (TGM3, 4, 5 oder 6) für die Dopaminylierung verantwortlich zu sein (siehe Abbildung 23 B; S. 77). Aus Jurkat-T-Zellen konnte weiterhin Rab1a isoliert werden, das eine hohe Homologie zu Rab1b aufweist und vermutlich ebenfalls dopaminyliert wird (Tabelle 11; S. 86).

Rab18, eine zunächst aus murinen ES-Zellen mittels BAPA als Kandidatenprotein identifizierte GTPase, wurde in Hinsicht auf ihre *in vitro*-Monoaminylierung ebenfalls noch nicht weiter charakterisiert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine TGM2-vermittelte Histaminylierung am katalytischen Q67 stattfindet (Abbildung 20 C; S. 73). Ob diese jedoch funktionelle Konsequenzen mit sich bringt, muss in Folgestudien ermittelt werden. Mit 61152 fmol/U/30' konnte für Rab3c eine starke Histaminylierung gemessen werden, doch auch eine vergleichsweise starke Dopaminylierung (1701 fmol/U/30') sowie NE- und 5-HT-Inkorporation war nachweisbar.

Da Rab4 in Thrombozyten serotonyliert wird [198,200], wurde ein entsprechendes Signal auch *in vitro* erwartet. Mit 273 fmol/U/30' konnte allerdings keine hohe Serotonylierung

nachgewiesen werden, und auch die Histaminierung war mit 22868 fmol/U/30' vergleichsweise gering. Auffällig allerdings ist, dass die GTPase im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Proteinen durch fXIIIA mit HA und DA modifiziert wird. Möglicherweise ist daher dieses bekanntermaßen in Thrombozyten exprimierte Enzym oder eine der hier nicht untersuchten TGM für die beobachtete Serotonierung verantwortlich.

Rab5c zeigte unter den verwendeten GTPasen die höchste Monoaminierung (74049 fmol HA/U/30'), wobei sich auch eine hohe Spezifität zeigte. So konnte keine nennenswerte Serotonierung und Dopaminierung gemessen werden, jedoch eine ausgeprägte Norepinephrinierung (2924 fmol/U/30'). Zudem zeigt TGM3 eine bevorzugte Affinität für Rab5c. Die Serotonierung von Rab27a wurde in Thrombozyten und pankreatischen  $\beta$ -Zellen nachgewiesen. *In vitro* hingegen ist Rab27a ein schlechtes Substrat für die untersuchten TGM, mit einer maximalen Histaminierung von 617 fmol/U/30'. Zwar konnte eine moderate Serotonierung detektiert werden, doch liegt diese verglichen mit anderen GTPasen im unteren Bereich. Möglicherweise sind andere TGM für die Serotonierung verantwortlich. Zusätzlich wurde ein Dodecapeptid aus dem katalytischen Zentrum der GTPase rekombinant hergestellt. Dieses ist ein sehr gutes Q-Substrat für TGM2-abhängige Histaminierung und MDC-Inkorporation (Abbildung 19; S. 73). Ob dieser Rest, losgelöst vom Kontext des Gesamtproteins, veränderte Substrateigenschaften aufweist, bleibt ungeklärt. In jedem Fall wird durch MDC ausschließlich der fragliche Q-Rest modifiziert und keiner der weiteren acht, die im Fusionspartner GST enthalten sind.

M-Ras wurde als einziger Vertreter der Ras-Subfamilie untersucht. Es zeigte sich eine starke TGM2- und fXIIIA-vermittelte Histaminierung (44208 bzw. 867 fmol/U/30') sowie NE- und DA-Inkorporation, aber keine Serotonierung. Über die Monoaminierung von Ras-GTPasen ist bisher nichts bekannt, doch ist M-Ras entsprechend den hier vorgestellten Ergebnissen ein Kandidatenprotein für Monoaminierung. In *in vitro*-Versuchen wurde die Monoaminierung von Ran- und Arf-GTPasen nicht charakterisiert, doch konnte unter Verwendung des TGM-Substrats BAPA kovalent modifiziertes Arf1 aus HPA-SMC isoliert werden. Dieses kann durch TGM2 histaminiert werden, doch führt die Modifikation nicht zu einer veränderten Interaktion mit dem Effektor GGA1 [231]. Wie aus Abbildung 22 B auf S. 76 hervorgeht, führt die Zugabe von MDC jedoch zu einer starken Aktivierung der DA- und NE-Inkorporation. Ob der Effekt auf Arf1 beschränkt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Nicht gezeigte Daten lassen jedoch vermuten, dass eine MDC-abhängige Aktivierung der Monoaminierung auch bei anderen Q-Substraten auftritt.



## 2.2 Heterotrimere GTPasen werden durch Monoaminylierung reguliert

Wie in den Abschnitten I1.6 und I2.2 erläutert werden die heterotrimeren GTPasen  $G_q$  und  $G_{o2}$  mit der Autoregulation des VMAT2 in Verbindung gebracht [131]. Da die Drosselung des Transports bei hohen vesikulären Monoamin-Konzentrationen auftritt und die beiden Proteine wie alle  $G\alpha$ -Untereinheiten einen hochkonservierten Q-Rest besitzen (Abbildung 13), wurde auch die *in vitro*-Monoaminylierung von  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{o1}$  untersucht. Die Herstellung von enzymatisch aktivem  $G\alpha_{o1}$  gestaltete sich schwierig, da das zunächst verwendete GST- $G\alpha_{o1}$  nur eine geringe Aktivität aufwies. Es wurde daher ein alternatives Konstrukt zur Produktion von 6xHis- $G\alpha_{o1}$  hergestellt und das Protein mit Hilfe einer speziellen Autoinduktionstechnik in *E. coli* dargestellt.

Aus Abbildung 12 B wird ersichtlich, dass beide Proteine von allen eingesetzten TGM histaminyliert werden (29771 bzw. 16227 fmol/U/30'). Die vermutete Modifikation des katalytischen Q-Restes konnte, wurde wie in Abschnitt III2.3 beschrieben, auch unter Anwendung einer MS-basierten Nachweismethode bestätigt werden (Abbildung 20 und Abbildung 21; S. 73f.). Zumindest in  $G\alpha_{o1}$  ist diese die einzige modifizierte AS, da eine Stöchiometrie von 1 ermittelt werden konnte (Abbildung 18; S. 72). Eine Histaminylierung von  $G\alpha_{o1}$  sollte daher, in Analogie zur Monoaminylierung kleiner GTPasen, im Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität resultieren. Tatsächlich reduziert sich die  $G\alpha_{o1}$ -vermittelte GTP-Hydrolyse nach Histaminylierung um etwa 50 %, und die Bindung an RGS4 erhöht sich deutlich (Abbildung 14 und Abbildung 15; S. 67ff.). Da die Interaktion der beiden Proteine bekanntermaßen abhängig vom Aktivierungszustand der GTPase ist und das Protein nach Verlust der GTPase-Aktivität konstitutiv im aktiven, GTP-gebundenen Zustand verbleibt, erscheint diese Beobachtung plausibel.

Heterotrimere GTPasen sind demnach, ähnlich wie kleine GTPasen, Substratproteine für die TGM-abhängige Monoaminylierung. Ob allerdings eine Histaminylierung auch *in vivo* vorliegt, muss in Nachfolgeexperimenten geklärt werden. Dafür bietet sich die Analyse der Histaminylierung von  $G\alpha_{o1}$  im Mäuse-Hypothalamus an, wie in Abschnitt IV1.2 diskutiert.  $G\alpha_q$  wird von vielen Geweben exprimiert, jedoch wird über eine hohe Expression in dendritischen Zellen und im *Ganglion ciliare* des Parasympathikus berichtet [257]. Die Analyse der Histaminylierung von Zelltypen, die VMAT2 und OCT-3 exprimieren, wäre geeignet um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus an der Regulation vesikulärer HA-Konzentrationen beteiligt ist. Zwei Beispiele für solche Zelltypen sind PC12-Zellen und Zellen der Gebärmutter Schleimhaut [279,280]. Lohnenswert wäre weiterhin die Entwicklung eines alternativen Nachweissystems zur Bestimmung der Aktivität von heterotrimeren GTPasen, da die bisher verwendete *pull-down* viele Nachteile birgt.

*In vitro* bietet sich dazu die oben beschriebene Immobilisierung des Bindungspartners an Multi-Kavitäten-Platten an. Zum Nachweis der Verschiebung des GTP•G $\alpha$ /GDP•G $\alpha$ -Verhältnis *in vivo* könnte weiterhin eine auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basierende fluoreszenzmikroskopische Methode angewandt werden. Allerdings müsste dabei pharmakologisch sichergestellt werden, dass ein beobachteter Effekt nicht auf der Aktivierung von GPCRs beruht.

### 2.3 Die Monoaminylierung der Signalproteine PLA<sub>2</sub>, AnxA2 und NPM1

Wie in Abschnitt III.1.3 beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Histaminylierung auf die Aktivität von PLA<sub>2</sub> untersucht. Dass das Enzym *in vitro* ein Substrat für die TGM-vermittelte Monoaminylierung darstellt, folgt aus den in Abbildung 12 präsentierten Ergebnissen: TGM1 inkorporiert 5-HT, TGM2 HA, DA, NE und 5-HT, TGM3 HA und fXIIIA HA und 5-HT. Die Histaminylierung von PLA<sub>2</sub> durch TGM2 wurde daraufhin detaillierter untersucht.

Hier zeigte sich gegenüber unmodifizierten Kontrollen eine 1,6-fache Steigerung der enzymatischen Aktivität der histaminylierten Lipase, messbar anhand der Freisetzung von Arachidonsäure aus Arachidonyl-Phosphatidylcholin. Hier resultiert die Modifikation eines oder mehrerer Q-Reste also nicht wie bei GTPasen in einer Verringerung der enzymatischen Aktivität, sondern in einer Steigerung. Bekannt war bereits, dass die TGM2- oder fXIIIA-Behandlung von PLA<sub>2</sub> zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung führt, und zwar sowohl durch Quervernetzung [239] als auch durch Inkorporation von Mono-, Di- und Polyaminen [281]. Da in dieser Arbeit nach Monoaminylierung von PLA<sub>2</sub> keine Di- oder Polymere detektiert werden konnten, scheint die Histaminylierung einen ähnlich stimulierenden Effekt auszuüben wie andere TGM-vermittelte Modifikationen.

Möglicherweise beruht dieser auf der Transamidierung des Q4-Restes porciner PLA<sub>2</sub>, der bekanntermaßen für die Stabilität des aktiven Zentrums benötigt wird [281,282]. Allerdings führte die Mutation dieses Restes nicht zu einer Aktivitätsänderung [283]. Da das untersuchte porcine pankreatische Enzym zur Gruppe der sekretierten PLA<sub>2</sub> gehört und unklar ist, ob eine ähnliche Regulation auch bei zytosolischen Formen vorliegt, findet eine physiologische Histaminylierung von PLA<sub>2</sub> wahrscheinlich im extrazellulären Raum statt. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten Modelle allergischer Reaktionen (z.B. Bindehautentzündung bei Meerschweinchen) herangezogen werden, da bei diesen Prozessen Mastzellen große Mengen HA ausschütten [284]. Außerdem beruht die Wirkung von anti-inflammatorischen Peptiden auf der Inhibition der im Zuge der Entzündungsreaktion durch TGM aktivierten

PLA<sub>2</sub> [285,286]. Ob die durch diese sog. Antiflammine gehemmte Reaktion eine Histaminylie-  
rung ist, ist nicht bekannt.

Unter anderem als Inhibitoren der PLA<sub>2</sub> wirken auch Lipocortine [287,288]. Diese auch als  
Annexine (Anx) bezeichnete Familie beinhaltet 12 humane Ca<sup>2+</sup>-regulierte Proteine, die u.a. an  
Entzündungsprozessen, Apoptose, Blutkoagulation und Vesikeltransport beteiligt sind.  
Besonders AnxA1 (Lipocortin I, Annexin I) ist für seine anti-inflammatorische Aktivität  
bekannt. Bei hohen Ca<sup>2+</sup>; bindet das Protein Phospholipide und kann dann durch  
Substratdepletion und direkte Interaktion die für die Freisetzung von Leukotrienen und  
Prostaglandinen benötigte PLA<sub>2</sub> hemmen [289,290]. Weiterhin wird die Expression von  
AnxA1 im Zuge der Differenzierung von 3T3-L1-Prädipozyten hochreguliert [291,292].

Interessanterweise ist auch AnxA1 als Q-Substrat für TGM-vermittelte Quervernetzung und  
Inkorporation von Polyaminen und synthetischen Monoaminen bekannt. So wird AnxA1 in  
differenzierenden Plattenepithelzellen durch TGM1 in der CE quervernetzt [293], und nach  
TGM-Behandlung zeigt das Protein eine deutlich erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Sensibilität [294]. AnxA2 (Li-  
pocortin II, Annexin II) ist ein v.a. in Epithelzellen, Adipozyten und Lymphozyten  
exprimiertes Protein mit pleiotropen Funktionen [257]. In 3T3-L1-Adipozyten z.B. ist das  
Protein zusammen mit einer Vielzahl von Rab-GTPasen an der Regulation der Insulin-  
stimulierten GLUT4-Translokation beteiligt [295]. Dabei interagiert AnxA2 möglicherweise  
direkt mit Rab-GTPasen und SNAP, und es lokalisiert bevorzugt an frühen Endoso-  
men [296-298].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus DA-biotin-behandelten 3T3-L1-Adipozyten putativ  
dopaminyliertes AnxA1 und AnxA2 isoliert (Tabelle 11; S. 86). Daraufhin wurden  
Expressionskonstrukte zur Herstellung von GST-AnxA2 und EGFP-AnxA2 generiert, um die  
Monoaminylierung dieses Proteins *in vitro* und in Zellkultur überprüfen zu können. Deutlich  
erkennbar ist in Abbildung 32 auf S. 89 die TGM2-vermittelte Inkorporation von MDC,  
während in EGFP-AnxA2 exprimierenden und mit DA behandelten 3T3-L1-Adipozyten  
keine signifikante Dopaminylierung im Vergleich mit Kontrollproben festgestellt werden  
konnte. Allerdings ist ein statistischer Trend zu erkennen, so dass diese Frage in  
Folgeexperimenten nochmals aufgegriffen werden sollte. Da für AnxA1 eine TGM-abhängige  
Regulation bekannt ist, ist die Existenz eines ähnlichen Mechanismus für AnxA2,  
möglicherweise im Kontext der Insulin-vermittelten GLUT4-Translokation, nicht  
auszuschließen. Ob AnxA2 *in vivo* quervernetzt wird, wurde allerdings nicht untersucht.

Neben PAI1BP und  $\alpha$ -Enolase wurde das nukleoli-lokalisierte Protein NPM1 für eine nähere  
Untersuchung ausgewählt. Letzteres wurde aus mehreren Zelllinien (PC12, HPA-SMC, ES;  
siehe Tabelle 11; S. 86) mit Hilfe von DA-biotin und BAPA isoliert und stellt daher einen

besonders hervorzuhebenden Kandidaten für ein durch Monoaminylierung reguliertes Protein dar. NPM1 fungiert in der Zelle als ein multifunktionelles Phosphoprotein, lokalisiert hauptsächlich in den Nukleoli. Es wird u.a. mit Ribosom-Biogenese, Zentrosomen-Duplikation und nukleozytoplasmatischem Transport in Verbindung gebracht. Außerdem wirkt NPM1 als Chaperon für Histone [299]. Das Protein pendelt zwischen einer nukleolaren und zytosolischen Lokalisation hin und her, und eine verstärkte zytosolische NPM1-Population scheint mit verbessertem Überleben der Zelle assoziiert zu sein. NPM1 gilt als anti-apoptotisch, da in vielen Tumoren und Leukämien eine erhöhte Expression des Proteins oder Mutationen im kodierenden *NPM1*-Gen detektiert wurden [300,301]. Reguliert wird die Lokalisation von NPM1 durch eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Acetylierung, Glutamylierung, Sumoylierung und Polyribosylierung [299]. Gezeigt wurde z.B. dass die Sumoylierung des Proteins zu einer verstärkten Bindung an Zentrosomen führt [302]. Interessanterweise ist auch ein TGM-abhängiger Mechanismus der Regulation von NPM1 bekannt: PARK *et al.* berichteten über die TGM-abhängigen Retention des Proteins im Nukleus von MCF7-Zellen und die daraus folgende verstärkte Resistenz gegen proapoptotische Agenzien [303]. Diese beruht, so die Autoren, auf einer durch CTA hemmbaren Quervernetzung von NPM1 durch TGM2.

Wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, ist NPM1 *in vitro* aber auch ein gutes Substrat für TGM2-vermittelte Histaminylierung und Dopaminylierung sowie MDC-Inkorporation (Abbildung 30 A und B; S. 87). Gesucht wurde zunächst nach dopaminyliertem NPM1, da das DA-biotin-modifizierte Protein u.a. in den catecholaminergen PC12-Zellen gefunden wurde. Allerdings konnte auch nach stabiler Überexpression von EGFP-NPM1 kein modifiziertes Protein nachgewiesen werden. In Ermangelung weiterer endogen als Amin-Substrate infrage kommender Monoamine wurden Experimente mit dem biotinylierten Pentylamin BAPA durchgeführt. Dabei konnte in PC12-Zellen BAPA-modifiziertes NPM1 detektiert werden (Abbildung 30 C). Im Rahmen dieser Arbeit konnte NPM1 damit als potenziell monoaminyliertes Protein *in vitro* und in PC12-Zellen identifiziert und bestätigt werden, doch unter welchen zellulären Stimuli und mit welchem Monoamin diese Modifikation auftritt, konnte nicht ermittelt werden.

### 3 Die potenzielle physiologische Rolle der Monoaminylierung

#### 3.1 Unterschiedliche Zelllinien zeigen eine TGM-abhängige Monoamininkorporation

Auf die Beobachtung, dass Proteine so unterschiedlicher Funktion wie kleine und heterotrimere GTPasen, Phospholipasen, Annexine und das nukleolare NPM1 *in vitro* Substrate für TGM2-vermittelte Monoaminylierung sind, folgte die Frage nach einer physiologischen Bedeutung dieser Modifikation. Dazu wurden acht Zelllinien einer Analyse auf die Inkorporation der vier Monoamine 5-HT, HA, DA und NE unterzogen.

