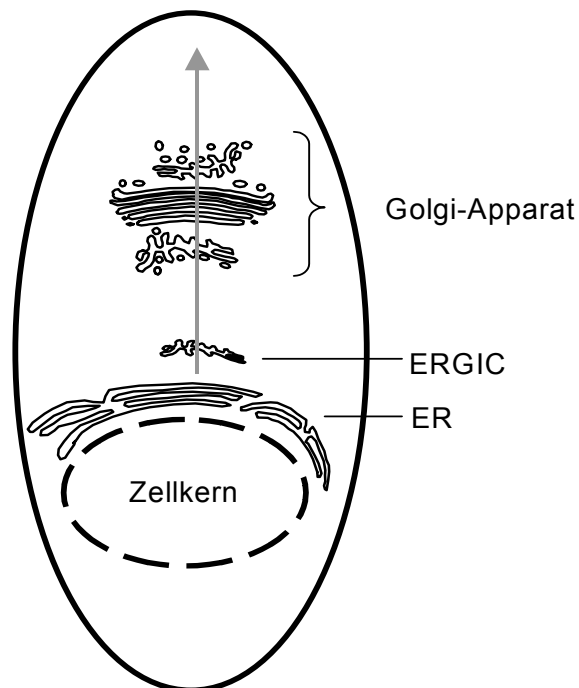


# 1 Einleitung

Die Ausbildung und Erhaltung der nativen Struktur von Proteinen wird in der Zelle durch ein Proteinqualitätskontrollsystem garantiert. Dieses befindet sich im endoplasmatischen Retikulum (ER), einem schlauchartigen Membransystem im Inneren jeder höheren Zelle, welches unter anderem für den Transport von integralen Membranproteinen zur Plasmamembran verantwortlich ist (Kleizen und Braakman, 2004). Der Transport von Membranproteinen beginnt mit ihrer Insertion in die ER-Membran, wobei sie zunächst in ungefalteter Form vom Zytoplasma aus kotranslational durch einen Kanal in das ER hineinsynthetisiert werden (Rapoport, 1992; Mothes *et al.*, 1997). In der ER-Membran werden die Proteine gefaltet, zusammengebaut und verpackt, um als biologisch aktive Moleküle an die Zelloberfläche verschickt werden zu können (Sitia und Braakman, 2003). Auf dem Weg zur Zelloberfläche müssen anschließend das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und Bereiche des Golgi-Apparates durchquert werden (Bild 1.1). Um falsch gefaltete und damit biologisch inaktive Moleküle auszusortieren, die andernfalls den Wirkort für intakte, aktive Moleküle blockieren und damit die Zelle schädigen würden, muss das ER ein Qualitätskontrollsystem besitzen, mit dessen Hilfe falsch gefaltete Moleküle erkannt, aussortiert und vernichtet werden können. Dieser Mechanismus wird als ERAD (ER associated degradation) bezeichnet (Brodsky und McCracken, 1999; Sommer und Wolf, 1997). Das Qualitätskontrollsystem im ER wird hauptsächlich von einer Maschinerie von Proteinen, den sogenannten „molekularen Chaperonen“ gewährleistet (Ellgaard *et al.*, 1999).



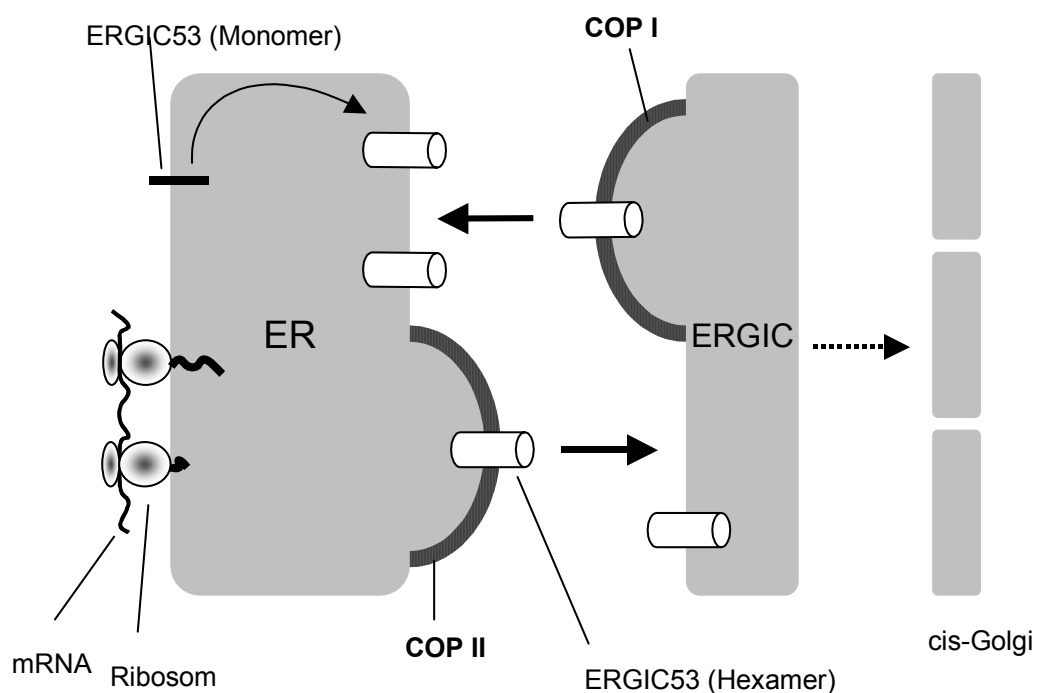
**Bild 1.1: Schematische Übersicht über die am anterograden Transport von Membranproteinen beteiligten Kompartimente**

Im endoplasmatischen Retikulum (ER) und seiner Membran befinden sich molekulare Chaperone, welche auch im ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) aktiv sind.

## 1.1 Die Bedeutung des „ERGIC“ für die zelluläre Qualitätskontrolle

Erst seit wenigen Jahren zeichnet sich ab, dass neben dem ER auch das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) eine Qualitätskontrollfunktion besitzen könnte (Nichols *et al.*, 1998). Das Initialwort ERGIC beschreibt ein Zellorganell, welches sich zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat befindet. Aufgrund der teils vesikulären, teils tubulären Morphologie dieses Kompartiments wird es auch als „VTCs“ (vesicular tubular clusters) bezeichnet. Außerdem besitzt es eine eigenständige Proteinzusammensetzung, die es klar von ER oder Golgi-Apparat abgrenzt (Schweizer *et al.*, 1991). Zunächst wurde dem ERGIC nur eine „Cargo“- , also Transport- und Sortierungsfunktion für sekretorische und Membranproteine zugeschrieben. Das wichtigste Markerprotein für dieses Kompartiment ist ERGIC 53, welches als mannosespezifisches Lektin funktioniert und somit Glykanreste an sekretorischen Proteinen erkennt und bindet (Moussalli *et al.*, 1999). Dieses Membranprotein wird am

endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zu einem Hexamer zusammengesetzt. Das Monomer besteht zum größten Teil aus einem luminalen N-Terminus, einer transmembranären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen C-Terminus. Aufgrund des hier lokalisierten „KKFF“- Sequenzmotifs der letzten vier Aminosäuren wird ERGIC 53 in Vesikeln, die mit dem COP II-Proteinkomplex umhüllt sind, zum ERGIC transportiert (Bild 1.2). Das Protein wird von dort aus retrograd über COP I-umhüllte Vesikel ins ER zurückbefördert; es bewegt sich also pendelnd zwischen dem ER und ERGIC hin und her (Hauri *et al.*, 2000; Klumperman, 2000).



**Bild 1.2: Lokalisation des ERGIC-Markerproteins ERGIC 53**

ERGIC 53 wird an der Membran des ER synthetisiert und anschließend zu einem funktionellen Hexamer zusammengebaut. Dieses gelangt anterograd durch die Assoziation mit den Proteinkomponenten des COP II-Komplexes ins ERGIC und wird von dort aus retrograd über COP I-umhüllte Vesikel zum ER zurücktransportiert.

Bisherige Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass einige fehlgefaltete Membranproteine ausschließlich im ER retiniert werden, während andere bis ins ERGIC gelangen, und erst dort als fehlgefaltet erkannt werden (Gilbert *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2001). Somit scheint diesem Kompartiment eine Rolle als zweite Sicherheitsbarriere in der zellulären Qualitätskontrolle zuzukommen (Vashist *et al.*, 2001).

## 1.2 Der frühe sekretorische Transportweg und seine Bedeutung bei Erbkrankheiten

Die Erforschung der Ursachen von Erbkrankheiten hat in den beiden letzten Jahrzehnten in vielen Beispielen gezeigt, dass Mutationen in den Genen von Membranproteinen zu ihrer Retention im frühen sekretorischen Transportweg führen können (Aridor und Hannan, 2000; Schüle, 2004). Eine Auswahl dieser Erkrankungen ist in Tabelle 1.1. aufgeführt.

**Tabelle 1.1:** Charakteristika einiger auf mutierten Membranproteinen basierender Erbkrankheiten

<b>Krankheit (Referenz)</b>	<b>Betroffenes Gen / Protein</b>	<b>Klinische Manifestation / Symptome</b>
Zystische Fibrose	CFTR (ATP-gesteuerter Chlorid-Ionenkanal)	Lungenkrankheit, sekundäre Pankreasinsuffizienz, Leberfibrose; Verlust der Chloridsekretion in CFTR-exprimierenden Epithelien
Diabetes insipidus renalis	Vasopressin-V2-Rezeptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor)	Polyurie, Polydipsie, Asthenurie; Verlust der Wasserrückresorption in der Niere
Familiäre Hypercholesterolämie	LDL-Rezeptor	Zu hoher Plasmacholesterolspiegel, Thrombose- und Emboliegefahr
Retinitis pigmentosa	Rhodopsin (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)	Sehschwäche, Erblindung, Arrhythmien; Mutationen im GPCR Rhodopsin, Retinadegradation
Langes QT-Syndrom	Ether-a-go-go-verwandtes Protein (Untereinheit eines Kaliumkanals)	Plötzlicher Herztod (meistens vor der Pubertät); Verlängerte QT-Intervalle im EKG

In den meisten Fällen ist das Qualitätskontrollsystem zweckmäßig und hält nur fehlgefaltete und damit funktionslose Membranproteine im Inneren der Zelle zurück. Im Falle der Zystischen Fibrose als die bei der kaukasischen Großrasse verbreitetste Erbkrankheit konnte