Die Auswahl dieser Zelllinien erfolgte anhand bekannter Phänomene, wie der literaturbekannten Serotoninylierung von RhoA in HPA-SMC [205], der 5-HT-abhängigen Aktivität von zytotoxischen T-Zellen (Jurkat) [304], der HA-Inkorporation in Mastzellen (P815) [197] und Leberzellen (HepG2) [195], der Rolle von 5-HT in Differenzierungsprozessen (ES und ANSC) [203], der Annexin- und Rab-regulierten GLUT4-Translokation in Adipozyten (3T3-L1) [305,295] sowie den hohen Catecholamin-Konzentrationen in PC12-Zellen. Die Zelllinien wurden zunächst in Hinsicht auf die Expression von TGM1-7 sowie SERT, OCT-3, DAT und NET qualitativ charakterisiert (Abbildung 23; S. 77). Wie erwartet exprimieren alle Zellen TGM2. Das durchaus diverse Expressionsmuster der restlichen TGM macht deutlich, dass die Benennung von TGM anhand ihrer postulierten Gewebespezifität (siehe Tabelle 1; S. 25) artifiziell ist: Die „Keratinocyten“-TGM1 findet sich in SMCs und der neuronalen Vorläuferzelllinie PC12, die „epidermale“ TGM3 kann in neuronalen Stammzellen, Mastzellen und Adipozyten nachgewiesen werden, und die „Prostata“-TGM4 wird von SMCs, ANSC, HepG2 und Adipozyten exprimiert. Wie erwartet konnten die schlecht charakterisierten, da generell niedrig exprimierten TGM5-7 nur in wenigen Zelllinien oder gar nicht nachgewiesen werden.

Um die Ergebnisse der Expression von Monoamin-Transportern zu bewerten, folgt ein Vergleich mit der beobachteten Monoamin-Aufnahme (Abbildung 24 A; S. 79). Die maximale Aufnahme von Monoaminen wurde in PC12-Zellen und ANSC beobachtet. Die hohe NE-Aufnahme von 44,34 pmol korreliert mit der Expression des NET. Literaturbekannt ist für diese Zelllinie allerdings auch die Expression des DAT und eine starke DA-Aufnahme [306]. Möglicherweise war diese in dem hier verwendeten PC12-Subklon inaktiviert.

Vergleicht man weiterhin z.B. die OCT-3 exprimierenden Zelllinien, so sind deutliche Unterschiede in deren HA-Aufnahme zu verzeichnen: Während sich im ANSC-Zytosol mit 23,35 pmol sehr hohe Konzentrationen befinden, konnten in HPA-SMC (3,16 pmol) und HepG2 (0,26 pmol) nur wenig HA gemessen werden. Über eine Expression des Transporters in den untersuchten Zelllinien ist, bis auf HepG2 [307], bisher nichts bekannt, und da in der

vorliegenden Arbeit keine quantitative Analyse durchgeführt wurde, kann keine Aussage über eine Korrelation von HA-Aufnahme und Expressionshöhe getroffen werden. Die Interpretation verkompliziert sich zudem durch die Promiskuität von OCT-3, der neben HA auch alle anderen Monoamine transportiert [308]. Daneben existiert, wie in Abschnitt I1.5 beschrieben, mit PMAT noch ein weiterer unspezifischer Monoamin-Transporter der für die z.B. in ANSC beobachtete NE-Aufnahme verantwortlich sein könnte. Bemerkenswert ist weiterhin die in allen Zelllinien, mit Ausnahme von PC12, detektierbare SERT-Expression. Paradoxerweise ist aber gerade in PC12 die 5-HT-Aufnahme maximal.

Die monoaminergen Aufnahmesysteme müssen somit als sehr komplex angesehen werden. Sie bestehen aus einem häufig als uptake-1 bezeichneten, spezifischen Teil, der z.B. bei PC12-Zellen für die NE-Aufnahme oder bei HPA-SMC für 5-HT- und HA-Aufnahme verantwortlich ist. Daneben werden offenbar nicht unbeträchtliche Mengen von Monoaminen durch ein uptake-2 benanntes, im Wesentlichen aus OCT-3 und PMAT bestehendes, unspezifisches Transportsystem aufgenommen. Dieses könnte beispielsweise die NE-Aufnahme in Jurkat oder die 5-HT-Aufnahme in PC12 vermitteln. Da nur in einigen Fällen eine einfache Korrelation zwischen der Expression eines bestimmten Monoamin-Transporters und der Aufnahme des betreffenden Monoamins möglich ist, soll sich die weitere Diskussion auf die Interpretation der tatsächlich gemessenen Monoaminylierung beschränken.

Um zunächst auf die ermittelten an zelluläre Proteine gebundenen Monoamin-Mengen einzugehen, sei auf Abbildung 24 B auf S. 79 verwiesen. In Übereinstimmung mit hohen zellulären NE-Konzentrationen in PC12 und ANSC konnten dort hohe Inkorporationswerte ermittelt werden. Die maximale NE-Inkorporation findet sich aber in Jurkat-Zellen, die auch eine zwar geringe, aber im Vergleich zu anderen Monoaminen erhöhte NE-Aufnahme aufwiesen. Die DA-Inkorporation war in PC12 am höchsten, obwohl nur geringe intrazelluläre DA-Konzentrationen nachweisbar waren. Weiterhin zeigten EF, Jurkat, ANSC und 3T3-L1 eine nennenswerte DA-Inkorporation. Gegenüber NE- und DA-Inkorporation war die 5-HT- und HA-Inkorporation um den Faktor 10 geringer. Selbst bei der Zelllinie HPA-SMC, die bekanntermaßen über einen Serotonylierungsmechanismus verfügt [205], konnte im Vergleich mit anderen Zelllinien keine erhöhte 5-HT-Inkorporation nachgewiesen werden.

Da Proteingehalt, Zellgröße und Monoaminaufnahme zwischen unterschiedlichen Zelllinien variiert, wurden die in Abbildung 24 auf S. 79 gezeigten Werte zur besseren Auswertung in Abbildung 25 prozentualisiert dargestellt. Außerdem wurde die CTEA-abhängige Hemmung von Aufnahme und Inkorporation mit aufgetragen, um eine TGM-Abhängigkeit beurteilen zu können. Was die Hemmung des Monoamin-Transports betrifft, wurde eine maximale

durchschnittliche CTEA-Abhängigkeit für den HA-Transport (47 %) ermittelt. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit der oben getroffenen Aussage zur Existenz von spezifischen und unspezifischen Transportsystemen: Die Hemmung eines unspezifischen Transporters durch CTEA erscheint wahrscheinlicher als die Hemmung des hochspezifischen SERT. Die durchschnittliche Inhibition des 5-HT-Transports beträgt dementsprechend nur 16 %. Allerdings ist nicht bekannt, über welche Transportproteine CTA und CTEA ins Zytosol gelangen.

Betrachtet man die relative Monoamininkorporation in den untersuchten Zelllinien, so konnte lediglich in P815 und Jurkat eine nennenswerte, durch CTEA hemmbare und damit TGM-abhängige, Serotonylierung beobachtet werden. Möglicherweise reicht die Empfindlichkeit der verwendeten Detektion nicht aus, um die Serotonylierung von RhoA in HPA-SMC zu detektieren. Nicht zu vernachlässigen ist weiterhin, dass hier lediglich eine basale Monoaminylierung unter Normalbedingungen quantifiziert wurde. Zu erwarten ist aber ein durch ein bestimmtes Signal reguliertes, kurzes Auftreten der Modifikation. In HPA-SMC beispielsweise wurde eine transiente Serotonylierung von RhoA, gefolgt von einer Beendigung des Signals durch proteasomalen Abbau des modifizierten Proteins beschrieben [205].

Die Mastozyten und T-Zellen sind demnach lohnende Objekte für eine genauere Analyse der möglichen Serotonylierung. Eine erwähnenswerte TGM-abhängige Histaminylierung wurde in HPA-SMC, P815, Jurkat und HepG2 gefunden. Obwohl ANSC und EF hohe HA-Aufnahmewerte aufweisen, wird hier kaum HA kovalent an Proteine gebunden. Die aufgrund der in Abschnitt I1.3 eingeführten literaturbekannten HA-Inkorporation erwarteten hohen Werte konnten also nicht nachgewiesen werden. Auch nach Stimulation von HepG2 mit Interleukin 6 oder epidermalemem Wachstumsfaktor (EGF) wurde keine erhöhte Histaminylierung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Diese Modifikation scheint somit in den untersuchten Zelllinien keine große Rolle zu spielen. Interessant wäre die zukünftige Analyse der Histaminylierung anderer Hepatozyten- und Mastzelllinien wie z.B. HHL, Huh-7 oder PT18 [197,309].

Unerwartet hohe Inkorporationswerte traten hingegen nach DA-Behandlung auf: Bei 3T3-L1, HepG2, EF, HPA-SMC, P815 und PC12 gelang der Nachweis der z.T. vollständig TGM-abhängigen Dopaminylierung. Diese Modifikation wurde daher für eine weitere Analyse ausgewählt. Allerdings muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass ein alternativer Mechanismus der kovalenten Verknüpfung von DA mit Proteinen bekannt ist, nämlich die spontane Bindung des durch Auto- oder enzymvermittelte Oxidation entstehenden DA-Chinons an Sulfhydryl-Gruppen [275]. Durch Verwendung des TGM-Inhibitors CTEA sollte allerdings die Spezifität der postulierten Dopaminylierung nachweisbar sein, und bei

Verwendung des Derivats DA-biotin konnten ebenfalls modifizierte Proteine beobachtet werden (Abbildung 28; S. 84).

Eine intensive Norepinephrinylierung wurde v.a. in Jurkat, aber auch in HepG2, PC12, P815, EF und HPA-SMC beobachtet. Welche Rolle NE in T-Zellen spielt, ist z.Zt. noch weitgehend unklar [310]. Auch für NE wurde die Existenz von durch Oxidation entstehenden Chinon-Derivaten beschrieben [311], nötig ist daher eine sorgfältige Analyse der z.B. in ANSC und HepG2 hohen CTEA-unabhängigen NE-Inkorporation.

Zusammenfassend können also Dopaminylierung und Norepinephrinylierung als bisher nicht untersuchte TGM-vermittelte posttranslationale Modifikationen identifiziert werden. Völlig unklar bleibt allerdings, unter welchen Umständen bzw. vermittelt durch welche Stimuli diese auftreten und welche TGM für die Inkorporation verantwortlich sind. Die eindeutigsten Ergebnisse wurden interessanterweise mithilfe derjenigen Zelllinien gewonnen, die lediglich TGM2 exprimieren. So kann etwa die Dopaminylierung in EF und die Norepinephrinylierung in Jurkat auf TGM2 zurückgeführt werden, während die zusätzliche Expression von TGM1, 4 und 5 nicht zu einem deutlich veränderten Inkorporationsmuster führt. Diese Beobachtung deckt sich mit der *in vitro* ermittelten Präferenz von TGM2 (Abbildung 12 B; S. 65).

### 3.2 Die Identifizierung endogen monoaminylierter Proteine

Nachdem die Dopaminylierung und Norepinephrinylierung als häufig auftretende Phänomene erkannt waren, sollte am Beispiel zweier Zelllinien eine Identifizierung der monoaminylierten Proteine stattfinden. Dies geschah mit dem Ziel, einen durch die Modifikation regulierten Signalweg zu charakterisieren. Dazu wurden PC12-Zellen aufgrund ihrer mit 1562 fmol hohen DA-Inkorporation und 3T3-L1-Adipozyten wegen der hohen Spezifität ausgewählt.

Um mit Monoaminen modifizierte Proteine isolieren zu können, mussten neuartige Methoden entwickelt werden, da das bisher häufig zur Identifizierung von TGM-Substratproteinen verwendete Cadaverin-Derivat BAPA ein ähnlich unspezifisches Amin-Substrat wie MDC ist [312,313]. Es sollte daher ein Amin-Substrat entwickelt werden, das die biochemischen Eigenschaften von DA und eine hochaffine (bio)chemische Funktion zur Affinitätschromatographie besitzt. WATTS *et al.* berichteten von 5-HT-biotin als Hilfsmittel zur Identifikation serotonylierter Proteine, ohne allerdings einen plausiblen Reaktionsmechanismus für die Kopplung von Sulfo-NHS-LC-LC-biotin und 5-HT anzugeben [211]. Bei ersterem handelt es sich um ein aminoreaktives Reagenz, das bevorzugt mit primären Aminen eine Amidbindung bildet (Herstellerangaben). Da, wie in eigenen Versuchen mit fmoc-geschütztem 5-HT festgestellt werden konnte, die 5-Hydroxyfunktion des Monoamins aminoselektiven Reagenzien gegenüber inert ist, muss die Identität des von WATTS vorgestellten 5-HT-biotins



bezweifelt werden. Nach Erhalt der Substanz, gefolgt von einer eigenen Synthese, konnte bestätigt werden dass die kovalente Bindung an Proteine seinen Ursprung in Restmengen des Edukts Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin hat: Ohne Zugabe von TGM2 findet sich ein ebenso starkes Signal wie mit TGM2 (Abbildung 27 A; S. 83). Nach Entfernen der unspezifischen Komponente konnte keine nennenswerte Transamidierung beobachtet werden.

Im Gegensatz zu 5-HT besitzen DA und NE zwei relativ reaktive Hydroxylfunktionen, die die in Abbildung 26 auf S. 82 dargestellte Reaktion mit dem Kopplungsreagenz ermöglichen sollten. Tatsächlich wurden DA-biotin und NE-biotin erfolgreich hergestellt (Abbildung 27). Nach einem Reinigungsschritt ist eine deutliche TGM2-abhängige Transamidierung zu erkennen. Diese Reaktion kann konzentrationsabhängig durch freies DA gehemmt werden. Obwohl eine spektroskopische Charakterisierung der Substanz noch aussteht, kann DA-biotin demnach als Transamidierungsreagenz mit ähnlichen Amin-Substrat-Eigenschaften wie DA bezeichnet werden. Es eignet sich also für die *de novo*-Identifizierung dopaminylierter Proteine *in vitro* und in Zellkultur. Ob DA-biotin allerdings die gleiche Spezifität aufweist wie das freie Monoamin wird in zukünftigen Arbeiten zu klären sein, nicht zu vernachlässigen sind außerdem die enthaltenden Nebenprodukte, die v.a. durch Bindung der LC-LC-Biotin-Gruppe an die Aminogruppe des DA entstehen. Diese sollten für nachfolgende Versuche abgetrennt werden.

Mit dem nun zur Verfügung stehenden Reagenz wurden 3T3-L1-Adipozyten und PC12-Zellen behandelt. Nach der Streptavidin-Affinitätsaufreinigung waren im Eluat mehrere Proteinbanden zu erkennen, die auch eine Reaktivität gegen Streptavidin-HRP aufwiesen (Abbildung 28 A; S. 84). Dies bestätigt zum Einen die Eignung von DA-biotin als Amin-Substrat für zelluläre TGM, da *in vitro* in Abwesenheit von TGM2 keine Modifikation stattfindet (Abbildung 27 A) und die meisten Banden durch CTEA-Zugabe reprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Zudem können aufgrund der Reaktivität mit Streptavidin-HRP spezifisch die Affinitätsmatrix bindende DA-biotin-markierte Proteine von unspezifisch bindenden Proteinen unterschieden werden. Bei PC12 etwa werden in der Silberfärbung im Bereich von 86 bis 120 kDa Proteine angefärbt, die nicht mit Straptavidin-HRP reagieren. Zum Anderen kann die in Abbildung 25 C und H auf S. 80 festgestellte Existenz der Dopaminylierung für PC12-Zellen und 3T3-L1-Adipozyten nochmals bestätigt werden. Allerdings kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden, ob das Biotin-modifizierte DA-Derivat vom DAT transportiert wird oder ob es sich bei den detektierten Proteinen um extrazelluläre Proteine handelt. Um auszuschließen, dass es nach Lyse der Zellen zu einer unphysiologischen Proteinmodifikation kommt (z.B. durch deregulierte TGM), sollte zukünftig eine entsprechen-

de Kontrolle mitgeführt werden. Geeignet wäre z.B. die Lyse unter hochdenaturierenden Bedingungen oder der Einsatz von TGM-Inhibitoren.

Die Dopaminilyierung in 3T3-L1-Adipozyten wurde durch direkten Nachweis der Inkorporation von [<sup>3</sup>H]-DA in distinkte Proteine nochmals bestätigt (Abbildung 28 B; S. 84). Erkennbar ist eine starke Modifikation einzelner Proteine im Bereich von 10, 18 und etwa 30 kDa, die durch Zugabe von CTEA wie erwartet gehemmt und durch Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor LLnL erhöht wird. Da serotonylierte Proteine bekanntermaßen proteasomal abgebaut werden, war ein ähnlicher Mechanismus auch für die Dopaminilyierung zu erwarten [205,213]. Interessanterweise wurde bereits für die D $\beta$ H-positivem Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y eine Analyse DA-modifizierter Proteine durchgeführt [314]. Die Autoren gingen allerdings von einer oxidativen Chinonbildung als einziger Grundlage für die Bindung an Proteine aus, so dass eine Differenzierung der beiden potenziellen Mechanismen nicht möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden monaminilyierte Proteine identifiziert, indem kultivierte Zellen mit DA-biotin (3T3-L1, PC12) oder BAPA (ES, EF, HPA-SMC, Jurkat, PC12) behandelt und erhaltene Lysate einer Affinitätschromatographie mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse unterzogen wurden (Tabelle 11 und Tabelle 14; S. 86 und S. 139). Die Abhängigkeit von TGM wurde dabei durch Verwendung des Inhibitors CTEA in Kontrollproben sichergestellt. Insgesamt beträgt die Anzahl der gefundenen Proteine 103, so dass eine Verifizierung von Identität und Substrateigenschaften aller Q-Substrate den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Wie aus Abbildung 29 auf S. 87 zu erkennen ist, gehören die modifizierten Proteine den unterschiedlichsten Gruppen an: 41,8 % sind an Genexpression und Proteinfaltung beteiligt, 18,8 % haben Anteil an Glykolyse oder Fettsäure-Metabolismus, 9,9 % sind Signalproteine und 7,9 % mitochondriale Proteine. Allerdings ist nicht außer Acht zu lassen, dass möglicherweise nicht alle hier aufgeführten Proteine tatsächlich TGM-Substrate sind. Denkbar ist auch, dass einige Proteinkomplexe mit einzelnen monoaminilyierten Mitgliedern aufgereinigt und als Ganzes identifiziert wurden. Daher ist eine Verifizierung jedes einzelnen Proteins unerlässlich.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit ermittelten potenziell monoaminilyierten Proteine (zusammengefasst in Tabelle 14; S. 139) anhand der Literatur beurteilt werden. Da viele zelluläre Funktionen zelltypübergreifenden Charakter haben, wird dabei größerer Wert auf den regulierten Vorgang an sich als auf zellspezifische Besonderheiten gelegt. Diese Herangehensweise wird gestützt durch die mehrmalige Identifizierung einiger Proteine (z.B.  $\alpha$ -Enolase, NPM1, Actin und Tubulin) in unterschiedlichen Zelllinien.

Über die Transamidierung von Chaperonen und anderen in die Proteinfaltung involvierten Faktoren ist bereits eine breite Literaturbasis vorhanden. Unter den hier identifizierten Q-Substraten ist z.B. Chaperonin, das in der humanen Kolorektalkarzinoma-Zelllinie CaCo-2 mit BAPA modifiziert gefunden wurde [315]. Des Weiteren wurde das ER-Protein HSP90 $\beta$  in 3T3-L1-Adipozyten modifiziert vorgefunden; Hitzeschock-Proteine (HSPs) wie HSP27 und andere sind bekanntermaßen Teil der für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen, möglicherweise durch TGM stabilisierten Neurofibrillen-Knäuel [316-318]. Calnexin, ein weiteres in dieser Arbeit identifiziertes ER-Protein, kolokalisiert mit TGM2 und wird durch TGM-Einwirkung polymerisiert [319]. SerpinH1, auch als HSP47 bezeichnet, ist ebenfalls ein potenziell dopaminyliertes molekulares Chaperon aus 3T3-L1-Adipozyten, und das verwandte extrazelluläre SerpinE (PAI), dessen Bindeprotein PAI1BP in Jurkat und 3T3-L1 gefunden wurde, ist bekannt für seine TGM1-vermittelte Quervernetzung in der CE [320]. Als letztes Chaperon ist NPM1 zu nennen, das in drei Zelllinien unabhängig voneinander mit BAPA oder DA-biotin modifiziert gefunden wurde. Wie oben erläutert führt die Transamidierung des Proteins zur Translokation ins Zytosol, einhergehend mit einer Chemoresistenz [303]. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge wird NPM1 in PC12-Zellen zwar mit BAPA modifiziert, eine Dopaminylierung konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 30 C; S. 87).

Transamidierte ribosomale Proteine, wie sie z.B. in HPA-SMC und ES gefunden wurden, sind nicht als Q-Substrate bekannt. Allerdings wurde über die von TGM2 katalysierte posttranslationale Modifikation des Initiationsfaktors eIF5 $\alpha$  mit der Aminosäure Hypusin berichtet [321]. Möglicherweise kann BAPA in Zellkultur als Substratersatz fungieren, was die Koaufräumung ribosomaler Proteine erklären würde. Mittels DA-biotin und BAPA identifiziert wurden weiterhin verschiedene Histone. Literaturbekannt ist die MDC-Modifikation und die Quervernetzung der Histone 2A/B, 3 und 4 durch TGM2 [322,323].

Unter den strukturbildenden Proteinen ist z.B. über Actin bekannt, dass es in apoptotischen Zellen Q-Substrat für TGM ist [324,325]. Die Serotonylierung und Norepinephrynylierung von Actin wurde bereits in Abschnitt I4.2 beschrieben [211,212]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Strukturprotein ebenfalls mit BAPA oder DA-biotin modifiziert nachgewiesen. Bekannt für seine vielfältigen posttranslationalen Modifikationen ist Tubulin, zu denen auch eine Transamidierung während der murinen Hirnreifung zählt [326]. Nach den hier vorgestellten Erkenntnissen werden verschiedene Tubulin-Untereinheiten in PC12, Jurkat, ES und 3T3-L1-Adipozyten transamidiert. Weniger gut charakterisiert sind die Substrateigenschaften des Myosins. Neben der oben erwähnten Serotonylierung ist auch bekannt, dass das Protein als Amin-Substrat in einer Quervernetzung mit G-Actin reagieren kann [211,327].

Aus der Gruppe der ECM-Proteine wurde hier lediglich Collagen identifiziert, das in der Literatur als Substrat der TGM2-vermittelten Putrescin-Inkorporation beschrieben wurde [328]. Eine potenzielle Monoaminylierung ist also keineswegs ausgeschlossen.

Ins Auge fällt weiterhin die Identifizierung von mitochondrialen Proteinen wie ATP-Synthase oder mitochondrialer GDH. Doch auch hier kann auf bestehende Literatur verwiesen werden: Der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette ist nämlich bei TGM2-defizienten Mäusen in seiner Funktion eingeschränkt, und die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase gilt als Q-Substrat für TGM [329]. Die  $\alpha$ -Untereinheit kann außerdem durch eine TGM aus *Caenorhabditis elegans* transamidiert werden [330]. Das gleiche gilt auch für das glykolytische Enzym  $\alpha$ -Enolase [330], dessen Isolierung aus 3T3-L1-Adipozyten und PC12-Zellen mittels 3T3-L1 und BAPA gelang. Ebenfalls an der Glykolyse beteiligt ist Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Über eine Funktion als Q-Substrat ist nichts bekannt, jedoch wurde das Protein als Amin-Substrat für Poly-Q-Peptide beschrieben [331,332]. Möglicherweise wurde das Enzym also aufgrund seiner Bindung an ein anderes Q-Substrat isoliert. Zu erwähnen bleibt noch die Phosphoglycerat-Kinase, isoliert aus 3T3-L1-Adipozyten und beschrieben als TGM2-Substrat [333].

Regulatoren der Redox-Homöostase konnten in dieser Arbeit ebenfalls als Q-Substrate beschrieben werden: Peroxiredoxine werden in ES- und 3T3-L1-Zellen durch TGM modifiziert. In diesem Zusammenhang ist über diese Proteine lediglich bekannt, dass ihre Expression in SH-SY5Y-Zellen durch TGM2 reguliert wird [334].

Zuletzt soll auf die Gruppe der Signalproteine eingegangen werden. Identifiziert wurden u.a. die kleinen GTPasen Rab1a, Rab1b, Rab18 und Arf1. Dass diese Proteinfamilie Ziel der Serotonylierung und auch der Monoaminylierung generell sein kann, wurde in den vorangehenden Kapiteln ausführlich erläutert. Eine interessante Verbindung besteht aber außerdem zwischen dem Rab1-vermittelten Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat und der Transamidierung des für die PD mitverantwortlichen  $\alpha$ -Synucleins [335]. Die Dopaminylierung von Rab1b in PC12-Zellen wurde in dieser Arbeit bestätigt (Abbildung 31 C; S. 89). Als Signalprotein kann auch Gelsolin bezeichnet werden, ein Enzym mit vielfältigen Funktionen. Unter anderem ist es dafür bekannt, in Thrombozyten mit fXIIIA zu interagieren [336]. Wie in Abschnitt IV2.3 diskutiert wird das aus 3T3-L1-Adipozyten isolierte AnxA1 durch TGM1 in der CE quervernetzt [293]. Dies schließt eine regulatorische Monoaminylierung, wie sie von den vorgestellten Daten impliziert wird, aber nicht aus. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit die postulierte Dopaminylierung in 3T3-L1-Adipozyten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 32 B; S. 89).

Obwohl die hier zusammengestellten Erkenntnisse fast ausschließlich von einer Quervernetzung als Wirkprinzip ausgehen, ist die Beteiligung der Monoaminylierung nicht

unwahrscheinlich. Traditionell werden viele Identifizierungen mit Polyamin-Derivaten wie MDC oder BAPA durchgeführt, und da die Quervernetzung als wichtigste TGM-vermittelte Reaktion gilt, wird oft nur diese diskutiert. Unter Zellkulturbedingungen, d.h. praktisch in Abwesenheit von Monoaminen, könnte die Quervernetzung zellulärer Proteine aber auch als Ersatzreaktion auftreten. Unter diesem Gesichtspunkt bedarf die zu TGM-Substraten existierende Literatur also einer eingehenden Überprüfung auf möglicherweise übersehene Monoaminylierungen. Bemerkenswert ist, dass über 50 % der identifizierten Proteine bereits in irgendeiner Weise mit TGM assoziiert wurden. Diese Tatsache ist auch ein Argument für die Eignung der verwendeten Reagenzien.

Dennoch impliziert die hohe Wiedererkennungsrate auch das größte Problem der hier angewandten Methode: Die Spezifität von TGM für bestimmte Monoaminsubstrate wird von BAPA nicht wiedergegeben, und die Ähnlichkeit der Reaktivität von DA-biotin mit dem endogenen Substrat DA muss überprüft werden. In jedem Fall müssen alle identifizierten Proteine in Hinblick auf eine Monoaminylierung einzeln verifiziert werden, was in der vorliegenden Arbeit für drei Proteine versucht wurde. Alle drei waren tatsächlich *in vitro* Q-Substrate der TGM2, in Zellkultur lag aber nur eines, nämlich Rab1b, tatsächlich dopaminyliert vor. Zur Reduzierung des Zeit- und Materialaufwands wäre die Entwicklung einer direkten Nachweis- und Isolierungsmethode monoaminylierter Proteine ideal. So könnten z.B. mit [<sup>3</sup>H]-Monoaminen behandelte Zell- oder Gewebelysate durch eine 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand der im jeweiligen Proteinpunkt enthaltenen Radioaktivität ausgewertet werden. Allerdings wäre dazu die MS-Analyse radioaktiver Proben nötig. Eine ähnliche Methode wurde zur Identifikation DA-konjugierter Proteine in SH-SY5Y-Zellen von VAN LAAR *et al.* verwendet [314]. Da die verfügbaren Monoamin-Antikörper nicht für eine Immunopräzipitation geeignet sind, bietet sich als alternative Methode zur Anreicherung monoaminylierter Proteine schließlich wie in Abschnitt IV1.2 vorgeschlagen die Verwendung des 81D4-Isopeptid-Antikörpers an.

### 3.3 Ausblick auf durch Monoaminylierung modulierte Signalwege

#### 3.3.1 Histaminylierung: Regulation von GTPasen und $PLA_2$

Dass HA ein exzellentes Substrat für TGM-vermittelte Proteinmodifikation ist, wurde bereits ausführlich dargelegt. Insofern ist die Tatsache erstaunlich, dass der schon früh erkannten HA-Inkorporation in Leber- und Mastzellen bis heute keine physiologische Rolle zugeordnet werden konnte. Um die Möglichkeit einer solchen zu ergründen wurden im Rahmen dieser Arbeit vielfältige *in vitro*-Versuche durchgeführt. Demnach ist die TGM2-abhängige

Histaminierung eine regulatorische posttranslationale Modifikation kleiner und heterotrimerer GTPasen. Die Methoden zur Identifikation von *in vivo*-Substraten der Histaminierung, und damit des regulierten Mechanismus, sind allerdings limitiert. Neben der Ethylamin-Seitenkette stehen am Imidazolsystem des Moleküls keine einfach zugänglichen reaktiven Gruppen zur Verfügung; die Synthese eines HA-biotin-Derivats gestaltet sich daher schwierig. Alternativ könnten, wie für DA bereits vorgeschlagen, [<sup>3</sup>H]-HA-modifizierte Proteine durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und identifiziert werden oder eine Anreicherung mit Hilfe des 81D4-Isopeptid-Antikörpers erfolgen. Auch die erneute Generierung eines spezifisch gegen die Histaminierung gerichteten Antikörpers wäre denkbar. Bis solche Methoden zur Verfügung stehen, muss auf die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse zurückgegriffen werden.

$G\alpha_{o1}$  kann wie  $G\alpha_q$  durch TGM2-vermittelte Histaminierung reguliert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass das im Gehirn hoch exprimierte Protein in histaminergen Regionen des ZNS an der Autoregulation des VMAT2 beteiligt ist. Wie bekannt ist, bewirken hohe Monoamin-Konzentrationen in kleinen synaptischen Vesikeln eine Inhibition des VMAT2 [100], der eine hohe Affinität für HA besitzt. Was Mastzellen betrifft, so könnte die beobachtete schnelle  $Ca^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Cdc42 und anderen GTPasen nach Antigen-Stimulation auf eine Histaminierung zurückzuführen sein [337,338]. Da jene die Histaminausschüttung durch Degranulation bewirkt könnte hier durch autokrine Wirkung des HA eine negative Rückkopplungsschleife existieren. Eine Aktivierung der von Mastzellen exprimierten  $H_1$ -Rezeptoren resultiert nämlich in der  $G_q$ -vermittelten Aktivierung von PLC, die bekanntermaßen die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac inhibiert [339,338]. Die konzeptuell ähnliche autokrine Regulation der Insulin- und 5-HT-Ausschüttung wurde bereits für pankreatische  $\beta$ -Zellen beschrieben [213].

Die durch Histaminierung erhöhte Aktivität von  $PLA_2$  könnte seine physiologische Bedeutung ebenfalls in einer Funktion von Mastzellen haben: Diese sekretieren während einer allergischen Reaktion  $PLA_2$ , das wiederum proinflammatorisch eine erhöhte HA-Ausschüttung bewirkt [340,341]. Eine aktivierende Histaminierung von  $PLA_2$  in der Anfangsphase der allergischen Reaktion würde somit in einer positiven Verstärkung dieser münden.

### 3.3.2 Dopaminierung: Neurodegenerative Erkrankungen, Vesikelausschüttung und Strukturproteine

Um Zielproteine der Dopaminierung zu finden, wurden Affinitätsaufreinigungen mit DA-biotin- oder BAPA-modifizierten endogenen Proteinen durchgeführt. Neurodegenerative Erkrankungen wurden bereits mit DA in Verbindung gebracht: Im Zuge der Pathogenese von

PD wird ein Mechanismus der Bildung von SDS-unlöslichen  $\alpha$ -Synuclein-Oligomeren durch Modifikation mit DA diskutiert. Allerdings herrscht z.Zt. die Meinung vor, dass diese Modifikation auf der Bildung reaktiver DA-Derivate beruht [52,342]. Übersehen wird dabei bisher, dass auch eine TGM-vermittelte Reaktion für eine DA-Modifikation von  $\alpha$ -Synuclein in Frage kommt [253,317,343]. Die Abgrenzung von oxidativer und TGM-vermittelter Dopaminylierung wäre für zukünftige Studien also sehr interessant, da auch im Kontext anderer DA-vermittelter Effekte oft einfach von DA-Chinon-Bildung ausgegangen wird.

Wie oben beschrieben wurden im Rahmen dieser Arbeit eine ganze Reihe von mitochondrialen Proteinen dopaminyliert gefunden. Ein weiterer pathogener Mechanismus der PD ist die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette, der von Neurotoxinen wie MPP<sup>+</sup> oder Rotenon imitiert wird [344]. Der kanonischen Sichtweise nach kann zytosolisches DA, nach Bildung des reaktiven Chinons im oxidativen Milieu des Mitochondriums, u.a. Mitofilin, GRP75, Creatin-Kinase und ATP-Synthase kovalent modifizieren. Vergleicht man die von VON LAAR *et al.* ermittelten Zielproteine mit den hier mittels DA-biotin und BAPA isolierten putativen Q-Substraten, so fällt eine hohe Übereinstimmung auf [314]. Einige dieser Proteine (GRP78, Creatin-Kinase und Triosephosphat-Isomerase) wurden ausschließlich unter Verwendung von DA-biotin identifiziert. Dies lässt auf die Präsenz von Amingekoppeltem DA-biotin schließen, das zur Bildung eines Chinons in der Lage wäre. Allerdings wurden auch einige Proteine (Tubulin, ATP-Synthase  $\beta$ , Actin und Peroxiredoxin) unter Verwendung von DA-biotin und BAPA gefunden. BAPA kann keine reaktiven Chinone bilden und wird ausschließlich durch eine Transamidierung an Proteine gebunden.

Aufgrund der Kongruenz zwischen BAPA/DA-biotin- und scheinbar DA-Chinon-modifizierten Proteinen sollte eine TGM-vermittelte Reaktion im Kontext der toxischen Wirkung hoher intrazellulärer DA-Konzentrationen auf Mitochondrien in Betracht gezogen werden. Bekannt ist, dass eine erhöhte TGM-Aktivität in Patienten mit PD auftritt [345,346], und dass CTA einen positiven Effekt auf den Verlauf von PD und *Chorea Huntington* hat [347]. Berichtet wurde auch über die Existenz von TGM-Aktivität in hochreinen Mitochondrien [348] und die Anfälligkeit des mitochondrialen Komplex I in *Tgm2<sup>-/-</sup>*-Mäusen [329]. In der entsprechenden Studie wurde auch die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, die auch in dieser Arbeit dopaminyliert vorgefunden wurde, als TGM-Substrat beschrieben. Auch wenn anhand der gewonnenen Daten keine Dopaminylierung in der Pathogenese von PD postuliert werden kann, deuten doch einige Fakten auf diesen alternativen Mechanismus der Bildung von DA-Protein-Konjugaten bei neurodegenerativen Erkrankungen hin.

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge wird Rab1b in 3T3-L1-Adipozyten dopaminyliert (Abschnitte III3.2.3 und III3.2.5). Über das Protein ist allerdings wenig bekannt,

abgesehen von seiner Funktion beim Transport früher SV vom ER zum Golgi-Apparat [349]. Im Zuge der Differenzierung wird das Protein in diesen Zellen vermehrt exprimiert, was eine spezielle Funktion im Adipozyten impliziert [350]. Welchen Effekt eine Dopaminylierung auf den sekretorischen Weg haben könnte, muss an dieser Stelle unbeantwortet bleiben. Nicht unerwähnt bleiben soll aber, dass Rab1a/b mit PD in Verbindung gebracht wurde.  $\alpha$ -Synuclein, die Hauptkomponente der Lewy-Körper, bewirkt eine Störung des ER-Golgi-Transports die durch konstitutiv aktives Rab1 überwunden werden kann [335].

Rab18 konnte in dieser Arbeit sowohl *in vitro* als auch in ES-Zellen als Q-Substrat für eine Histaminylierung bzw. BAPAylierung beschrieben werden (siehe Abschnitte III2.3 und III3.2.3). Bekannt ist, dass konstitutiv aktives Rab18 die Ausschüttung von SV von PC12-Zellen inhibiert [351]. Zudem wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Ausschüttung von Synaptosomen-SV abhängig von TGM ist. So stimulieren etwa TGM-Inhibitoren wie MDC und Methylamin die Ausschüttung von DA und NE aus Rattenhirn-Synaptosomen [352], und die Neuroexozytose von *Aplysia*-Synaptosomen wird durch TGM negativ reguliert [353]. Geht man von einer Dopaminylierung als zugrunde liegendem Mechanismus aus, läge hier eine negative Rückkopplung vor: Das ankommende Aktionspotential bewirkt in der dopaminergen Synapse einen lokalen Anstieg der  $Ca^{2+}_i$ -Konzentration und damit die Ausschüttung von SV. Ausgeschüttetes DA wird dann durch den DAT zurück in die Präsynapse transportiert, wo es durch die  $Ca^{2+}$ -aktivierte TGM kovalent mit Rab18 verknüpft würde. Dies wiederum bewirkte eine Hemmung der Exozytose weiterer SV.

Interessant ist weiterhin, dass die Strukturproteine Actin und Tubulin sowohl durch DA-biotin/BAPA als auch durch DA/DA-Chinon modifiziert werden [314]. Eine Regulierung der auf vielfältige Weise posttranslational modifizierten Proteine durch die Dopaminylierung scheint daher ein lohnendes Objekt zukünftiger Analysen zu sein [354]. Für die Hypothese, dass die GLUT4-Translokation in 3T3-L1-Adipozyten durch Dopaminylierung reguliert sein könnte, wurden dagegen keine Hinweise gefunden.

### 3.3.3 Norepinephrinylierung: Lymphozyten und Transferasen

In dieser Arbeit wurde die Norepinephrinylierung als mögliche regulatorische Proteinmodifikation entdeckt. So inkorporieren v.a. Jurkat-, aber auch andere Zelllinien TGM-abhängig NE in zelluläre Proteine (Abbildung 25; S. 80). Weiterhin gelang die Synthese eines NE-biotin-Derivats (Abbildung 27 A; S. 83), das in Nachfolgestudien zur Identifikation von *in vivo* norepinephrinylierten Proteinen herangezogen werden kann.