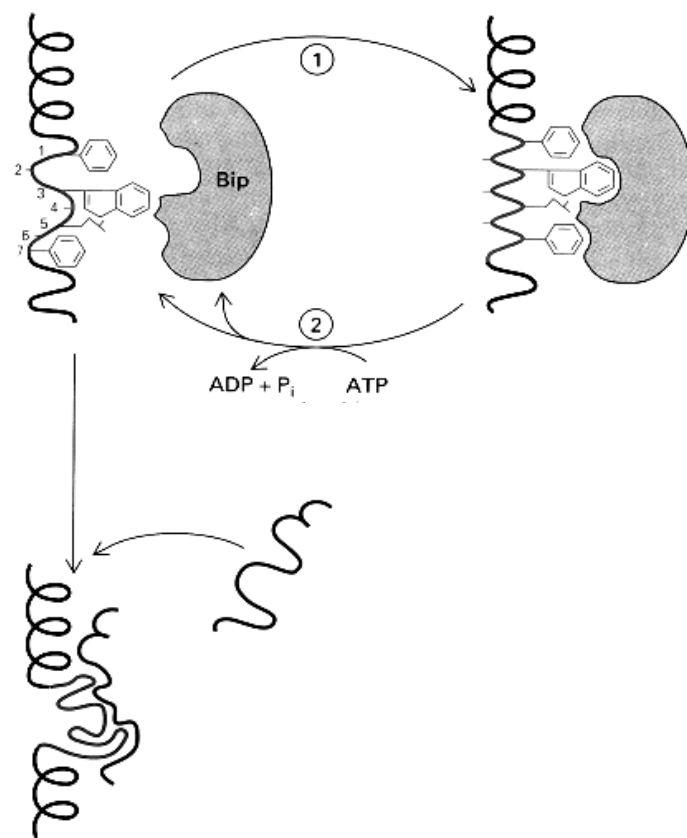
jedoch gezeigt werden, dass die am häufigsten vorkommende Mutante des CFTR-Proteins ( $\Delta F508$ ) noch eine Restfunktion besitzt und in nativen ER-Membranen aktivierbar ist (Pasyk und Foskett, 1995). Daher besteht in der molekularen Pharmakologie ein Interesse an der Entwicklung potentieller Pharmaka, die entweder durch Faltungskorrektur der jeweiligen Membranproteine („pharmakologische Chaperone“) oder durch Verdrängung molekularer Chaperone aus der Bindung an die Membranproteine ihren Transport an die Zelloberfläche wiederherstellen und folglich die Symptomatik dieser Erbkrankheiten lindern können (Morello *et al.*, 2000a; Gelman und Kopito, 2002; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004).

### 1.3 Die Eigenschaften molekularer Chaperone

Molekulare Chaperone unterstützen die Faltung von Proteinen. Dieser Begriff wurde ursprünglich zur Beschreibung der Rolle des Zellkernproteins Nukleoplasmin bei der Zusammensetzung von Nukleosomen eingeführt (Laskey *et al.*, 1978). Inzwischen werden als molekulare Chaperone allgemein Proteine definiert, die vorübergehend an andere Proteine binden und dabei eine instabile Konformation dieser Polypeptide stabilisieren. Durch wiederholtes Binden und anschließendes Freisetzen ermöglichen sie diesem anderen Protein seine native Struktur *in vivo* zu erreichen (Hendrick und Hartl, 1993; Bukau und Horwich, 1998). Durch die enorme Diversität der molekularen Chaperone bei höheren Lebewesen wurde eine Systematik entwickelt, die folgende Einteilung erlaubt:

- lektinartige Chaperone: Calnexin/Calreticulin (Cnx/Crt) für Glykoproteine (Parodi, 2000)
- „klassische Chaperone: z.B. Endoplasmin/GRP90 und ER-residente DnaJ ähnliche Proteine 1-5 (Erdj1-Erdj5) (Brunati *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2004)
- Hitzeschock-Proteine: Hsp- und Hsc-Chaperone, z.B. Bip (GRP78) (Flynn *et al.*, 1989)

Neben der unterstützenden Funktion bei der Proteinfaltung haben molekulare Chaperone eine zusätzliche Qualitätskontrollfunktion, die eng mit der ersten verbunden ist: Ein Protein, welches sich z.B. aufgrund einer Mutation auch nicht mit Hilfe der Chaperone in die native Konformation falten kann, wird von diesen verlängert gebunden (Morello *et al.*, 2001; Dimcheff *et al.*, 2004) und ist schließlich nicht mehr im Stande, das ER zu verlassen. Das retinierte Protein wird dann aus dem ER ins Zytoplasma zurücktransloziert und über den ERAD-Weg abgebaut (Ahner und Brodsky, 2004).