Zwar wird Cytokin-Ausschüttung und Proliferation durch norepinephrinerge Innervierung von CD4+ T- und B-Lymphozyten beeinflusst [355], doch ist über die genaue Wirkung von



NE auf zytotoxische T-Zellen bisher wenig bekannt. Interessanterweise wurde auch über eine Reduktion der NET-Expression in Lymphozyten von Patienten mit klinischer Depression berichtet [356]. Über in Lymphozyten norepinephrinylierte Proteine kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur spekuliert werden.

In der Literatur gibt es, um ein weiteres möglicherweise durch Norepinephrinylierung beeinflusstes Zellsystem zu nennen, Hinweise auf eine Regulation von Transferasen durch NE. Die microsomale Glutathion-S-Transferase beispielsweise wird in der Leber mit NE modifiziert [311], und in Adipozyten wird die mitochondriale sowie microsomale Glycerol-3-Phosphat-O-Acyltransferase durch NE inhibiert [357]. Ob diese Effekte allerdings auf einem oxidativen Mechanismus beruhen oder TGM-vermittelt auftreten, muss Gegenstand zukünftiger Studien bleiben.

## V LITERATUR

1. RAPPORT, GREEN, & PAGE (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, 176: 1243-1251.
2. BARGER & DALE (1910). Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J. Physiol. (Lond.)*, 41: 19-59.
3. DALE & LAIDLAW (1910). The physiological action of beta-iminazolylethylamine. *J. Physiol. (Lond.)*, 41: 318-344.
4. CARLSSON, LINDQVIST, MAGNUSSON, & WALDECK (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 127: 471.
5. VON EULER & HAMBERG (1949). l-norAdrenaline in the Suprarenal Medulla. *Nature*, 163: 642-643.
6. GAMARNIK & FRYDMAN (1991). Cadaverine, an Essential Diamine for the Normal Root Development of Germinating Soybean (*Glycine max*) Seeds. *Plant Physiol.*, 97: 778-785.
7. HYLAND (1999). Presentation, diagnosis, and treatment of the disorders of monoamine neurotransmitter metabolism. *Semin. Perinatol.*, 23: 194-203.
8. COON, MAZURUK, BERNARD, ET AL. (1996). The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 34: 76-84.
9. BROADLEY (2010). The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacol. Ther.*, 125: 363-375.
10. GHOLSON, HANKES, & HENDERSON (1960). 3-Hydroxyanthranilic acid as an intermediate in the oxidation of the indole nucleus of tryptophan. *J. Biol. Chem.*, 235: 132-135.
11. DIEL, BAYAS, STIBBE, ET AL. (1997). Histamine containing food: Establishment of a German Food Intolerance Databank (NFID). *Inflamm. Res.*, 46: 87-88.
12. HAAS, SERGEEVA, & SELBACH (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.*, 88: 1183-1241.
13. SOURKES & MISSALA (1981). Putrescine metabolism and the study of diamine oxidase activity in vivo. *Agents Actions*, 11: 20-27.
14. PRELL, MORRISHOW, DUOYON, & LEE (1997). Inhibitors of histamine methylation in brain promote formation of imidazoleacetic acid, which interacts with GABA receptors. *J. Neurochem.*, 68: 142-151.
15. PRELL, MARTINELLI, HOLSTEIN, ET AL. (2004). Imidazoleacetic acid-ribotide: an endogenous ligand that stimulates imidazol(in)e receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 13677-13682.
16. WALDMEIER (1987). Amine oxidases and their endogenous substrates (with special reference to monoamine oxidase and the brain). *J. Neural Transm. Suppl.*, 23: 55-72.
17. GORDON, QUINSEY, DUNKLEY, & DICKSON (2008). Tyrosine hydroxylase activity is regulated by two distinct dopamine-binding sites. *J. Neurochem.*, 106: 1614-1623.
18. ELSWORTH & ROTH (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.*, 144: 4-9.
19. ERICKSON, SCHAFER, BONNER, ET AL. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 5166-5171.
20. FLATMARK, ALMÁS, & ZIEGLER (2002). Catecholamine Metabolism: An Update on Key Biosynthetic Enzymes and Vesicular Monoamine Transporters. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 971: 69-75.
21. WALTHER, PETER, BASHAMMAKH, ET AL. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299: 76.
22. SUGDEN (2003). Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform

- mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J. Neurochem.*, 86: 1308-1311.
23. LIANG, WESSEL, IUVONE, ET AL. (2004). Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina. *Neuroreport*, 15: 1497-1500.
  24. SAKOWSKI, GEDDES, THOMAS, ET AL. (2006). Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.*, 1085: 11-18.
  25. GE, WHITE, & HAYNES (2009). Quantal Release of Serotonin from Platelets. *Anal. Chem.*, 81: 2935-2943.
  26. GUIGNABERT, RAFFESTIN, BENFERHAT, ET AL. (2005). Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation*, 111: 2812-2819.
  27. FANBURG & LEE (1997). A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am. J. Physiol.*, 272: L795-806.
  28. BATTAGLINO, FU, SPÄTE, ET AL. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J. Bone Miner. Res.*, 19: 1420-1431.
  29. CORNEA-HÉBERT, RIAD, WU, ET AL. (1999). Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 409: 187-209.
  30. CSABA, KOVÁCS, & PÁLLINGER (2006). Hormones in the nucleus. Immunologically demonstrable biogenic amines (serotonin, histamine) in the nucleus of rat peritoneal mast cells. *Life Sci.*, 78: 1871-1877.
  31. NAGATA, FUJIMIYA, SUGIURA, & UEHARA (2001). Intracellular localization of serotonin in mast cells of the colon in normal and colitis rats. *Histochem. J.*, 33: 559-568.
  32. EMANUELSSON, CARLBERG, & LÖWKVIST (1988). Presence of serotonin in early chick embryos. *Cell Differ.*, 24: 191-199.
  33. ARKHIPOVA, TRETYAK, & OZOLIN (1988). Effects of catecholamines and serotonin on the RNA-synthesizing activity of isolated nuclei and brain and liver chromatin in the rat. *Biokhimiya*, 53: 1078-81.
  34. SAXENA, MCNICOL, BRANDES, ET AL. (1989). Histamine formed in stimulated human platelets is cytoplasmic. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164: 164-168.
  35. SAXENA, BRANDES, BECKER, ET AL. (1989). Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science*, 243: 1596-1599.
  36. SZEBERÉNYI, PÁLLINGER, ZSINKÓ, ET AL. (2001). Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol. Lett.*, 76: 175-182.
  37. SCHNEIDER, MACHAVOINE, PLÉAU, ET AL. (2005). Organic cation transporter 3 modulates murine basophil functions by controlling intracellular histamine levels. *J. Exp. Med.*, 202: 387-393.
  38. SCHNEIDER, THIEBLEMONT, DE MORAES, & DY (2010). Basophils: new players in the cytokine network. *Eur. Cytokine Netw.*, 21: 142-153.
  39. LABELLA & BRANDES (2000). Interaction of histamine and other bioamines with cytochromes P450: implications for cell growth modulation and chemopotentiality by drugs. *Semin. Cancer Biol.*, 10: 47-53.
  40. BRANDES, QUEEN, & LABELLA (2002). Displacement of histamine from liver cells and cell components by ligands for cytochromes P450. *J. Cell. Biochem.*, 85: 820-824.
  41. ABRIGHACH, FAJARDO, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, & URDIALES (2010). Exploring polyamine regulation by nascent histamine in a human-transfected cell model. *Amino Acids*, 38: 561-573.
  42. SUN, KURAMASU, MAKABE-KOBAYASHI, ET AL. (2002). Effect of intracellular histamine on the gene expression profile in mouse bone marrow-derived mast cells. *Inflamm. Res.*, 51 Suppl 1: S11-12.
  43. WESTERLUND, HOFFER, & OLSON (2010). Parkinson's disease: Exit toxins, enter genetics.

- Prog. Neurobiol.*, 90: 146-156.
44. NAPOLITANO, PEZZELLA, & PROTA (1999). New Reaction Pathways of Dopamine under Oxidative Stress Conditions: Nonenzymatic Iron-Assisted Conversion to Norepinephrine and the Neurotoxins 6-Hydroxydopamine and 6,7-Dihydroxytetrahydroisoquinoline. *Chem. Res. Toxicol.*, 12: 1090-1097.
  45. HASTINGS (2009). The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 41: 469-472.
  46. CHEN, DING, CAGNIARD, ET AL. (2008). Unregulated Cytosolic Dopamine Causes Neurodegeneration Associated with Oxidative Stress in Mice. *J. Neurosci.*, 28: 425-433.
  47. SAI, WU, LE, ET AL. (2008). Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. *Toxicol. In Vitro*, 22: 1461-1468.
  48. VERGO, JOHANSEN, LEIST, & LOTHARIUS (2007). Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res.*, 1185: 18-32.
  49. KITAYAMA, MORITA, & DOHI (1996). Uptake and release of dopamine through the rat dopamine transporter expressed in *Xenopus laevis* oocyte: evaluation by voltammetric measurement of intracellular dopamine concentration. *Neurosci. Lett.*, 211: 132-134.
  50. CHIEN, WALLINGFORD, & EWING (1990). Estimation of free dopamine in the cytoplasm of the giant dopamine cell of *Planorbis corneus* by voltammetry and capillary electrophoresis. *J. Neurochem.*, 54: 633-638.
  51. MARKAVERICH, GREGORY, & ALEJANDRO (1989). Intracellular [3H]dopamine binding sites in normal and malignant cells: Relationships to cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 391-400.
  52. OUTEIRO, KLUCKEN, BERCURY, ET AL. (2009). Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *PLoS ONE*, 4: e6906.
  53. MARTINEZ-VICENTE, TALLOCY, KAUSHIK, ET AL. (2008). Dopamine-modified  $\alpha$ -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.*, 118: 777-788.
  54. LAVOIE, OSTASZEWSKI, WEIHOFEN, ET AL. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat. Med.*, 11: 1214-1221.
  55. KUHN & ARTHUR (1998). Dopamine Inactivates Tryptophan Hydroxylase and Forms a Redox-Cycling Quinoprotein: Possible Endogenous Toxin to Serotonin Neurons. *J. Neurosci.*, 18: 7111-7117.
  56. ROMMELFANGER & WEINSHENKER (2007). Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.*, 74: 177-190.
  57. GERSHON, HAGOPIAN, & NUNEZ (1974). An electron microscope autoradiographic study of the neuronal and extraneuronal localization of labeled amine in the heart of the bat after administration of tritiated norepinephrine. *J. Cell Biol.*, 62: 610-624.
  58. SCHÖMIG, FISCHER, KURZ, ET AL. (1987). Nonexocytotic release of endogenous noradrenaline in the ischemic and anoxic rat heart: mechanism and metabolic requirements. *Circ. Res.*, 60: 194-205.
  59. DRYHURST (2001). Are dopamine, norepinephrine, and serotonin precursors of biologically reactive intermediates involved in the pathogenesis of neurodegenerative brain disorders? *Biological Reactive Intermediates IV - Chemical And Biological Mechanisms In Susceptibility To And Prevention Of Environmental Diseases*, 500: 373-396.
  60. NICHOLS & NICHOLS (2008). Serotonin Receptors. *Chem Rev.*, 108: 1614-1641.
  61. LAM & HEISLER (2007). Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev. Mol. Med.*, 9: 1-24.
  62. AZMITIA (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.*, 56: 413-424.
  63. YASUNO, SUHARA, NAKAYAMA, ET AL. (2003). Inhibitory effect of hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptors on human explicit memory. *Am. J. Psychiatry*, 160: 334-340.
  64. BARDIN, TARAYRE, MALFETES, ET AL. (2003). Profound, Non-Opioid Analgesia Produced

- by the High-Efficacy 5-HT<sub>1A</sub> Agonist F 13640 in the Formalin Model of Tonic Nociceptive Pain. *Pharmacology*, 67: 182-194.
65. WOUTERS, TULP, & BEVAN (1988). Flesinoxan lowers blood pressure and heart rate in cats via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 149: 213-223.
66. EBENEZER, ARKLE, & TITE (2007). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 29: 269-272.
67. MONTI & JANTOS (1992). Dose-dependent effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on sleep and wakefulness in the rat. *J. Sleep Res.*, 1: 169-175.
68. KENNETT, DOURISH, & CURZON (1987). Antidepressant-like action of 5-HT<sub>1A</sub> agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. *Eur. J. Pharmacol.*, 134: 265-274.
69. PARSONS & GANELLIN (2006). Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 147 Suppl 1: S127-135.
70. REINER & KAMONDI (1994). Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H<sub>1</sub> receptor activation reduces a background leakage potassium current. *Neuroscience*, 59: 579-588.
71. BONGERS, BAKKER, & LEURS (2007). Molecular aspects of the histamine H<sub>3</sub> receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 73: 1195-1204.
72. BAKKER (2004). Histamine H<sub>3</sub>-receptor isoforms. *Inflamm. Res.*, 53: 509-516.
73. HOFSTRA, DESAI, THURMOND, & FUNG-LEUNG (2003). Histamine H<sub>4</sub> receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305: 1212-1221.
74. FREMEAU, DUNCAN, FORNARETTO, ET AL. (1991). Localization of D<sub>1</sub> dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 3772-3776.
75. HUMMEL & UNTERWALD (2002). D<sub>1</sub> dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *J. Cell. Physiol.*, 191: 17-27.
76. MENGOD, VILLARÓ, LANDWEHRMEYER, ET AL. (1992). Visualization of dopamine D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptor mRNA's in human and rat brain. *Neurochem. Int.*, 20: 33-43.
77. AMENTA, RICCI, TAYEBATI, & ZACCHEO (2002). The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 107: 145-167.
78. USIELLO, BAIK, ROUGE-PONT, ET AL. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Nature*, 408: 199-203.
79. SOKOLOFF, GIROS, MARTRES, ET AL. (1992). Localization and function of the D<sub>3</sub> dopamine receptor. *Arzneimittelforschung*, 42: 224-230.
80. RYOO, PIERROTTI, & JOYCE (1998). Dopamine D<sub>3</sub> receptor is decreased and D<sub>2</sub> receptor is elevated in the striatum of Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 13: 788-797.
81. LE FOLL, DIAZ, & SOKOLOFF (2005). A single cocaine exposure increases BDNF and D<sub>3</sub> receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport*, 16: 175-178.
82. LE FOLL, GALLO, LE STRAT, ET AL. (2009). Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behav. Pharmacol.*, 20: 1-17.
83. FARAONE, DOYLE, MICK, & BIEDERMAN (2001). Meta-Analysis of the Association Between the 7-Repeat Allele of the Dopamine D<sub>4</sub> Receptor Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am. J. Psychiatry*, 158: 1052-1057.
84. BYLUND, EIKENBERG, HIEBLE, ET AL. (1994). International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.*, 46: 121-136.
85. GUIMARÃES & MOURA (2001). Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacol. Rev.*, 53: 319-356.
86. SKOGSBERG, DICKER, RYDÉN, ET AL. (2008). ApoB100-LDL Acts as a Metabolic Signal from Liver to Peripheral Fat Causing Inhibition of Lipolysis in Adipocytes. *PLoS*

- ONE, 3: e3771.
87. SOFUOGLU & SEWELL (2009). Norepinephrine and Stimulant Addiction. *Addict. Biol.*, 14: 119-129.
  88. RAMOS & ARNSTEN (2007). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol. Ther.*, 113: 523-536.
  89. AMARA & KUCHAR (1993). Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu. Rev. Neurosci.*, 16: 73-93.
  90. GAINETDINOV & CARON (2003). MONOAMINE TRANSPORTERS: From Genes to Behavior. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43: 261-284.
  91. ENGEL, ZHOU, & WANG (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J. Biol. Chem.*, 279: 50042-50049.
  92. OGASAWARA, YAMAUCHI, SATOH, ET AL. (2006). Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J. Pharmacol. Sci.*, 101: 24-30.
  93. DAHLIN, XIA, KONG, ET AL. (2007). Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience*, 146: 1193-1211.
  94. JONKER & SCHINKEL (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308: 2-9.
  95. ERNE & KRAN (2009). Involvement of the organic cation transporters in histamine uptake into human vascular endothelial cells. *Inflamm. Res.*, 58: 61-62.
  96. BOROWSKY & HOFFMAN (1995). Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. *Int. Rev. Neurobiol.*, 38: 139-199.
  97. TORRES, GAINETDINOV, & CARON (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 13-25.
  98. EIDEN, SCHÄFER, WEIHE, & SCHÜTZ (2004). The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflügers Arch.*, 447: 636-640.
  99. SCHULDINER, FISHKES, & KANNER (1978). Role of a transmembrane pH gradient in epinephrine transport by chromaffin granule membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3713-3716.
  100. HÖLTJE, WINTER, WALTHER, ET AL. (2003). The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J. Biol. Chem.*, 278: 15850-15858.
  101. WINTER, BRUNK, WALTHER, ET AL. (2005). Galphao2 regulates vesicular glutamate transporter activity by changing its chloride dependence. *J. Neurosci.*, 25: 4672-4680.
  102. LANG & JAHN (2008). Core proteins of the secretory machinery. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 107-127.
  103. WENNERBERG, ROSSMAN, & DER (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.*, 118: 843-846.
  104. SUN, WATANABE, TAKANO, ET AL. (2006). Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells. *Genes Cells*, 11: 1097-1113.
  105. KIMMELMAN, NUÑEZ RODRIGUEZ, & CHAN (2002). R-Ras3/M-Ras induces neuronal differentiation of PC12 cells through cell-type-specific activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 5946-5961.
  106. TYBULEWICZ & HENDERSON (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.*, 9: 630-644.
  107. SCHMIDT & HALL (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.*, 16: 1587-1609.
  108. MOON & ZHENG (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.*, 13: 13-22.