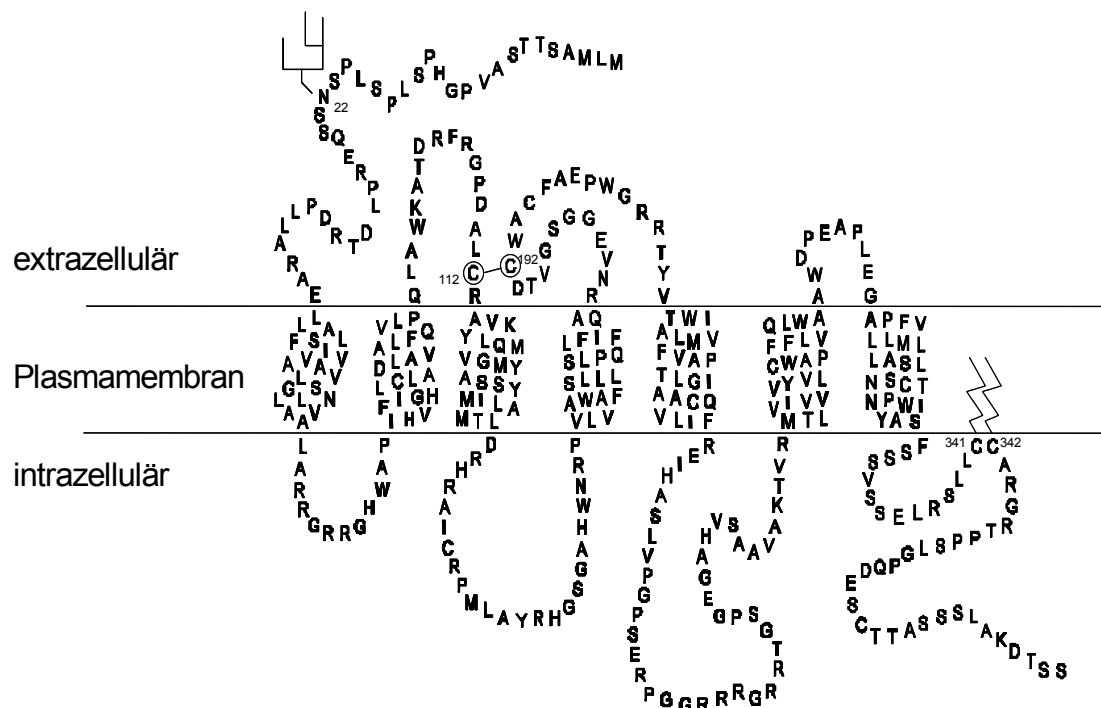
**Bild 1.3: Mechanismus der chaperonvermittelten Proteinfaltung am Beispiel von BiP (GRP78)**

Das molekulare Chaperon bindet an die Seitenketten hydrophober Aminosäuren der naszierenden Polypeptidkette (1). Abschnitte mit der höchsten Affinität für BiP sind Heptapeptide mit alternierenden hydrophoben Aminosäuren. Das Chaperon wird nach der Faltungsvermittlung durch ATP-Hydrolyse wieder freigesetzt (2), um dann erneut binden zu können. Kann das Protein seine native Struktur nicht erlangen, z.B. aufgrund von Mutationen, neigen exponierte hydrophobe Bereiche zur Aggregation. (Grafik entnommen aus: Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell; Molekulare Zellbiologie; 2. Auflage; Berlin, New York: de Gruyter, 1996)

## 1.4 Der Vasopressin-V2-Rezeptor (V2R)

Mutationen im Gen des V2R führen zum nephrogenen Diabetes insipidus (NDI), einer Erbkrankheit, bei der die Wasserrückresorption in der Niere gestört ist. Die ausschließlich X-chromosomal vererbten Mutationen führen zu Veränderungen der Primärstruktur des Rezeptors, die von den oben genannten Qualitätskontrollkomponenten erkannt werden (Knoers und Deen, 2001). Die meisten bislang sequenzierten V2-Rezeptormutanten wurden als transportdefekt identifiziert (Oksche und Rosenthal, 1998).

Der Vasopressin-Rezeptor vom Subtyp 2 (V2R) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Gether, 2000). Er besteht aus 371 Aminosäuren und weist wie alle anderen GPCR einen extrazellulären N-Terminus, 7 transmembranäre Domänen und einen intrazellulären C-Terminus auf (Bild 1.4). In seiner vollständig gereiften, d.h. posttranslational modifizierten Form weist er eine N-Glykosylierung am Asparagin 22, eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen 112 und 192 und zwei zusätzliche Membranverankerungen an den benachbarten Cysteinresten 341 und 342 durch hydrophobe Palmitinsäurereste auf („Palmitoylierung“) (Schülein *et al.*, 1996; Schülein *et al.*, 2000). Einige NDI-verursachende Mutationen im V2R, die zu Transportdefekten führen und in dieser Arbeit untersucht wurden, sind im Ergebnisteil in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Aufgrund der Vielzahl und Diversität dieser Mutationen stellt der Rezeptor ein gutes Modell dar, um den intrazellulären Transport G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu studieren.



**Bild 1.4: Zweidimensionales Modell des Vasopressin-V2-Rezeptors**

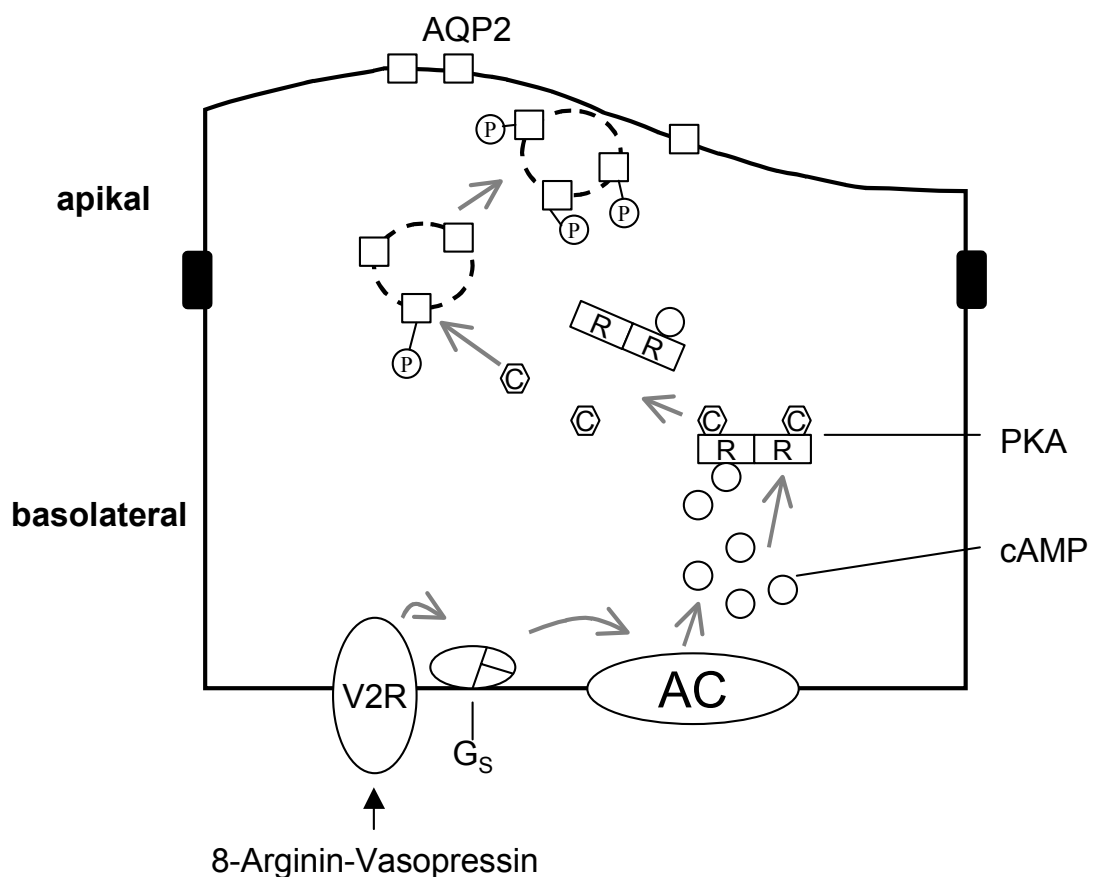
Die 371 Aminosäuren des G-Protein-gekoppelten Rezeptors sind im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 112 und 192, Palmitoylierungen der Cysteine 341 und 342 und die N-Glykosylierung am Asparagin 12 sind gekennzeichnet.

### 1.4.1 Physiologische Bedeutung des V2R

Der V2R hat eine essentielle Funktion bei der renalen Wasserrückresorption (Rosenthal *et al.*, 1992). Er wird in den Hauptzellen der Sammelrohre exprimiert, die sich im inneren Mark der Niere befinden. Der V2R wird in der basolateralen Membran der polaren Epithelzellen exprimiert. Aktiviert wird der Rezeptor durch das in der Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) gebildete und über den Blutweg das Interstitium der Niere erreichende Nonapeptid Vasopressin (antidiuretisches Hormon, ADH). Nach Bindung des Hormons wird durch Rekrutierung, Konformationsänderung und Dissoziation eines stimulatorischen, heterotrimeren G-Proteins ( $G_s$ ) die membranständige Adenylatzyklase aktiviert, die die intrazelluläre Konzentration des „second Messengers“ zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöht. Dieser Stimulus führt zur Dissoziation der regulatorischen von der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), welche unter



Nutzung eines Protein A-Kinase-Ankerproteins (AKAP) (Klussmann *et al.*, 1999) nun Aquaporin 2-Wasserkanäle (AQP2), die sich an exozytotischen Vesikeln befinden, phosphorylieren kann. Diese Vesikel fusionieren daraufhin mit der apikalen Zellmembran, wodurch Wasser mit hoher Geschwindigkeit aus dem Primärharn in die Zellen gelangen und ins Interstitium bzw. Plasma rückresorbiert werden kann (Bild 1.5) (Klussmann *et al.*, 2000). Kommt es aufgrund von Transportdefekten zur totalen oder partiellen Abwesenheit von V2R oder AQP2 an der Plasmamembran, zeigen sich typische Symptome des nephrogenen Diabetes insipidus (NDI, *Diabetes insipidus renalis*; Oksche und Rosenthal, 2001).



**Bild 1.5: Intrazelluläre Signalkaskade der Vasopressin-vermittelten Wasserrückresorption in Hauptzellen des Sammelrohres im Bereich des inneren Markes der Niere**

G<sub>S</sub>: stimulatorisches heterotrimeres G-Protein; AC: Adenylatzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A; C: katalytische Untereinheiten der PKA; R: regulatorische Untereinheiten der PKA; AQP2: Aquaporin 2; P: Phosphorylierung.

### **1.4.2 Häufigkeit und Klinik des nephrogenen Diabetes insipidus (NDI)**

Der X-chromosomal-rezessiv vererbte NDI tritt bei Menschen der kaukasischen Großrasse mit einer Inzidenz von ca. 1:110.000 auf. Die Erkrankung weist eine hohe Diversität an natürlichen Mutationen auf. Mutationen im Wasserkanal AQP2 können auch zu dieser Krankheit führen, in der Hauptsache sind jedoch mutierte V2-Rezeptoren die Ursache. Über 60 verschiedene Mutationen im V2R führen zu transportdefekten Rezeptoren (Morello und Bichet, 2001). In erster Linie ist der NDI durch eine schwere Störung der Wasserhomöostase gekennzeichnet, wobei große Mengen eines hypotonen Urins ausgeschieden werden, die z.T. 50 ml/kg Körpergewicht pro Tag übersteigen. Eine Trias aus Polyurie (erhöhtes Harnvolumen), Polydipsie (übersteigertes Durstgefühl) und Asthenurie (verringerte Harnkonzentrationsfähigkeit) mit unterschiedlicher Ausprägung sind dabei typische Symptome (Bichet, 1998). Bei Säuglingen und kleinen Kindern sind meistens wiederkehrendes Fieber, Erbrechen, Trinkschwäche und Störungen der körperlichen und geistigen Entwicklung diagnostizierbar.