109. NARUMIYA, TANJI, & ISHIZAKI (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.*, 28: 65-76.
110. SYMONS, DERRY, KARLAK, ET AL. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, 84: 723-734.
111. SNAPPER & ROSEN (1999). THE WISKOTT-ALDRICH SYNDROME PROTEIN (WASP): Roles in Signaling and Cytoskeletal Organization. *Annu. Rev. Immunol.*, 17: 905-929.
112. KREIS, THÉVENOT, ROUSSEAU, ET AL. (2007). The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 282: 21497-21506.
113. CHIANG, BAUMANN, KANZAKI, ET AL. (2001). Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, 410: 944-948.
114. ZHANG, CHERNOFF, & ZHENG (1998). Interaction of Rac1 with GTPase-activating proteins and putative effectors. A comparison with Cdc42 and RhoA. *J. Biol. Chem.*, 273: 8776-8782.
115. ZERIAL & MCBRIDE (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 107-117.
116. STENMARK & OLKKONEN (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol.*, 2: REVIEWS3007.
117. FISCHER VON MOLLARD, STAHL, WALCH-SOLIMENA, ET AL. (1994). Localization of Rab5 to synaptic vesicles identifies endosomal intermediate in synaptic vesicle recycling pathway. *Eur. J. Cell Biol.*, 65: 319-326.
118. NG & TANG (2008). Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res. Rev.*, 58: 236-246.
119. KHVOTCHEV, REN, TAKAMORI, ET AL. (2003). Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca<sup>2+</sup>-regulated versus constitutive exocytosis. *J. Neurosci.*, 23: 10531-10539.
120. HUME, COLLINSON, RPAK, ET AL. (2001). Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J. Cell Biol.*, 152: 795-808.
121. STINCHCOMBE, BARRAL, MULES, ET AL. (2001). Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 152: 825-834.
122. MOORE & BLOBEL (1994). A G protein involved in nucleocytoplasmic transport: the role of Ran. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 211-216.
123. BONIFACINO & GLICK (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116: 153-166.
124. KLEUSS, SCHERÜBL, HESCHELER, ET AL. (1993). Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Science*, 259: 832-834.
125. GIERSCHIK, MILLIGAN, PINES, ET AL. (1986). Use of specific antibodies to quantitate the guanine nucleotide-binding protein Go in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 2258-2262.
126. NÜSSE & NEER (1996). Localization of G alpha 0 to growth cones in PC12 cells: role of G alpha 0 association with receptors and G beta gamma. *J. Cell. Sci.*, 109 ( Pt 1): 221-228.
127. STRITTMATTER, FISHMAN, & ZHU (1994). Activated mutants of the alpha subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *J. Neurosci.*, 14: 2327-2338.
128. KROLL, CHEN, DE VIVO, ET AL. (1992). The Q205LGo-alpha subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation. *J. Biol. Chem.*, 267: 23183-23188.
129. DIVERSÉ-PIERLUISSI, REMMERS, NEUBIG, & DUNLAP (1997). Novel form of crosstalk between G protein and tyrosine kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 5417-5421.
130. OHARA-IMAIZUMI, KAMEYAMA, KAWAE, ET AL. (1992). Regulatory role of the GTP-binding protein, G(o), in the mechanism of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J.*

- Neurochem.*, 58: 2275-2284.
131. AHNERT-HILGER, HÖLTJE, PAHNER, ET AL. (2003). Regulation of vesicular neurotransmitter transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 150: 140-160.
  132. RAM & IYENGAR (2001). G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3 pathway: role in proliferation and transformation. *Oncogene*, 20: 1601-1606.
  133. BRUNK, BLEX, RACHAKONDA, ET AL. (2006). The first luminal domain of vesicular monoamine transporters mediates G-protein-dependent regulation of transmitter uptake. *J. Biol. Chem.*, 281: 33373-33385.
  134. DE VRIES, ZHENG, FISCHER, ET AL. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40: 235-271.
  135. HUANG, HEPLER, GILMAN, & MUMBY (1997). Attenuation of Gi- and Gq-mediated signaling by expression of RGS4 or GAIP in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 6159-6163.
  136. LAN, SARVAZIAN, TAUSSIG, ET AL. (1998). A Point Mutation in G $\alpha$ o and G $\alpha$ i1 Blocks Interaction with Regulator of G Protein Signaling Proteins. *J. Biol. Chem.*, 273: 12794 - 12797.
  137. DRUEY, SULLIVAN, BROWN, ET AL. (1998). Expression of GTPase-deficient Gialpha2 results in translocation of cytoplasmic RGS4 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 273: 18405-18410.
  138. BERMAN, KOZASA, & GILMAN (1996). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 271: 27209-27212.
  139. VALENCIA, CHARDIN, WITTINGHOFFER, & SANDER (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*, 30: 4637-4648.
  140. HALL (2000). GTPases.
  141. VETTER & WITTINGHOFFER (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294: 1299-1304.
  142. LI & ZHANG (2004). GTP Hydrolysis Mechanism of Ras-like GTPases. *J. Mol. Biol.*, 340: 921-932.
  143. DROSTEN, DHAWAHIR, SUM, ET AL. (2010). Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *EMBO J.*, 29: 1091-1104.
  144. SCHMIDT, SEHR, WILM, ET AL. (1997). Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature*, 387: 725-729.
  145. CHANDRASHEKAR, TSUJI, MORALES, ET AL. (1998). An ERp60-like protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* has both transglutaminase and protein disulfide isomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 531 -536.
  146. HOFFMANN & SCHMIDT (2004). CNF and DNT. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 152: 49-63.
  147. LERM, SELZER, HOFFMEYER, ET AL. (1999). Deamidation of Cdc42 and Rac by Escherichia coli Cytotoxic Necrotizing Factor 1: Activation of c-Jun N-Terminal Kinase in HeLa Cells. *Infect. Immun.*, 67: 496-503.
  148. NEMES, MAREKOV, FÉSÜS, & STEINERT (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 8402-8407.
  149. JAYO, CONDE, LASTRES, ET AL. (2009). New insights into the expression and role of platelet factor XIII-A. *J. Thromb. Haemost.*, 7: 1184-1191.
  150. LAHAV, KARNIEL, BAGOLY, ET AL. (2009). Coagulation factor XIII serves as protein disulfide isomerase. *Thromb. Haemost.*, 101: 840-844.
  151. NEMES & STEINERT (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.*, 31: 5-19.
  152. FARASAT, WEI, HERMAN, ET AL. (2009). Novel transglutaminase-1 mutations and genotype-phenotype investigations of 104 patients with autosomal recessive congenital ichthyosis in the USA. *J. Med. Genet.*, 46: 103-111.



153. LORAND & GRAHAM (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 140-156.
154. TARCSA, MAREKOV, ANDREOLI, ET AL. (1997). The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J. Biol. Chem.*, 272: 27893-27901.
155. HITOMI, HORIO, IKURA, ET AL. (2001). Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) expression in mouse tissues and cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33: 491-498.
156. CHEN, WANG, XU, ET AL. (2000). Transglutaminase-3, an esophageal cancer-related gene. *Int. J. Cancer*, 88: 862-865.
157. WILHELMUS, VERHAAR, BOL, ET AL. (2009). Novel role of transglutaminase 1 in corpora amyloacea formation? *Neurobiol. Aging*, in press:
158. DAVIES, ABLIN, MASON, & JIANG (2007). Expression of the prostate transglutaminase (TGase-4) in prostate cancer cells and its impact on the invasiveness of prostate cancer. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 6: 257-264.
159. TSENG, LIN, TANG, ET AL. (2009). Identification of the major TG4 cross-linking sites in the androgen-dependent SVS I exclusively expressed in mouse seminal vesicle. *J. Cell Biochem.*, 107: 899-907.
160. CASSIDY, VAN STEENSEL, STEIJLEN, ET AL. (2005). A Homozygous Missense Mutation in TGM5 Abolishes Epidermal Transglutaminase 5 Activity and Causes Acral Peeling Skin Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 77: 909-917.
161. HADJIVASSILIOU, AESCHLIMANN, STRIGUN, ET AL. (2008). Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann Neurol.*, 64: 332-343.
162. SATCHWELL, SHOEMARK, SESSIONS, & TOYE (2009). Protein 4.2: a complex linker. *Blood Cells Mol. Dis.*, 42: 201-210.
163. IISMAA, MEARNS, LORAND, & GRAHAM (2009). Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol. Rev.*, 89: 991-1023.
164. SARKAR, CLARKE, & WAELSCH (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 25: 451-452.
165. NANDA, IISMAA, OWENS, ET AL. (2001). Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II. *J. Biol. Chem.*, 276: 20673-20678.
166. AESCHLIMANN, KAUPP, & PAULSSON (1995). Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J. Cell Biol.*, 129: 881-892.
167. NUNES, GLEIZES, METZ, & RIFKIN (1997). Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.*, 136: 1151-1163.
168. BETHUNE & KHOSLA (2008). Parallels between Pathogens and Gluten Peptides in Celiac Sprue. *PLoS Pathog.*, 4: e34.
169. SHIN, JEON, KIM, ET AL. (2004). Cell Type-specific Activation of Intracellular Transglutaminase 2 by Oxidative Stress or Ultraviolet Irradiation. *J. Biol. Chem.*, 279: 15032-15039.
170. MEHTA, KUMAR, & KIM (2010). Transglutaminase 2: A multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer. *Biochem. Pharmacol.*, 80: 1921-1929.
171. CHHABRA, VERMA, & MEHTA (2009). Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context. *Anticancer Res.*, 29: 1909-1919.
172. KIM, JEITNER, & STEINERT (2002). Transglutaminases in disease. *Neurochem. Int.*, 40: 85-103.
173. KAHLEM, TERRÉ, GREEN, & DJIAN (1996). Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 14580-14585.

174. KARPUJ, GARREN, SLUNT, ET AL. (1999). Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96: 7388-7393.
175. LESORT, CHUN, JOHNSON, & FERRANTE (1999). Tissue transglutaminase is increased in Huntington's disease brain. *J. Neurochem.*, 73: 2018-2027.
176. KARPUJ, BECHER, SPRINGER, ET AL. (2002). Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat. Med.*, 8: 143-149.
177. YOHLING IV, JIANG, DEJOHN, ET AL. (2002). Inhibition of tryptophan hydroxylase activity and decreased 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in a mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.*, 82: 1416-1423.
178. REYNOLDS, DALTON, TILLERY, ET AL. (1999). Brain neurotransmitter deficits in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *J. Neurochem.*, 72: 1773-1776.
179. IISMAA, HOLMAN, WOUTERS, ET AL. (2003). Evolutionary specialization of a tryptophan indole group for transition-state stabilization by eukaryotic transglutaminases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 12636-12641.
180. CURTIS, STENBERG, BROWN, ET AL. (1974). Kinetics of transamidating enzymes. Production of thiol in the reactions of thiol esters with fibrinolyase. *Biochemistry*, 13: 3257-3262.
181. KERESZTESSY, CSOSZ, HÁRSFALVI, ET AL. (2006). Phage display selection of efficient glutamine-donor substrate peptides for transglutaminase 2. *Protein Sci.*, 15: 2466-2480.
182. SUGIMURA, HOSONO, WADA, ET AL. (2006). Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. *J. Biol. Chem.*, 281: 17699-17706.
183. FACCHIANO & FACCHIANO (2009). Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 years of growing. *Amino Acids*, 36: 599-614.
184. FOLK (1980). Transglutaminases. *Annu. Rev. Biochem.*, 49: 517-531.
185. IGARASHI & KASHIWAGI (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42: 39-51.
186. TUCHOLSKI, KURET, & JOHNSON (1999). Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J. Neurochem.*, 73: 1871-1880.
187. MILLER & JOHNSON (1995). Transglutaminase cross-linking of the tau protein. *J. Neurochem.*, 65: 1760-1770.
188. ESPOSITO, COSTA, AMORESANO, ET AL. (1999). Transglutaminase-mediated amine incorporation into substance P protects the peptide against proteolysis in vitro. *Regul. Pept.*, 84: 75-80.
189. JEITNER, MATSON, FOLK, ET AL. (2008). Increased levels of gamma-glutamylamines in Huntington disease CSF. *J. Neurochem.*, 106: 37-44.
190. PUNAKIVI, SMOLANDER, NIKU-PAAVOLA, ET AL. (2006). Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta*, 68: 1040-1045.
191. BUXMAN (1979). The Role of Enzymatic Coupling of Drugs to Proteins in Induction of Drug Specific Antibodies. *J. Investig. Dermatol.*, 73: 256-258.
192. CLARKE, MYCEK, NEIDLE, & WAELSCH (1959). The incorporation of amines into protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 79: 338-354.
193. MYCEK, CLARKE, NEIDLE, & WAELSCH (1959). Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84: 528-540.
194. PINCUS & WAELSCH (1968). The specificity of transglutaminase : II. Structural requirements of the amine substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126: 44-52.
195. WAJDA, GINSBURG, & WAELSCH (1961). Incorporation of histamine into liver protein in vivo. *Nature*, 191: 1204-1205.
196. SIEGEL & KHOSLA (2007). Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in

- disease states. *Pharmacol. Ther.*, 115: 232-245.
197. FESUS, SZUCS, BARRETT, ET AL. (1985). Activation of transglutaminase and production of protein-bound gamma-glutamylhistamine in stimulated mouse mast cells. *J. Biol. Chem.*, 260: 13771-13778.
198. WALTHER, PETER, WINTER, ET AL. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115: 851-62.
199. KILLAM & COHEN (1991). Characterization of rat platelet serotonin receptors with tryptamine agonists and the antagonists: ketanserin and SCH 23390. *Thromb. Res.*, 64: 331-340.
200. AHMED, JEFFUS, BUKHARI, ET AL. (2008). Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C terminus of serotonin transporter. *J. Biol. Chem.*, 283: 9388-98.
201. EDDAHIBI, HUMBERT, FADEL, ET AL. (2001). Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.*, 108: 1141-1150.
202. ABDUL, LOGOTHETIS, & HOOSEIN (1995). Growth-inhibitory effects of serotonin uptake inhibitors on human prostate carcinoma cell lines. *J. Urol.*, 154: 247-250.
203. SINGH, PAN, KAO, ET AL. (2003). Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 391-399.
204. EDDAHIBI, MORRELL, D'ORTHO, ET AL. (2002). Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.*, 20: 1559-1572.
205. GUILLUY, ROLLI-DERKINDEREN, THARAUX, ET AL. (2007). Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 282: 2918-28.
206. MING, VISWAMBHARAN, BARANDIER, ET AL. (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 8467-8477.
207. LIU & FANBURG (2006). Serotonin-induced growth of pulmonary artery smooth muscle requires activation of phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine protein kinase B/mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal S6 kinase 1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 34: 182-191.
208. GUILLUY, EDDAHIBI, AGARD, ET AL. (2009). RhoA and Rho Kinase Activation in Human Pulmonary Hypertension - Role of 5-HT Signaling. *Am J Respir Crit Care Med*,
209. LIU, WEI, LASKIN, & FANBURG (2010). Role of Protein Transamidation in Serotonin-induced Proliferation and Migration of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, in press:
210. NI, GEDDES, PRIESTLEY, ET AL. (2008). The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 154: 663-674.
211. WATTS, PRIESTLEY, & THOMPSON (2009). Serotonylation of vascular proteins important to contraction. *PLoS ONE*, 4: e5682.
212. JOHNSON, THOMPSON, & WATTS (2010). Modification of proteins by norepinephrine is important for vascular contraction. *Front. Physiol.*, 1: 12.
213. PAULMANN, GROHMANN, VOIGT, ET AL. (2009). Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic  $\beta$ -Cells by Protein Serotonylation. *PLoS Biol.*, 7: e1000229.
214. GYLFE (1977). Serotonin as marker for the secretory granules in the pancreatic beta-cell. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 452: 125-128.
215. UVNÄS-MOBERG, AHLENIUS, ALSTER, & HILLEGAART (1996). Effects of selective serotonin and dopamine agonists on plasma levels of glucose, insulin and glucagon in the rat. *Neuroendocrinology*, 63: 269-274.
216. GIANNACCINI, BETTI, PALEGO, ET AL. (2010). Human serotonin transporter expression during megakaryocytic differentiation of MEG-01 cells. *Neurochem. Res.*, 35: 628-635.

217. BATTAGLINO, FU, SPÄTE, ET AL. (2004). Serotonin regulates osteoclast differentiation through its transporter. *J. Bone Miner. Res.*, 19: 1420-1431.
218. VITALIS & PARNAVELAS (2003). The role of serotonin in early cortical development. *Dev. Neurosci.*, 25: 245-256.
219. LAVDAS, BLUE, LINCOLN, & PARNAVELAS (1997). Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 17: 7872-7880.
220. CSOMÓS, NÉMET, FÉSÜS, & BALAJTHY (2010). Tissue transglutaminase contributes to the all-trans retinoic acid induced differentiation syndrome phenotype in the NB4 model of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 116: 3933-3943.
221. DAI, DUDEK, PATEL, & MUMA (2008). Transglutaminase-catalyzed transamidation: a novel mechanism for Rac1 activation by 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326: 153-62.
222. DAI, DUDEK, LI, & MUMA (2010). Phospholipase C, Ca(2+), and calmodulin signaling are required for 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated transamidation of Rac1 by transglutaminase. *Psychopharmacology (Berl.)*, in press:
223. STUERENBURG, PETERSEN, BÄUMER, ET AL. (2002). Plasma concentrations of 5-HT, 5-HIAA, norepinephrine, epinephrine and dopamine in ecstasy users. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 23: 259-261.
224. FERRÉ & ARTIGAS (1995). Clozapine decreases serotonin extracellular levels in the nucleus accumbens by a dopamine receptor-independent mechanism. *Neurosci. Lett.*, 187: 61-64.
225. DALE, FRIESE, BATAR, ET AL. (2002). Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, 415: 175-179.
226. ALBERIO & CLEMETSON (2004). All platelets are not equal: COAT platelets. *Curr. Hematol. Rep.*, 3: 338-343.
227. HUMMERICH & SCHLOSS (2010). Serotonin--more than a neurotransmitter: transglutaminase-mediated serotonylation of C6 glioma cells and fibronectin. *Neurochem. Int.*, 57: 67-75.
228. BIRNBOIM & DOLY (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523.
229. SANGER, NICKLEN, & COULSON (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5463-5467.
230. MEHNERT (2007). Einfluss von Monoaminen auf Differenzierungs- und Proliferationsprozesse von embryonalen und adulten neuronalen Stammzellen. *Diplomarbeit am Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin*, 1-101.
231. BAUMKÖTTER (2007). Monoaminylierung in der Hyperproliferation humaner pulmonärer glatter Muskelzellen. *Diplomarbeit am Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin*, 1-97.
232. REED & LANE (1980). Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 285-289.
233. DALE, SCHÖNFELD, LANGEN, & STIEGER (1994). Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein Eng.*, 7: 925-931.
234. THAIN, GASTON, JENKINS, & CLARKE (1996). A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL. *Trends Genet.*, 12: 209-210.
235. STUDIER (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 41: 207-234.
236. BRADFORD (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
237. WEBER & OSBORN (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl

- sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
238. LAEMMLI (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
239. CORDELLA-MIELE, MIELE, & MUKHERJEE (1990). A novel transglutaminase-mediated post-translational modification of phospholipase A2 dramatically increases its catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, 265: 17180-17188.
240. DAY & KEILLOR (1999). A continuous spectrophotometric linked enzyme assay for transglutaminase activity. *Anal. Biochem.*, 274: 141-144.
241. RENSHAW, TOKSOZ, & SCHWARTZ (1996). Involvement of the small GTPase rho in integrin-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 271: 21691-21694.
242. KOSLOFF & SELINGER (2003). GTPase catalysis by Ras and other G-proteins: insights from Substrate Directed SuperImposition. *J. Mol. Biol.*, 331: 1157-1170.
243. RENS-DOMIANO & HAMM (1995). Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J.*, 9: 1059-1066.
244. BENARD, BOHL, & BOKOCH (1999). Characterization of Rac and Cdc42 Activation in Chemoattractant-stimulated Human Neutrophils Using a Novel Assay for Active GTPases. *J. Biol. Chem.*, 274: 13198 -13204.
245. SANDER, VAN DELFT, TEN KLOOSTER, ET AL. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.*, 143: 1385-1398.
246. YUAN, CHOI, KHOSLA, ET AL. (2005). Tissue transglutaminase 2 inhibition promotes cell death and chemosensitivity in glioblastomas. *Mol. Cancer Ther.*, 4: 1293 -1302.
247. XU, STOKES, JR, & VRANA (1998). Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *J. Neurosci. Res.*, 54: 691-697.
248. GINSBURG, WAJDA, & WAELSCH (1963). Transglutaminase and histamine incorporation in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 12: 251-264.
249. KONISHI & KAKIMOTO (1976). Formation of gamma-glutamylhistamine from histamine in rat brain. *J. Neurochem.*, 27: 1461-1463.
250. TSUJI, MATSUOKA, & NAKAJIMA (1977). Studies on formation of gamma-glutamylamines in rat brain and their synthetic and catabolic enzymes. *J. Neurochem.*, 29: 633-638.
251. PINKAS, STROP, BRUNGER, & KHOSLA (2007). Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.*, 5: e327.
252. GUILLUY, EDDAHIBI, AGARD, ET AL. (2009). RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 179: 1151-1158.
253. CASE & STEIN (2003). Kinetic Analysis of the Action of Tissue Transglutaminase on Peptide and Protein Substrates. *Biochemistry*, 42: 9466-9481.
254. RUSSELL (1981). Posttranslational modification of ornithine decarboxylase by its product putrescine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99: 1167-1172.
255. HAUERT, PATSTON, & SCHAPIRA (2000). C1 inhibitor cross-linking by tissue transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, 275: 14558-14562.
256. UNWIN, GRIFFITHS, & WHETTON (2009). A sensitive mass spectrometric method for hypothesis-driven detection of peptide post-translational modifications: multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing (MIDAS). *Nat Protoc.*, 4: 870-877.
257. SU, WILTSHIRE, BATALOV, ET AL. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 6062-6067.
258. THOMAS, FOURNET, SIMONET, ET AL. (2004). Definition of the fine specificity of the monoclonal antibody 81D4: its reactivity with lysine and polyamine isopeptide cross-links. *J. Immunol. Methods*, 292: 83-95.
259. DUVAL, CASE, STEIN, & CUNY (2005). Structure-activity relationship study of novel

- tissue transglutaminase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15: 1885-1889.
260. SCHAERTL, PRIME, WITYAK, ET AL. (2010). A Profiling Platform for the Characterization of Transglutaminase 2 (TG2) Inhibitors. *J. Biomol. Screen.*, 15: 478-487.
261. FREUND, DOSHI, GAUL, ET AL. (1994). Transglutaminase inhibition by 2-[(2-oxopropyl)thio]imidazolium derivatives: mechanism of factor XIIIa inactivation. *Biochemistry*, 33: 10109-10119.
262. JEON, LEE, JANG, ET AL. (2004). Different inhibition characteristics of intracellular transglutaminase activity by cystamine and cysteamine. *Exp. Mol. Med.*, 36: 576-581.
263. KORNER, SCHNEIDER, PURDON, & BJORNSSON (1989). Bovine aortic endothelial cell transglutaminase. Enzyme characterization and regulation of activity. *Biochem. J.*, 262: 633-641.
264. JEITNER, DELIKATNY, AHLQVIST, ET AL. (2005). Mechanism for the inhibition of transglutaminase 2 by cystamine. *Biochem. Pharmacol.*, 69: 961-970.
265. LESORT, LEE, TUCHOLSKI, & JOHNSON (2003). Cystamine inhibits caspase activity. Implications for the treatment of polyglutamine disorders. *J. Biol. Chem.*, 278: 3825-3830.
266. SUN, XU, ZHOU, ET AL. (2010). Effects of cysteamine on MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in mice. *Brain Res.*, 1335: 74-82.
267. ROBERTS, KOCH, DETRICK, ET AL. (1995). Thiazolidine prodrugs of cysteamine and cysteine as radioprotective agents. *Radiat. Res.*, 143: 203-213.
268. GRECO, BRUGNARA, ZAFFANELLO, ET AL. (2010). Long-term outcome of nephropathic cystinosis: a 20-year single-center experience. *Pediatr. Nephrol.*, 25: 2459-2467.
269. DUBINSKY & GRAY (2006). CYTE-I-HD: phase I dose finding and tolerability study of cysteamine (Cystagon) in Huntington's disease. *Mov. Disord.*, 21: 530-533.
270. BORRELL-PAGES (2006). Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSJ1b and transglutaminase. *J. Clin. Invest.*, 116: 1410-1424.
271. GILAD & GILAD (1986). Cytotoxic effects of monodansylcadaverine and methylamine in primary cultures of rat cerebellar neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 4: 401-405.
272. MOGER (1982). Monodansylcadaverine inhibition of testicular 17-ketosteroid reductase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60: 858-861.
273. GARCIA GIL, VAN LOOKEREN CAMPAGNE, ESBRIT, ET AL. (1984). Effect of monodansylcadaverine on the synthesis of phosphatidylinositol by rabbit neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta*, 794: 234-239.
274. LEWIS, HASCHEK, WYATT, ET AL. (1989). The accumulation of cystamine and its metabolism to taurine in rat lung slices. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 481-488.
275. STOKES, HASTINGS, & VRANA (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J. Neurosci. Res.*, 55: 659-665.
276. STOPPER, SCHUPP, FAZELI, ET AL. (2009). Genotoxicity of the neurotransmitter dopamine in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 23: 640-646.
277. KING, SUN, DIAZ, ET AL. (1998). The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature*, 396: 180-183.
278. BAGRODIA & CERIONE (1999). PAK to the future. *Trends Cell Biol.*, 9: 350-355.
279. NOSKOVA, BOTTALICO, OLSSON, ET AL. (2006). Histamine uptake by human endometrial cells expressing the organic cation transporter EMT and the vesicular monoamine transporter-2. *Mol. Hum. Reprod.*, 12: 483-489.
280. HÖLTJE, VON JAGOW, PAHNER, ET AL. (2000). The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J. Neurosci.*, 20: 2131-2141.
281. CORDELLA-MIELE, MIELE, BENINATI, & MUKHERJEE (1993). Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into phospholipase A2. *J. Biochem.*, 113: 164-173.
282. DIJKSTRA, KALK, HOL, & DRENTH (1981). Structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at 1.7Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 147: 97-123.
283. LIU, ZHU, HUANG, ET AL. (1995). Phospholipase A2 engineering. Probing the structural

- and functional roles of N-terminal residues with site-directed mutagenesis, X-ray, and NMR. *Biochemistry*, 34: 7322-7334.
284. SCHOCH (2003). In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 19: 75-81.
285. SOHN, KIM, YOON, ET AL. (2003). Novel transglutaminase inhibitors reverse the inflammation of allergic conjunctivitis. *J. Clin. Invest.*, 111: 121-128.
286. MORENO (2006). Effects of antinflammins on transglutaminase and phospholipase A2 activation by transglutaminase. *Int. Immunopharmacol.*, 6: 300-303.
287. PARENTE & SOLITO (2004). Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. *Inflamm. Res.*, 53: 125-132.
288. WALLNER, MATTALIANO, HESSION, ET AL. (1986). Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*, 320: 77-81.
289. LIM & PERVAIZ (2007). Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.*, 21: 968 - 975.
290. KIM, KIM, PARK, ET AL. (1994). Annexin-I inhibits phospholipase A2 by specific interaction, not by substrate depletion. *FEBS Lett.*, 343: 251-255.
291. WONG, NICK, & FROST (1992). Regulation of annexin I in adipogenesis: cAMP-independent action of methylisobutylxanthine. *Am. J. Physiol.*, 262: C91-97.
292. WONG, FROST, & NICK (1991). Protein-synthesis-dependent induction of annexin I by glucocorticoid. *Biochem. J.*, 275 ( Pt 2): 313-319.
293. MOORE & SARTORELLI (1992). Annexin I and involucrin are cross-linked by particulate transglutaminase into the cornified cell envelope of squamous cell carcinoma Y1. *Exp. Cell Res.*, 200: 186-195.
294. ANDO, IMAMURA, OWADA, ET AL. (1989). Cross-linking of lipocortin I and enhancement of its Ca<sup>2+</sup> sensitivity by tissue transglutaminase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163: 944-951.
295. HUANG, HSIA, IMAMURA, ET AL. (2004). Annexin II is a thiazolidinedione-responsive gene involved in insulin-induced glucose transporter isoform 4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 145: 1579-1586.
296. GOU, MISHRA, WENG, ET AL. (2008). Annexin A2 interactions with Rab14 in alveolar type II cells. *J. Biol. Chem.*, 283: 13156-13164.
297. WANG, CHINTAGARI, GOU, ET AL. (2007). Physical and functional interactions of SNAP-23 with annexin A2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 37: 467-476.
298. MOREL, PARTON, & GRUENBERG (2009). Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev. Cell.*, 16: 445-457.
299. FREHLICK, EIRÍN-LÓPEZ, & AUSIÓ (2007). New insights into the nucleophosmin/nucleoplamin family of nuclear chaperones. *Bioessays*, 29: 49-59.
300. NOZAWA, VAN BELZEN, VAN DER MADE, ET AL. (1996). Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J. Pathol.*, 178: 48-52.
301. FALINI, NICOLETTI, BOLLI, ET AL. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, 92: 519-532.
302. LIU, LIU, JANG, ET AL. (2007). Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 9679-9684.
303. PARK, HAN, LEE, ET AL. (2009). Depletion of nucleophosmin via transglutaminase 2 cross-linking increases drug resistance in cancer cells. *Cancer Lett.*, 274: 201-207.
304. WALTHER (2000). Die Dualität des serotonergen Systems. *Dissertation am Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin*, 1-198.
305. ROACH, CHAVEZ, MINEA, & LIENHARD (2007). Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem. J.*, 403: 353-8.

306. WATSON, ALYEA, HAWKINS, ET AL. Estradiol effects on the dopamine transporter – protein levels, subcellular location, and function. *J. Mol. Signal.*, 1: 5-5.
307. HAYER-ZILLGEN, BRÜSS, & BÖNISCH (2002). Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br. J. Pharmacol.*, 136: 829-836.
308. DUAN & WANG (2010). Selective Transport of Monoamine Neurotransmitters by Human Plasma Membrane Monoamine Transporter and Organic Cation Transporter 3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 335: 743-753.
309. CLAYTON, RINALDI, KANDYBA, ET AL. (2005). Liver cell lines for the study of hepatocyte functions and immunological response. *Liver Int.*, 25: 389-402.
310. STRELL, SIEVERS, BASTIAN, ET AL. (2009). Divergent effects of norepinephrine, dopamine and substance P on the activation, differentiation and effector functions of human cytotoxic T lymphocytes. *BMC Immunol.*, 10: 62.
311. LUNDQVIST & MÖRGENSTERN (1992). Mechanism of activation of rat liver microsomal glutathione transferase by noradrenaline and xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 43: 1725-1728.
312. IKURA, KITA, FUJITA, ET AL. (1998). Identification of Amine Acceptor Protein Substrates of Transglutaminase in Liver Extracts: Use of 5-(Biotinamido) Pentylamine as a Probe. *Arch. Biochem. Biophys.*, 356: 280-286.
313. RUOPPOLO, ORRÙ, D'AMATO, ET AL. (2003). Analysis of transglutaminase protein substrates by functional proteomics. *Protein Sci.*, 12: 1290-1297.
314. VAN LAAR, MISHIZEN, CASCIO, & HASTINGS (2009). Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol. Dis.*, 34: 487-500.
315. ORRÙ, CAPUTO, D'AMATO, ET AL. (2003). Proteomics Identification of Acyl-acceptor and Acyl-donor Substrates for Transglutaminase in a Human Intestinal Epithelial Cell Line. *J. Biol. Chem.*, 278: 31766 -31773.
316. EMANUELSSON, BOROS, HJERNOE, ET AL. (2005). Screening for Transglutaminase-Catalyzed Modifications by Peptide Mass Finger Printing Using Multipoint Recalibration on Recognized Peaks for High Mass Accuracy. *J. Biomol. Tech.*, 16: 197-208.
317. NEMES (2004). Cross-linking of ubiquitin, HSP27, parkin and -synuclein by -glutamyl- -lysine bonds in Alzheimer's neurofibrillary tangles. *FASEB J.*, 18: 1135-1137.
318. BOROS, KAMPS, WUNDERINK, ET AL. (2004). Transglutaminase catalyzes differential crosslinking of small heat shock proteins and amyloid-[beta]. *FEBS Lett.*, 576: 57-62.
319. KONG, LIN, LI, ET AL. (2009). Cyclophilin C-associated protein/Mac-2 binding protein colocalizes with calnexin and regulates the expression of tissue transglutaminase. *J. Cell. Physiol.*, 223: 151-157.
320. OJI, OJI, ADAMINI, ET AL. (2006). Plasminogen activator inhibitor-2 is expressed in different types of congenital ichthyosis: in vivo evidence for its cross-linking into the cornified cell envelope by transglutaminase-1. *Br. J. Dermatol.*, 154: 860-867.
321. BENINATI, GENTILE, CARAGLIA, ET AL. (1998). Tissue transglutaminase expression affects hypusine metabolism in BALB/c 3T3 cells. *FEBS Lett.*, 437: 34-38.
322. KIM, HOON NAM, KWON, ET AL. (2002). Histone cross-linking by transglutaminase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 1453-1457.
323. BALLESTAR, ABAD, & FRANCO (1996). Core Histones Are Glutaminyl Substrates for Tissue Transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, 271: 18817 -18824.
324. TAKASHI (1988). A novel actin label: a fluorescent probe at glutamine-41 and its consequences. *Biochemistry*, 27: 938-943.
325. NEMES, ADÁNY, BALÁZS, ET AL. (1997). Identification of Cytoplasmic Actin as an Abundant Glutaminyl Substrate for Tissue Transglutaminase in HL-60 and U937 Cells Undergoing Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 272: 20577 -20583.



326. MACCIONI & SEEDS (1986). Transglutaminase and neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biochem.*, 69: 161-168.
327. ELIGULA, CHUANG, PHILLIPS, ET AL. (1998). Transglutaminase-induced cross-linking between subdomain 2 of G-actin and the 636-642 lysine-rich loop of myosin subfragment 1. *Biophys. J.*, 74: 953-963.
328. BOWNESS, FOLK, & TIMPL (1987). Identification of a substrate site for liver transglutaminase on the aminopropeptide of type III collagen. *J. Biol. Chem.*, 262: 1022-1024.
329. BATTAGLIA, FARRACE, MASTROBERARDINO, ET AL. (2007). Transglutaminase 2 ablation leads to defective function of mitochondrial respiratory complex I affecting neuronal vulnerability in experimental models of extrapyramidal disorders. *J. Neurochem.*, 100: 36-49.
330. MÁDI, KELE, JANÁKY, ET AL. (2001). Identification of Protein Substrates for Transglutaminase in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283: 964-968.
331. COOPER, SHEU, BURKE, ET AL. (1997). Transglutaminase-catalyzed inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by polyglutamine domains of pathological length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 12604-12609.
332. ORRU, RUOPPOLO, FRANCESE, ET AL. (2002). Identification of tissue transglutaminase-reactive lysine residues in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Protein Sci.*, 11: 137-146.
333. COUSSONS, KELLY, PRICE, ET AL. (1991). Selective modification by transglutaminase of a glutamine side chain in the hinge region of the histidine-388----glutamine mutant of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochem. J.*, 273: 73-78.
334. LEE, KIM, & KIM (2006). Changes in gene expression with increased transglutaminase 2 in a SH-SY5Y cell line. *Front. Biosci.*, 11: 2774-2781.
335. COOPER, GITLER, CASHIKAR, ET AL. (2006).  $\alpha$ -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science*, 313: 324-328.
336. REX, BEAULIEU, PERLMAN, ET AL. (2009). Immune vs. thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signaling pathways, intracellular protein-protein interactions, and  $\alpha$ -granule release. *Thromb. Haemost.*, 102: 97-110.
337. HONG-GELLER & CERIONE (2000). Cdc42 and Rac Stimulate Exocytosis of Secretory Granules by Activating the Ip3/Calcium Pathway in Rbl-2h3 Mast Cells. *J. Cell Biol.*, 148: 481-494.
338. EL-SIBAI & BACKER (2007). Phospholipase C gamma negatively regulates Rac/Cdc42 activation in antigen-stimulated mast cells. *Eur. J. Immunol.*, 37: 261-270.
339. HADZIJUSUFOVIC, PETER, GLEIXNER, ET AL. (2010). H1-receptor antagonists terfenadine and loratadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells. *Exp. Hematol.*, 38: 896-907.
340. TRIGGIANI, GIANNATTASIO, CALABRESE, ET AL. (2009). Lung mast cells are a source of secreted phospholipases A2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124: 558-565.e3.
341. GRANATA, STAIANO, LOFFREDO, ET AL. (2010). The role of mast cell-derived secreted phospholipases A2 in respiratory allergy. *Biochimie*, 92: 588-593.
342. LEONG, CAPPAL, BARNHAM, & PHAM (2009). Modulation of  $\alpha$ -Synuclein Aggregation by Dopamine: A Review. *Neurochem. Res.*, 34: 1838-1846.
343. ANDRINGA, LAM, CHEGARY, ET AL. (2004). Tissue transglutaminase catalyzes the formation of alpha-synuclein crosslinks in Parkinson's disease. *FASEB J.*, 18: 932-934.
344. SCHAPIRA (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 7: 97-109.
345. VERMES, STEUR, JIRIKOWSKI, & HAANEN (2004). Elevated concentration of cerebrospinal fluid tissue transglutaminase in Parkinson's disease indicating apoptosis.