### **1.5 Pharmakologische Strategien für die Wiederherstellung des Transports fehlgefalteter Membranproteine**

Da bei vielen Erbkrankheiten fehlgefaltete und transportdefekte Membranproteine eine bedeutende Rolle spielen, wurden in der Vergangenheit mit verschiedenen Ansätzen versucht, die Translokation der Proteine an die Plasmamembran wiederherzustellen („Rescue“). Dabei wurden für fehlgefaltete und funktionslose Proteine auf der einen Seite und fehlgefaltete Proteine mit Restfunktion auf der anderen Seite unterschiedliche Strategien gewählt, wobei alle Ansätze bisher nur *in vitro* erfolgreich waren. Im ersten Fall kamen Substanzen zum Einsatz, die Liganden dieser Proteine darstellen („pharmakologische Chaperone“). Bei fehlgefalteten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden bislang membrangängige Antagonisten (Morello *et al.*, 2000b; Welch und Howard, 2000) eingesetzt, seltener dagegen Agonisten (Brismar *et al.*, 1998). Man geht davon aus, dass die Aktivität dieser Substanzen darauf zurückzuführen ist, dass bei verschiedenen möglichen Proteinkonformationen der funktionelle und damit energieärmste Faltungszustand durch die Bindung dieser Pharmaka stabilisiert wird (Bernier *et al.*, 2004). Durch die Faltungskorrektur kann ein funktionelles Protein entstehen, welches vom Qualitätskontrollsystem nicht mehr erkannt und im

Zellinneren nicht mehr retiniert wird (Welch und Brown, 1996). Als Vorteil dieser Substanzen sind die pharmakologische Spezifität und die sich dadurch ergebende geringe therapeutische Konzentration zu nennen; offensichtliche Nachteile sind der unvollständige „Rescue“ und die schwierige Entfernung stark gebundener Antagonisten, die häufig die Stimulation der Rezeptoren mit Agonisten blockieren (Wüller *et al.*, 2004).

Für den „Rescue“ von Proteinen der zweiten Gruppe, deren prominentester Vertreter die sehr häufig auftretende Mutation  $\Delta F508$  des CFTR-Chloridkanals ist (Kerem und Kerem, 1996), erscheint es dagegen eher sinnvoll, Qualitätskontrollkomponenten zu hemmen, da diese Proteine noch über Restfunktion verfügen und die Qualitätskontrolle in diesen Fällen überprotektiv zu sein scheint (Pasyk und Foskett, 1995). Hemmstoffe von Qualitätskontrollkomponenten wurden bisher kaum erforscht. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob zellpenetrierende Peptide die an der Retention einiger V2R-Mutanten beteiligten Qualitätskontrollkomponenten hemmen können. In früheren Experimenten wurden diese Peptide als Schleppersubstanzen für das Tetrapeptid KDEL eingesetzt, um mit den V2-Rezeptormutanten assoziierte molekulare Chaperone vom KDEL-Rezeptor zu verdrängen. Der KDEL-Rezeptor ist ein zwischen dem ERGIC-Kompartiment und ER pendelnder Rezeptor, der für die Homöostase von im ER residenten Proteinen verantwortlich ist (Pelham, 1990; Townsley *et al.*, 1993). Als Liganden für diesen Rezeptor sind molekulare Chaperone mit C-terminalem KDEL-Motiv beschrieben (Lewis und Pelham, 1990). Es stellte sich dabei als Zufallsbefund während der Untersuchungen heraus, dass die zellpenetrierenden Peptide selbst den Transport einer V2-Rezeptormutante (Y205C) zur Plasmamembran wiederherstellen konnten.

## 1.6 Zellpenetrierende Peptide

Zellpenetrierende Peptide („CPPs“) wurden als Oligopeptide beschrieben, die sich in einem anscheinend energieunabhängigen Prozess selbst über Membranen diverser Zelllinien translozieren können. Sie vermögen dabei angekoppelte Moleküle mitzutransportieren, deren Molmasse hundertfach größer ist als die eigene (Temsamani und Vidal, 2004), was sie für einen Einsatz als Schlepermoleküle interessant gemacht hat (Lundberg und Langel, 2003).

### 1.6.1 Herkunft und Klassierung

Zellpenetrierende Peptide (CPP) sind sowohl von natürlichen Aminosäuresequenzen abgeleitet als auch synthetischer Herkunft, und weisen eine Länge von etwa 10 bis 30 Aminosäuren auf. Von natürlichen Sequenzen abgeleitete Peptide werden auch als „protein transduction domains“ (PTDs) bezeichnet. Die Hauptvertreter von natürlichen Sequenzen abgeleiteter CPPs sind Penetratin und Tat; sie stellen üblicherweise basische Abschnitte nukleinsäurebindender Proteine dar. Penetratin, bestehend aus 16 Aminosäuren, stellt die dritte Helix des Antennapedia-Homeoproteins aus der Fliegenart *Drosophila melanogaster* dar (Lindgren *et al.*, 2000). Die Helix bildet den translozierenden Abschnitt des Transkriptionsfaktors. Dagegen wurden die Prototypen der synthetischen CPP wie Transportan oder KLAL als streng amphipathische Peptide mit einer räumlich polarisierten Ladungsverteilung entworfen, geht man von einer helikalen Sekundärstruktur als aktive Komponente aus (Oehlke *et al.*, 1998; Pooga *et al.*, 1998; Scheller *et al.*, 1999).

**Tabelle 1.2:** Bezeichnung, Herkunft und Sequenz einer Auswahl zellpenetrierender Peptide (aus Trehin und Merkle, 2004).

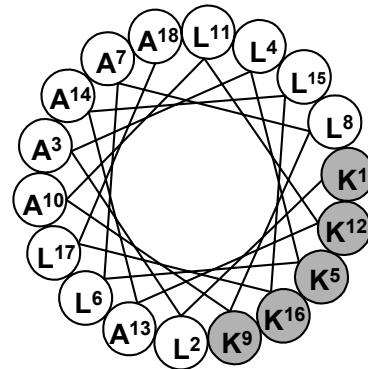
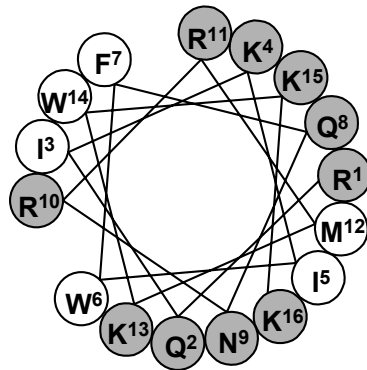
Name	Herkunft	Sequenz
Tat	natürlich	RKKRRQRRR
Penetratin	natürlich	RQIKIWFQNRRMKWKK
K-FGF Peptid	natürlich	AAVALLPAVLLALLAP
hCT Peptid	natürlich	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP
Oligoarginin	synthetisch	RRRRRRR
Transportan	synthetisch	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
KLAL	synthetisch	KLALKLALKALKKAALKLA

### 1.6.2 Physikochemische Eigenschaften

Zur physikochemischen Charakterisierung zellpenetrierender Peptide zieht man bestimmte Kennzahlen wie Hydrophobizität oder hydrophobes Moment heran, die es möglich machen, Peptide mit sehr unterschiedlichen Primärstrukturen vergleichend zu betrachten (Bild 1.6). Die zugrundeliegenden Kennzahlen für jede Aminosäure sind der Skala nach Eisenberg zu entnehmen (Eisenberg, 1984); die Natur der helikalen Eigenschaften wird idealerweise durch Zirkulardichroismus, d.h. durch Messung der optischen Drehung in Abhängigkeit von der Wellenlänge bestimmt (Scheller *et al.*, 1999). Die physikochemischen Eigenschaften der Peptide sind maßgebliche Ursache für deren Verhalten (Transport & Funktion) im zellulären Umfeld. Der Grad der Strukturierung ist dabei oft vom umgebenden Milieu abhängig: Penetratin ist z.B. in Wasser nur sehr schwach strukturiert, während es in einer hydrophoben Umgebung zur Bildung einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur neigt (Derossi *et al.*, 1994). In bisherigen Studien wurde fast ausschließlich die potentielle Nutzung der Peptide als Schleppersubstanzen für Pharmaka mit größeren Molekülmassen ausgewertet, die intrazellulär einen pharmakologischen Effekt auslösen, wie z.B. Antisense-Oligonukleotide oder Signaltransduktionsproteine. Darüber hinaus ist es aufgrund einiger Nachteile in Toxizität und Metabolismus bislang noch zu keinem klinischen Einsatz gekommen. Die Primärstruktur, eine helikale Projektion und die oben beschriebenen Kennzahlen der in dieser Arbeit eingesetzten Peptide Penetratin und KLAL sind in Bild 1.6 dargestellt. Obwohl auffällt, dass die Aminosäuresequenzen sehr unterschiedlich sind, lassen die Kennzahlen auf ähnliche physikochemische Eigenschaften schließen.