- Mov. Disord.*, 19: 1252-1254.
346. SÁRVÁRI, KÁRPÁTI, FÉSÜS, ET AL. (2002). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for N epsilon gamma-glutamyl lysine. *Anal. Biochem.*, 311: 187-190.
347. JEITNER, PINTO, KRASNIKOV, ET AL. (2009). Transglutaminases and neurodegeneration. *J. Neurochem.*, 109: 160-166.
348. KRASNIKOV, KIM, MCCONOUGHAY, ET AL. (2005). Transglutaminase activity is present in highly purified nonsynaptosomal mouse brain and liver mitochondria. *Biochemistry*, 44: 7830-7843.
349. HUTT & BALCH (2008). Rab1b Silencing Using Small Interfering RNA for Analysis of Disease-specific Function. *Small GTPases in Disease, Part A*, Volume 438: 1-10.
350. HUPPERTZ, SCHÜRSMANN, & JOOST (1993). Abundance and subcellular distribution of GTP-binding proteins in 3T3-L1 cells before and after differentiation to the insulin-sensitive phenotype. *Eur. J. Biochem.*, 215: 611-617.
351. VAZQUEZ-MARTINEZ, CRUZ-GARCIA, DURAN-PRADO, ET AL. (2007). Rab18 Inhibits Secretory Activity in Neuroendocrine Cells by Interacting with Secretory Granules. *Traffic*, 8: 867-882.
352. PASTUSZKO, WILSON, & ERECIŃSKA (1986). A role for transglutaminase in neurotransmitter release by rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 46: 499-508.
353. FACCHIANO, DELOYE, DOUSSAU, ET AL. (2010). Transglutaminase participates in the blockade of neurotransmitter release by tetanus toxin: evidence for a novel biological function. *Amino Acids*, 39: 257-269.
354. DEL DUCA, SERAFINI-FRACASSINI, BONNER, ET AL. (2009). Effects of post-translational modifications catalysed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments. *Biochem. J.*, 418: 651.
355. KOHM & SANDERS (2001). Norepinephrine and  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptor Stimulation Regulate CD4+ T and B Lymphocyte Function in Vitro and in Vivo. *Pharmacol. Rev.*, 53: 487 -525.
356. MATA, URBINA, MANZANO, ET AL. (2005). Noradrenaline transporter and its turnover rate are decreased in blood lymphocytes of patients with major depression. *J. Neuroimmunol.*, 170: 134-140.
357. RIDER & SAGGERSON (1983). Regulation by noradrenaline of the mitochondrial and microsomal forms of glycerol phosphate acyltransferase in rat adipocytes. *Biochem. J.*, 214: 235-246.

**VI ANHANG****A Oligonukleotide****Tabelle 12:** Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Rab1b_Eco_fw	GAATTCATGAACCCCGAATATGACTACCTGTTTAAGCTGC
Rab1b_Eag_rv	CGGCCGCTAGCAGCAGCCACC
Rab1b_6xHis_fw	CATCACCATCACCATCACATGAACCCCGAATATGAC
pTRab3c_fw	CATCACCATCACCATCACATGAGACACGAGGCG
pTRab3c_rv	CTCGAGACATTAGCAGCCACAGTTGGGCTGTG
mRab5a_fw	CCCGGGGATGGCTAATCGAGGAGCAACAAGACCC
mRab5a_rv	CTCGAGTCAGTTACTACAACACTGGCTTCTGGCTGG
pTRab5c_fw	CATCACCATCACCATCACATGGCGGGTCGAGGA
pTRab5c_rv	CTCGAGTCAGTTGCTGCAGCACTGGCTCCG
mRab10_fw	GTCGACGGATGGCGAAGAAGACGTACGAC
mRab10_rv	GCGGCCGCTCAGCAGCACTTGC
pTRab10_fw	CATCACCATCACCATCACATGGCGAAGAAGACGTAC
pTRab10_rv	CTCGAGTCAGCAGCACTTGCTCTTCCAGC
Rab11b_fw	GGATCCGGGACCCGGGAC
Rab11b_rv	CTCGAGTCACAGGCTCTGGC
6xHRab11b_fw	CATCACCATCACCATCACGGGACCCGGGACG
6xHRab11b_rv	CTCGAGTCACAGGCTCTGGCAGCACTGCAG
Rab18_fw	GAATTCGACGAGGACGTGC
Rab18_rv	CTCGAGTTATAGCACAGAGCAG
mRab31_fw	GTCGACGGATGGCGATACGGGAGCTC
mRab31_rv	GCGGCCGCTCAGCAGCACCG
pTRab31_fw	CATCACCATCACCATCACATGGCGATACGGGAGCT
pTRab31_rv	CTCGAGTCAGCAGCACCGACGGCTGG
mRab8a_fw	ATGGCGAAGACCTACGATTACCTGTTC
mRab8a_rv	TCACAGGAGACTGCACCGG
6xHRab8a_fw	CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG GCG AAG ACC TAC G
6xHRab8a_rv	CTC GAG TCA CAG GAG ACT GCA CCG GAA GAA GC
6xHcdc42_fw	CATCACCATCACCATCACTACAAAACCTGTTTCCGAAATGC
6xHcdc42_rv	CTCGAGTCATAGCAGCACACACCTGC
mRhoA_fw	CTCGAGATATGGCTGCCATCAGGAAGAAAC
mRhoA_rv	CCGCGGTCACAAGATGAGGCAC
6xH-RhoA_fw	CATCACCATCACCATCACATGGCTGCCATCAGGAAG
Rac1_fw	ATGCAGGCCATCAAGTGTGTGG
Rac1_rv	TTACAACAGCAGGCATTTTCTCTTCTCTTCTTG
6xHRac1_fw	CATCACCATCACCATCACATGCAGGCCATCAAGTG

- forts. Tabelle 12

6xHRac1_rv	CTCGAGTTACAACAGCAGGCATTTTCTCTTCTCTTCTTGACAGGAGG
Rab27core_fw	GAATTCCTGTGGGATACCGCGGGCCAGGAACGATTTTCGCAGCTAGGCGC GCCGC
Rab27core_rv	GCGGCCGCTAGCTGCGAAAGCGTTCCTGGCCCCGCGGTATCCCACAGGA ATTC
Galphao_fw	ATGGGATGTACTCTGAGCGC
GST-Galphao1-rv	CAGATCGTCAGTCAGTCACGAT
mNPM1_fw	GGATCCCTTCTCCCACACCGAAGTGC
mNPM1_rv	CCCGGGAGACAACACATTTCTTGGC
AnxA2_GFP_fw	GGTACCATGTCTACTGTCCACGAAATC
AnxA2_GFP_rv	GGATCCTCAGTCATCCCCACC
AlphaEno1_NoRS_fw	ATGTCTATTCTCAGGATCCACGCCAGAG
AlphaEno1_NoRS_rv	GGTCCATGCTTTATTTGGCCAGGGGG
mAlphaEno1b_fw	GAGCTCCCATGTCTATTCTCAGGATCCACGCCAGAG
mAlphaEno1b_rv	GGTACCTTATTTGGCCAGGGGG
6xHis_fw	TGAATTCGCCGCCACCATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACATG
hmSERT_fw	CTCCTCCTTCACGGACCAGC
hmSERT_rv	TGTCACCCACACCACCTTGC
rSERT_fw	GTTCTACTTGCGCCATGTCC
rSERT_rv	CAGGGCATCTTGGTAACAGTTG
hmHAT_fw	CTCCCCAAATGAGGAAATGC
hmHAT_rv	GCCATGGTTATCCCTAGTCT
rHAT_fw	CTCCCCAAATGAGGAAAGTGC
rHAT_rv	TTCTAGTCTTCCCAAGGTAGC
hmDAT_fw	CTGGTGTCTGGAAGATCTGC
hmDAT_rv	GAGAAGCACACCTGGGTGGC
rDAT_fw	GACAGTTCAACAGAGAAGGAGC
rDAT_rv	TCAGCACTCCAAACCCAACG
hmNET_fw	GCCACGGTATGGATTGATGC
hmNET_rv	TGAAGAGTTTCCGGTGTTCGC
rNET_fw	CTTCAAAGGAGTGGGCTATGC
rNET_rv	ATCCATACCGTGGCCTCC
hTGM1_fw	GTATGAGTACGACGAGCTGATAGTG
hTGM1_rv	AATTCTCCCAGACTCATTAAGAACA-
mTGM1_fw	GTTTGAATATGATGAGCTGATTGTG
mTGM1_rv	TACTATGGAACAGAAGCACAGATTG
rTGM1_fw	CCATCAAGAATGGCTTAGTCTACAT
rTGM1_rv	AGTAGGTGACACAAAGGTAGAGGTG
hTGM2_fw	TGTAGACAGTCTCACCTTCAGTGTC
hTGM2_rv	ATGTCTAGGATCCCATCTTCAAACCT
mTGM2_fw	GCCAACCACCTGAACAAACT
mTGM2_rv	CTTGATTTTCGGGATTCTCCA

- *forts. Tabelle 12*

---

rTGM2_fw	CTCTGTCAAGTTCATCAAGAGTGTG
rTGMw_rv	GTACTCGTTTCGGAAGTACTCGAT
hTGM3_fw	GCTGAGAGAGAAGAGTATGTTTCAGG
hTGM3_rv	TCTAGTACACATCCACACTGAGAT
mTGM3_fw	CTGGAGAAGATCTGAATTTTCATTGT
mTGM3_rv	AATGTCCTTCTTCAAACACTGTCCAAAG
rTGM3_fw	CTTTAGAGGTCCAAAACATCAACTG
rTGM3_rv	TGTCTTTCAGCATGGTTACTCATAA
hTGM4_fw	AACTGTGTGACCTCAATAAGACCTC
hTGM4_rv	GATAAATTTCTTGGGTCCAGTTTTT
mTGM4_fw	AGCAGAGTACATCCTTAATGACACC
mTGM4_rv	CCAGGTAGATGTCTACTGTGAGGTT
rTGM4_fw	ATTGCTAAACAGTCTGGTGTAGAGG
rTGM4_rv	CATTGCTATAGTCTCCTGTCCAGTT
hTGM5_fw	GGTGTCTCTGAAGGCTCTGC
hTGM5_rv	CGGATCAGCTTGTCTGTTGA
mTGM5_fw	TTCTGGAGAATATGAAGAAGGACAC
mTGM5_rv	TTTAGGAACACCTCTCTCTTTGAA
rTGM5_fw	TATGATACACGCTTTCGATTTTCTA
rTGM5_rv	ACAAAGTTTATATCTTGGCCCATTT
hTGM6_fw	GTGGACATCACTGACCTCTACAAG
hTGM6_rv	TTGTCCCTCTGTCAGGTCTTCTTTAT
mTGM6_fw	CAGCTCACAGTTCACAGACA
mTGM6_rv	GAGTTACCTGGGCTGAGCTG
rTGM6_fw	GACATCACAGGCCTCTACAAGTATC
rTGM6_rv	TCTTCTTGTCTTCTGTCAGGTCTTC
hTGM7_fw	ATCATAGACATCTGCTTTGAGATCC
hTGM7_rv	CCATATTTTGTCTCGTTTCTGAGTT
mTGM7_fw	GGGAGTGGCCTCATCAATGG
mTGM7_rv	CCTTGACCTCACTGCTGCTGA
rTGM7_fw	CTGAGACAGGACCAGAACCC
rTGM7_rv	GCTGTTGATCATAGCGCTTACC
hmrGAPDH_fw	ACCACAGTCCATGCCATCAC
hmrGAPDH_rv	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

---

## B *In vitro*-Monoaminylierung von kleinen und heterotrimeren GTPasen

Tabelle 13: Zahlenwerte der *in vitro*-Inkorporation von Monoaminen durch TGM in fmol/U/30'.

	MDC				5-HT				HA				DA				NE			
	TGM1	TGM2	TGM3	fXIIIA	TGM1	TGM2	TGM3	fXIIIA	TGM1	TGM2	TGM3	fXIIIA	TGM1	TGM2	TGM3	fXIIIA	TGM1	TGM2	TGM3	fXIIIA
<b>RhoA</b>	++	+++	+	++	n.d.	n.d.	120,4	n.d.	9,4	1493,0	n.d.	n.d.	7,5	201,1	n.d.	n.d.	1,1	500,0	n.d.	22,7
<b>TC10</b>	++	++	+	+	2,0	188,7	16,8	n.d.	n.d.	25220,3	118,5	n.d.	1,4	731,4	n.d.	n.d.	n.d.	477,3	n.d.	n.d.
<b>Cdc42</b>	n.d.	+++	n.d.	n.d.	5,2	297,2	n.d.	n.d.	5,6	11912,6	192,0	69,9	0,8	763,1	153,4	56,5	2,1	643,9	18,2	n.d.
<b>Rab3c</b>	+	+	+++	+++	n.d.	362,7	31,1	n.d.	n.d.	61152,1	n.d.	n.d.	n.d.	1701,1	33,3	n.d.	n.d.	2492,4	n.d.	n.d.
<b>Rab4</b>	+++	+++	+++	n.d.	1,0	273,7	16,2	n.d.	1,7	22868,9	73,4	678,3	n.d.	619,8	42,1	28,9	2,0	1401,5	n.d.	n.d.
<b>Rab5c</b>	+	++	+++	n.d.	n.d.	n.d.	18,8	n.d.	9,4	74049,0	55,2	n.d.	n.d.	n.d.	92,6	n.d.	14,1	2924,2	n.d.	n.d.
<b>Rab27a</b>	n.d.	++++	+++	+	0,3	134,9	89,7	38,1	3,5	617,1	4,9	n.d.	n.d.	245,2	n.d.	39,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>M-Ras</b>	+	++	++	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,5	44208,0	n.d.	867,1	6,7	498,6	n.d.	n.d.	n.d.	507,6	n.d.	n.d.
<b>Gαo1</b>	+++	+++	+	+	0,1	n.d.	26,4	n.d.	23,0	16227,3	4,9	38,5	1,3	239,7	67,2	n.d.	n.d.	636,4	45,5	22,7
<b>Gαq</b>	++	+++	+++	++	4,2	107,5	n.d.	33,2	9,7	29771,0	31,5	181,8	0,4	523,4	11,3	n.d.	0,8	583,3	12,1	n.d.
<b>pPLA2</b>	n.d.	++	n.d.	++	7,2	678,4	n.d.	101,7	n.d.	11708,0	152,1	347,9	n.d.	2205,2	n.d.	n.d.	n.d.	2181,8	n.d.	n.d.
<b>DMC</b>	++++	+++++	+++++	+++++	6,2	9445,7	n.d.	227,8	18,0	309582,2	103,5	12374,1	12,3	38493,1	n.d.	2020,7	36,8	41045,5	n.d.	2522,7

## C Identifizierung von monoaminylierten Proteinen

Tabelle 14: Vollständige Liste der identifizierten monoaminylierten Proteine.

Abkürzung	Protein	Species	Zelllinie	Substanz	Funktion	Qualität
GRP78_MOUSE	78 kDa glucose-regulated protein	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion	A
RLA0_MOUSE	Acidic ribosomal phosphoprotein P0	Mus musculus	ES	BAPA	Protein-Biosynthese	B
ACTA_RAT	Actin, aortic smooth muscle	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Zytoskelett	C
ACTA_MOUSE	Actin, aortic smooth muscle	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett	A
ACTB_RAT	Actin beta	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Zytoskelett	A
ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Zytoskelett	A
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett	A
AA3R_RAT	Adenosine A3 receptor	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Signaltransduktion	C
ARF1_HUMAN	ADP-ribosylation factor 1	Homo sapiens	HPA-SMC	BAPA	Signaltransduktion	C
ENOA_RAT	Alpha-enolase	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Glykolyse	B
ENOA_RAT	Alpha-enolase	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Glykolyse	A
ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Glykolyse	A
ANKS3_RAT	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 3	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Signaltransduktion	C
ANXA1_MOUSE	Annexin A1 (AnxA1)	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion	A
ANXA2_MOUSE	Annexin A2 (AnxA2)	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion	A
ARI4B_RAT	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Transkriptions-Regulation	C
ATPB_RAT	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta subunit	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Mitochondrienfunktion	A
ATPA_RAT	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Mitochondrienfunktion	A
ATPA_RAT	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Mitochondrienfunktion	B
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Mitochondrienfunktion	A
ATPG_RAT	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Mitochondrienfunktion	C
CALX_MOUSE	Calnexin	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	B
CH60_HUMAN	Chaperonin	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Proteinfaltung	A
30_RAT	Coiled-coil domain-containing protein 130	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Transkriptions-Regulation	C
CO1A1_RAT	Collagen alpha-1(I) chain	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Extrazelluläre Matrix	C
KCRU_RAT	Creatine kinase, ubiquitous mitochondrial	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Mitochondrienfunktion	B
Q3TMF5_MOUSE	Dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	Mus musculus	ES	BAPA	Fettsäure-Metabolismus	A
ODO2_MOUSE	Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)	Mus musculus	ES	BAPA	Fettsäure-Metabolismus	A
EF1A1_RAT	Elongation factor 1-alpha 1	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	A
ENPL_MOUSE	Endoplasmin	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	B
EF1A1_HUMAN	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Protein-Biosynthese	A
EF1A1_RAT	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Protein-Biosynthese	A
IF2A_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	C

- forts. Tabelle 14

IF2G_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	B
EIF3E_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	B
EIF3H_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	C
GELS_MOUSE	Gelsolin	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	A
DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Mitochondrienfunktion	C
G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Glykolyse	A
GDF6_RAT	Growth/differentiation factor 6	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Signaltransduktion	C
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	A
HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	A
HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	RNA-Metabolismus	C
ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	RNA-Metabolismus	C
H4_HUMAN	Histone 2, H4	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Protein-Biosynthese	B
H12_RAT	Histone H1.2	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	A
H2B1O_HUMAN	Histone H2A.2	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Protein-Biosynthese	B
H2B1A_RAT	Histone H2B type 1-A	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Protein-Biosynthese	C
LDHA_MOUSE	Lactate dehydrogenase 1, A chain	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Glykolyse	A
LDHA_MOUSE	Lactate dehydrogenase 1, A chain	Mus musculus	ES	BAPA	Glykolyse	A
ACTB_HUMAN	Mutant beta-actin (beta'-actin)	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Zytoskelett	A
MYL6_RAT	Myosin light polypeptide 6	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Motorprotein	C
NUDC_RAT	Nuclear distribution gene C homolog	Rattus norvegicus	PC12	BAPA	Zellzyklus	B
YBOX1_RAT	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Transkriptions-Regulation	A
NPM_RAT	Nucleophosmin 1	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Proteinfaltung	C
NPM_HUMAN	Nucleophosmin 1	Homo sapiens	HPA-SMC	BAPA	Proteinfaltung	A
NPM_MOUSE	Nucleophosmin 1	Mus musculus	ES	BAPA	Proteinfaltung	A
PAIRB_HUMAN	PAI-1 mRNA-binding protein, isoform 2	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	RNA-Metabolismus	A
PAIRB_MOUSE	PAI-1 mRNA-binding protein	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	RNA-Metabolismus	C
PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin 1	Mus musculus	ES	BAPA	Redox-Homöostase	A
PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin-1	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Redox-Homöostase	A
PRDX4_MOUSE	Peroxiredoxin-4	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Redox-Homöostase	B
PEBP1_MOUSE	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Spermienreifung	B
PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Glykolyse	A
PTBP1_HUMAN	Polypyrimidine tract-binding protein 1 isoform a	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	RNA-Metabolismus	A
PDIA4_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A4	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	A
PDIA6_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A6	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	A
PCX_MOUSE	Pyruvate carboxylase	Mus musculus	ES	BAPA	Glykolyse	A
ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Mus musculus	ES	BAPA	Glykolyse	B
KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Glykolyse	B
RAB1A_HUMAN	RAB1A, member RAS oncogene family	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Signaltransduktion	A



- forts. Tabelle 14

RAB18_MOUSE	RAB18, member RAS oncogene family	Mus musculus	ES	BAPA	Signaltransduktion	C
RAB1B_MOUSE	Ras-related protein Rab-1B	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Signaltransduktion	A
RL9_MOUSE	Ribosomal protein L9	Mus musculus	ES	BAPA	Protein-Biosynthese	A
RL10A_HUMAN	Ribosomal protein L10a	Homo sapiens	HPA-SMC	BAPA	Protein-Biosynthese	B
RL12_HUMAN	Ribosomal protein L12	Homo sapiens	HPA-SMC	BAPA	Protein-Biosynthese	A
RL14_HUMAN	Ribosomal protein L14	Homo sapiens	HPA-SMC	BAPA	Protein-Biosynthese	A
Q642K1_MOUSE	Ribosomal protein L18	Mus musculus	ES	BAPA	Protein-Biosynthese	A
SERPH_MOUSE	Serpin H1	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Proteinfaltung	C
ALBU_HUMAN	Serum albumin	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Redox-Homöostase	A
G3P_MOUSE	Similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mus musculus	ES	BAPA	Glykolyse	A
SFRS2_RAT	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	RNA-Metabolismus	C
PURB_RAT	Transcriptional activator protein Pur-beta	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Transkriptions-Regulation	B
TXTP_RAT	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Mitochondrienfunktion	C
TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Fettsäure-Metablismus	A
TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain	Rattus norvegicus	PC12	DA-biotin	Zytoskelett	B
TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett	A
TUBA2M_MOUSE	tubulin alpha isotype M-alpha-2	Mus musculus	ES	BAPA	Zytoskelett	C
TBA1A_HUMAN	tubulin alpha	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Zytoskelett	B
TBB5_HUMAN	Tubulin beta	Homo sapiens	Jurkat	BAPA	Zytoskelett	A
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain	Mus musculus	3T3-L1-Adipozyten	DA-biotin	Zytoskelett	B

## D Zusammenfassung

Die biogenen Monoamine Serotonin (5-HT), Histamin (HA), Dopamin (DA) und Norepinephrin (NE) sind Neurotransmitter und Hormone, die wichtige Funktionen des Säugerorganismus regulieren. Kürzlich wurde über eine neuartige posttranslationale Modifikation von kleinen G-Proteinen berichtet, bei der unter bestimmten Bedingungen 5-HT kovalent mit einem proteingebundenen Glutamin (Q)-Rest verknüpft wird. Durch diese Reaktion, die von Enzymen der Transglutaminase (TGM)-Familie katalysiert wird, verändert sich die katalytische GTPase-Aktivität der Signalproteine.