Penetratin (16 AS):  
RQIKIWFQNRRMKWKK

“KLAL“ (18 AS):  
KLALKLALKALKKAALKLA



H	-0,4822	- 0,0161
$\mu$	0,1652	0,3339
$\Phi$ [°]	280	80

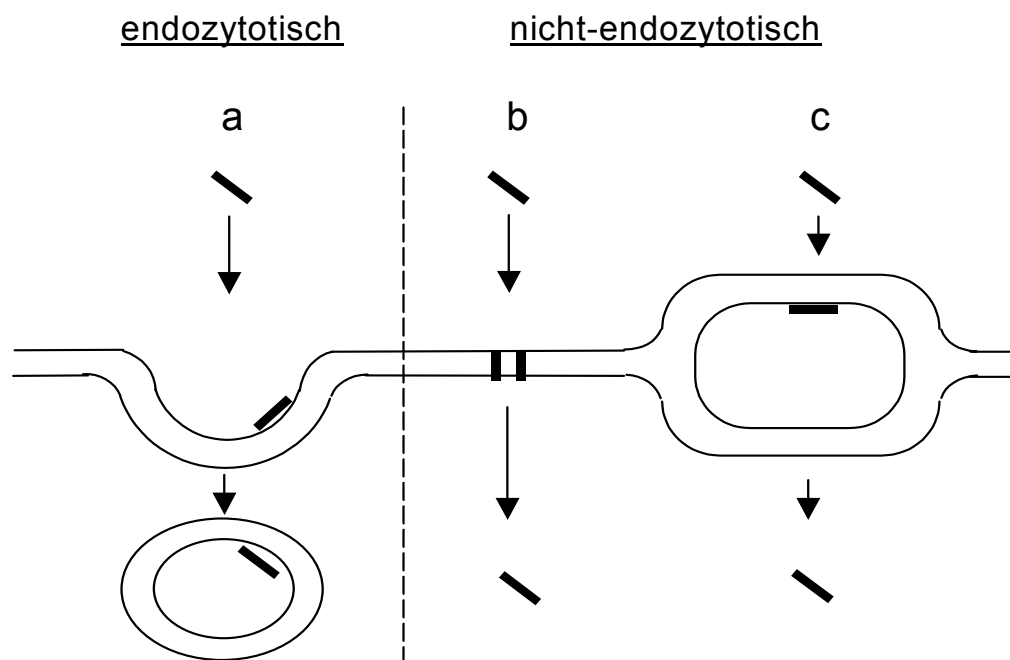
**Bild 1.6: Aminosäuresequenz, helikale Projektion und Kennzahlen von Penetratin und KLAL**

Unter Annahme einer idealen Helix wurden diese Sekundärstrukturen durch CD-Messungen (Zirkulardichroismus) erhalten (Scheller *et al.*, 1999). Die positiv geladenen, hydrophilen Aminosäuren sind grau hinterlegt. KLAL weist eine streng amphipathische Helix auf, während bei Penetratin die Aminosäuren heterogenerer Natur und auf verschiedenen Seiten der Helix angeordnet sind. Physikochemische Kennzahlen nach Eisenberg (1984): H: Hydrophobizität;  $\mu$ : hydrophobes Moment;  $\Phi$ [°]: Anteil der hydrophilen Seitenketten an der Gesamtoberfläche.

### 1.6.3 Interaktion mit Zellen

Allen zellpenetrierenden Peptiden gemeinsam ist mit Ausnahme von hydrophoben Peptiden wie K-FGF aus ER-Signalsequenzen (Lin *et al.*, 1995) die Anwesenheit von kationischen Aminosäuren. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die Affinität zur negativ geladenen Oberfläche von Zellmembranen (Christiaens *et al.*, 2004), führt aber auch dazu, dass intrazellulär ein großer Anteil der Peptide über eine Zeit von mehreren Stunden membrangebunden bleibt, und in dieser Form nach Endozytose vesikulär bis zum Golgi-Apparat transportiert wird (Drin *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004). Die Peptide werden aber

nicht ausschließlich endozytotisch aufgenommen: In mehreren Studien wurde beobachtet, dass sich die Peptide auch bei einer Temperatur von 4°C, bei der eine Endozytose ausgeschlossen ist, in diversen Zelllinien anreichern (Lindgren *et al.*, 2000; Scheller *et al.*, 2000). Diese Vorgänge haben den Begriff der Penetration geprägt sowie einem der hier untersuchten Peptide den Namen „Penetratin“ gegeben. Die bislang hauptsächlich diskutierten Internalisierungsmechanismen sind in Bild 1.7 skizziert. Neben der Endozytose (Bild 1.7 a) werden hauptsächlich zwei nicht-endozytotische Mechanismen diskutiert: Eine transiente Porenbildung in der Plasmamembran ab einer kritischen Konzentration (Bild 1.7 b) -analog antibiotisch aktiver Peptide- erscheint genauso möglich wie die vorübergehende Bildung einer invertierten Mizelle (Bild 1.7 c). Bei der Porenbildung ist somit der hydrophobe Anteil der Peptide dem inneren der Membran zugerichtet; beim Mizellenprinzip bleibt das Peptid über die gesamte Zeit nur mit der Membranoberfläche in Kontakt (Trehin und Merkle, 2004).



**Bild 1.7: Mögliche Internalisierungsmechanismen zellpenetrierender Peptide**

a) Aufnahme in die Zelle durch klassische Endozytose (Fischer *et al.*, 2004); b) transiente Porenbildung nach Membranpermeabilisierung (Gazit *et al.*, 1994); c) fehlende Membrantranslokation durch transiente Invagination in einer inversen Mizelle und Abgabe ins Zellinnere (Derossi *et al.*, 1996).

## 1.7 Zielsetzung

Bislang wurden bezüglich der intrazellulären Retention von bei Erbkrankheiten relevanten Membranproteinen neben dem ER keine weiteren Zellorganellen beschrieben. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob V2R-Mutanten auch im ERGIC retiniert werden. Einige Berichte wiesen bereits darauf hin, dass dem ERGIC neben dem ER eine Qualitätskontrollfunktion für Membranproteine zukommen könnte (Lotti *et al.*, 1996; Gilbert *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2001). Es sollte ferner anhand des V2R überprüft werden, ob sich verschiedene Mutationen des gleichen Membranproteins hinsichtlich ihrer Retentionsorte unterschiedlich verhalten, und welche Mechanismen der Retention zugrunde liegen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte dann untersucht werden, ob amphipatisch-helikale, zellpenetrierende Peptide den Transport von V2R-Mutanten an die Plasmamembran wiederherstellen können, bevor die hierfür verantwortlichen Prinzipien genauer beleuchtet wurden.