Um zu klären, ob es sich dabei um ein auf 5-HT beschränktes Phänomen oder einen generellen Regulationsmechanismus handelt, wurden die vier Monoamine 5-HT, HA, DA und NE *in vitro* und in Zellkultur untersucht. Zunächst wurden dazu acht kleine und zwei heterotrimere GTPasen sowie Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) in Kombination mit TGM1, 2, 3 und fXIIIa sowie den vier Monoaminen mit dem Ergebnis analysiert, dass die TGM-abhängige Inkorporation von Monoaminen (Monoaminylierung) spezifisch erfolgt. Dabei ist die HA-Inkorporation (Histaminylierung) am stärksten, gefolgt von DA, NE und 5-HT. Nach einer Histaminylierung verändert sich die Funktion der kleinen und heterotrimeren GTPasen, wie mittels GTP-Hydrolyse-Experimenten und Effektor-Bindungsstudien gezeigt werden konnte. Bedingt durch eine verminderte intrinsische und GAP-vermittelte Hydrolyseaktivität verbleiben G $\alpha_{o1}$  und Cdc42 konstitutiv im GTP-gebundenen, aktiven Zustand und binden somit verstärkt an die Bindungspartner RGS4 bzw. Pak3. Im Gegensatz dazu wird die PLA<sub>2</sub>-Aktivität durch Histaminylierung signifikant verstärkt.

Da nahezu alle GTPasen einen konservierten Q-Rest im katalytischen Zentrum besitzen, lag die Vermutung nahe dass dieser Rest durch TGM modifiziert wird. Tatsächlich konnte die Hypothese mittels massenspektrometrischer Untersuchung der Fragmentierungsmuster von G $\alpha_{o1}$ , G $\alpha_q$  und Rab18 bestätigt werden. Im Prinzip kann die Histaminylierung damit als eine neuartige, TGM-vermittelte regulatorische posttranslationale Modifikation von Signalproteinen vorgestellt werden.

Nach einer Analyse von acht Zelllinien unterschiedlicher Gewebetypen hinsichtlich der Expression von vier Monoamin-Transportern und sieben TGM wurden Monoamin-Aufnahme und -Inkorporation bestimmt. Anhand des kompetitiven Inhibitors Cysteamin wurde dabei die TGM-Abhängigkeit beurteilt. Es zeigte sich, dass in allen untersuchten Zelllinien eine Monoaminylierung stattfand, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Am deutlichsten war die Dopaminylierung, doch auch NE- und HA- und 5-HT-Inkorporation waren detektierbar. Die Monoaminylierung ist demnach eine in vielen Zellen vorkommende Erscheinung.

Um potenziell durch diese Modifikation regulierte Signalwege zu identifizieren, wurden PC12- und 3T3-L1-Zellen mit einem selbst entwickelten DA-Derivat (DA-biotin) oder dem kommerziellen 5-(Biotinamido)-Pentylamin behandelt und kovalent modifizierte Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert. Demnach sind eine Vielzahl von Proteinen Substrate der Monoaminylierung. Sie gehören wichtigen Funktionsgruppen an wie Proteinbiosynthese und -Faltung, Glykolyse und Fettsäuremetabolismus, Signaltransduktion und Mitochondrienfunktion. Die Substratproteine Rab1b, NPM1 und AnxA2 wurden genauer untersucht, wobei für NPM1 und Rab1b eine Monoaminylierung in PC12-Zellen verifiziert werden konnte.

Anhand dieser Erkenntnisse kann nun eine detaillierte Analyse der Monoaminylierung erfolgen, die als regulatorische posttranslationale Modifikation eine Feinregulierung vielfältiger zellulärer Funktionen erlaubt.

## Abstract

The biogenic monoamines serotonin (5-HT), histamine (HA), dopamine (DA) and norepinephrine (NE) act as neurotransmitters and hormones in controlling crucial functions of the mammalian organism. A recently discovered posttranslational modification (serotonylation) involves the covalent binding of 5-HT to protein-bound glutamine (Q) residues of small G proteins. This reaction, catalysed by the enzyme family of transglutaminases (TGM), results in a change in the G protein's GTP hydrolysis activity.

In the attempt to clarify whether this phenomenon is restricted to 5-HT, the four monoamines 5-HT, HA, DA and NE were investigated both *in vitro* and in cell culture. Eight small and two heterotrimeric GTPases, as well as phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), were analysed in combination with TGM1, 2, 3 and fXIIIa as well as four monoamines revealing that the TGM-dependent incorporation of monoamines (monoaminylation) is a specific reaction. HA incorporation (histaminylation) proved to be most prominent, followed by DA, NE and 5-HT. Histaminylation of small and heterotrimeric GTPases results in a functional change, shown using GTP hydrolysis experiments and effector binding studies. As a result of the diminished intrinsic and GAP-mediated hydrolysis, G $\alpha_{o1}$  and Cdc42 become constitutively activated and remain in the active, GTP-bound state. This then leads to an increased affinity to the binding partners RGS4 and Pak3. PLA<sub>2</sub> histaminylation in contrast results in a significantly elevated lysoytic activity.

The fact that the catalytic centres of most GTPases contain a conserved Q residue suggested that the residue is specifically modified by monoaminylation. Using a mass spectrometry approach, this hypothesis could be substantiated as fragment ion spectra of G $\alpha_{o1}$ , G $\alpha_q$  and Rab18 revealed the modified catalytic Q residue. Histaminylation can therefore be regarded as a novel TGM-dependent regulatory posttranslational modification of signalling proteins.

Furthermore, eight cell lines of different origin were characterized in respect of the expression of four monoamine transporters and seven TGM, and monoamine uptake as well as protein incorporation were measured. The assessment of TGM dependence was possible using the competitive inhibitor cysteamine. The results suggest that monoaminylation occurs in most cell lines in varying amount. Dopaminylation was most pronounced, but NE, HA and 5-HT incorporation was also detectable. According to these findings, monoaminylation is taking place in many different cell types.

In order to identify signal transduction pathways regulated by this modification, PC12 and 3T3-L1 cells were challenged with the DA derivative DA-biotin, which was developed in the course of this thesis, or the commercial 5-(biotinamido)pentylamine. In both cases, covalently modified proteins were isolated and identified by mass spectrometry, revealing that a multitude of proteins are monoaminylation substrates. Among them are proteins involved in protein biosynthesis and folding, glycolysis, fatty acid metabolism, signal transduction and mitochondrial function. Of the potentially modified proteins, Rab1b, NPM1 and AnxA2 were analysed in detail verifying the monoaminylation of NPM1 and Rab1b in PC12 cells.

With the help of the results presented here, a detailed analysis of protein monoaminylation as a novel posttranslational modification capable of fine-tuning multifarious cellular functions is now possible.

## E Danksagung

Dr. Diego J. Walther, dem Betreuer dieser Arbeit, möchte ich zunächst von ganzem Herzen für die Gelegenheit danken, eine Dissertation in seinem Labor anfertigen zu dürfen. Seinem fachlichen und freundschaftlichen Rat, seiner Erfahrung und Vision, aber auch seiner Toleranz ist das Gelingen dieser Arbeit geschuldet.

Prof. Constanze Scharff als Gutachterin möchte ich sehr herzlich für die Bereitschaft danken, diese Arbeit zu betreuen.

Prof. Petra Knaus, die als Zweitgutachterin diese Arbeit betreut hat, möchte ich für die Begutachtung und insbesondere für die Möglichkeit danken, Zwischenergebnisse in regelmäßigen Seminaren vorstellen zu können.

Markus Ralser danke ich für die fruchtbare und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Neurochemie möchte ich für die produktive und dennoch entspannte Arbeitsatmosphäre danken. Nils, Maik und Jens danke ich im Besonderen für die vielen arbeitsreichen Spätnachmittage, die mir wichtige Lektionen in der Kunst des Lebens vermittelt haben. Dank gebührt außerdem allen Praktikanten und Diplomanten, ohne deren tatkräftige Hilfe ein großer Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meine Familie hat mein Studium und insbesondere diese Arbeit in einer Weise unterstützt, die unvergleichlich ist. Auf jeder Ebene hat sie dafür gesorgt, dass ich zu keinem Zeitpunkt alleine war. Dafür möchte ich meinen Eltern und besonders meinem Onkel Christoph von Herzen danken.

Diese Arbeit ist der Abschluss eines Lebensabschnitts, an dessen Anfang Susanne stand. Ohne ihre Liebe, Hingabe, Vertrauen und Fürsorge wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Den Abschluss dieser Arbeit markiert die Geburt unserer Tochter Johanna, der ich diese Arbeit widme.

## **F Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## G Publikationen

### Zeitschriftenartikel

- WALTHER, D.J., PETER, J.-U., WINTER, S., HÖLTJE, M., PAULMANN, N., GROHMANN, M., **VOWINCKEL, J.**, ALAMO-BETHENCOURT, V., WILHELM, C.S., AHNERT-HILGER, G. und BADER, M. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115: 851-862.
- PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOIGT, J.-P., BERT, B., HENSCHEN, S., **VOWINCKEL, J.**, WALTHER, M., PETER, J.-U., BADER, M., RUPNIK, M., FINK, H. und WALTHER, D.J. (2009). Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic  $\beta$ -Cells by Protein Serotonylation. *PLoS Biol* 7, e1000229.
- GROHMANN, M., PAULMANN, N., **VOWINCKEL, J.** und WALTHER, D.J. (2009). A mammalianized synthetic nitroreductase gene for high-level expression. *BMC Cancer* 9, 301.
- VOWINCKEL, J.**, STAHLBERG, S., PAULMANN, N., BLUEMLEIN, K., GROHMANN, M., RALSER, M. und WALTHER, D.J. (2010). Regulation of G protein activity by transglutaminase-catalyzed histaminylation. *Nature Chemical Biology*, submitted

### Kurzmitteilungen

- ANTONENKO Y.N., BORISENKO V., **VOWINCKEL J.**, GASSER C.F., WOOLLEY A.G., POHL P. (2005). Fluorescence correlation spectroscopy reveals clustering of Cy3-labeled negatively-charged gramicidin channels by polylysine. *Biophys. J.* 88, 251.
- GASSER C, **VOWINCKEL J**, ANTONENKO Y AND POHL P. (2005). Fluorescence correlation spectroscopy reveals clustering of Cy3-labelled negatively-charged gramicidin channels by polylysine. *VII. Annual Linz Winter Workshop, Linz, Austria.*
- VOWINCKEL J**, PAULMANN N, GROHMANN M AND WALTHER DJ. (2005). Activating Monoaminylation of G Proteins. *Proceedings of the annual fall meeting, German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), Berlin/Potsdam, Germany.* doi: 10.1240/sav\_gbm\_2005\_h\_001181
- WALTHER, D. J., **VOWINCKEL, J.**, WALTHER, M., GROHMANN, M., PETER, J.-U. und PAULMANN, N. (2006). The biochemical basis of monoaminylation in platelets. *Hämostaseologie*, 26: A16.

## H Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie, diese Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen in Anspruch genommen zu haben. Alle Experimente und Analysen wurden von mir eigenständig durchgeführt, mit Ausnahme der massenspektrometrischen Protein-Identifizierung (in Zusammenarbeit mit Joachim Klose, Charité, Universitätsmedizin Berlin) und der QTRAP-Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit Markus Ralser, MPIMG, Berlin). Einzelexperimente der *in vitro*-Charakterisierung der Monoaminylierung kleiner GTPasen wurden im Rahmen von durch mich betreuten Diplomarbeiten durchgeführt. Im Falle einer Ablehnung werde ich meine Dissertation nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden.

Jakob Vowinckel

Berlin, Dezember 2010

## I Abkürzungen

A-PC	1-stearoyl-2-[1- <sup>14</sup> C]arachidonyl-L-3-Phosphatidylcholin
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
AC	<i>adenylyl cyclase</i> , Adenylylzyklase
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADHD	<i>attention deficit/hyperactivity disorder</i> , Aufmerksamkeits-/Hyperaktivitätsstörung
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ANSC	<i>adult neuronal stem cells</i> , adulte neuronale Stammzellen
Anx	Annexin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPA	5-(Biotinamido)-pentylamin
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BIS	N,N'-Methyl-bisacrylamid
BMMC	<i>bone marrow derived mast cells</i> , aus dem Knochenmark gewonnene Mastzellen
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	<i>cyclic AMP</i> , zyklisches AMP
Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>	Intrazelluläres Ca <sup>2+</sup>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CE	<i>cornified cell envelope</i> , Verhornte Zellhülle
CNF	<i>cytotoxic necrotizing factor</i> , Zytotoxischer Nekrotisierender Faktor
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CTA	Cystamin
CTEA	Cysteamin
DA	Dopamin
DA-biotin	Dopamin-LC-LC-Biotin
DA <sub>i</sub>	Intrazelluläres Dopamin
DAC	1,2-Diacylglycerol
DAO	Diamin-Oxidase
DAT	Dopamin-Transporter
DβH	Dopamin-β-Hydroxylase
DHPG	3,4-Dihydroxyphenylglykol
DMC	N,N-Dimethyl-Casein
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle</i> -Medium
DMT	Dimethyl-Tryptamin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
DNT	Dermonekrotisches Toxin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
dpm	<i>decays per minute</i> , radioaktive Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol, 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i> , verbesserte Chemolumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EF	Embryonale Fibroblasten
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Extraneuraler Monoamin-Transporter



ENT	Equilibrativer Nucleosid-Transporter
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , Fötales Rinderserum
Flx	Fluoxetin
fmoc	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-Succinimid
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
fXIIIa	Fibrin-stabilisierender Faktor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 ms <sup>-2</sup> )
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	<i>guanosin nucleotide exchange factor</i> , Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
GLUT4	Glukose-Transporter 4
GMP-PNP	Guanylyl-Imididiphosphat
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP•Gα	GTP-gebundene Gα-Untereinheit
H <sub>1C</sub>	Intrazellulärer Histamin-Rezeptor
HA	Histamin
HA <sub>i</sub>	Intrazelluläres Histamin
HAT	Histamin-Transporter
HDC	Histidin-Decarboxylase
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HIAL	5-Hydroxyindolacetaldehyd
HPA-SMC	Humane pulmonäre arterielle glatte Gefäßmuskelzellen
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HS	Pferdeserum
HSP	Hitzeschock-Protein
HTT	Huntingtin
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HT-biotin	Serotonin-LC-LC-Biotin
5-HT <sub>i</sub>	Intrazelluläres Serotonin
5-HTP	5-Hydroxy-Tryptophan
HVA	Homovanillinsäure
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LLnL	N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal
MAO	Monoamin-Oxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDC	Monodansylcadaverin
MDMA	3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin, <i>Ecstasy</i>
MHPG	3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol
MIDAS	<i>multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing</i>
MPP <sup>+</sup>	1-Methyl-4-Phenylpyridin
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>

MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NAD	Nicotinsäureamidadeninnucleotid
NE	Norepinephrin
NE-biotin	NE-LC-LC-Biotin
NE <sub>i</sub>	Intrazelluläres Norepinephrin
NET	Norepinephrin-Transporter
NO	Stickstoffmonoxid
NPM1	Nucleophosmin 1
OCT-3	<i>organic cation transporter 3</i> , Organische-Kationen-Transporter 3
OD	Optische Dichte
P-loop	<i>phosphate loop</i> , Phosphatschleife
PAH	Phenylalanin-Hydroxylase
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAI1BP	PAI-1-mRNA-Bindeprotein
PCA	<i>perchloric acid</i> , Perchlorsäure
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>Parkinson's disease</i> , Parkinson-Krankheit
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PH	Pulmonäre Hypertonie
PMAT	Plasmamembran-Monoamin-Transporter
PNS	Peripheres Nervensystem
PPH	Primäre pulmonäre Hypertonie
Q	Glutamin
R	Arginin
RGS	<i>regulator of G protein signaling</i> , Regulator der G-Protein-Signaltransduktion
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase</i> , Rho-abhängige Kinase
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natrium-Laurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERT	<i>serotonin reuptake transporter</i> , Serotonin-Transporter
SLC	<i>solute carrier</i> , Transporter gelöster Stoffe
SMC	<i>smooth muscle cells</i> , Glatte Muskelzellen
SNRI	<i>serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor</i> , Serotonin-Norepinephrin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SRI	<i>serotonin reuptake inhibitor</i> , Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SRP	<i>signal recognition particle</i> , Signalerkennungspartikel
SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i> , Selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor
SV	Sekretorisches Vesikel
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TGM	Transglutaminase
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
U	<i>unit</i> , enzymatische Einheit
(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
VMA	Vanillin-Mandelsäure
VMAT	Vesikulärer Monoamin-Transporter
VTA	<i>ventral tegmental area</i> , ventrales Tegmentum

---

WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
(w/v)	Verhältnis von Masse zu Volumen
<i>w</i> t	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem