INHIBITION DER PROTEINBIOSYNTHESE VON G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN MIT HILFE DES ZYKLODEPSIPEPTIDS COTRANSIN

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Carolin Westendorf

Berlin, 21.09.2011

Diese Arbeit wurde vom 07.07.2008 bis 18.08.2011 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in der Abteilung Protein Trafficking in Berlin unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Ralf Schülein angefertigt.

Dissertation eingereicht: 22.09.2011

Tag der Disputation: 19.12.2011

Erstgutachter Priv.-Doz. Dr. Ralf Schülein

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Abteilung Protein Trafficking, Berlin

Zweitgutachter Prof. Dr. Michael Krauß

Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Berlin

FÜR LARISSA UND FLORIAN

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis		v	
Tabellenverzeichnis vii			vii
Ab	okürzu	ngsverzeichnis	viii
1	Einle	itung	1
	1.1	Der sekretorische Weg von Proteinen	1
		1.1.1 Translokation von Proteinen über und Insertion in die ER-	
		Membran	2
		1.1.2 Das Translokon und seine Aufgaben im sekretorischen Weg	4
	1.2	Möglichkeiten der Regulation der Expressionsstärke von Proteinen	5
		1.2.1 Nukleinsäurederivate als spezifische Inhibitoren der Protein-	
		biosynthese	6
		1.2.2 Inhibitoren des sekretorischen Weges	6
	1.3	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	12
		1.3.1 Struktur und Funktion von GPCR	12
		1.3.2 Aktivierung von GPCR	13
		1.3.3 Charakterisierung der in dieser Arbeit als Modell dienenden GPCR	15
2	Ziel d	lieser Arbeit	17
3	Mate	rialien	18
	3.1	Reagenzien und Chemikalien	18
	3.2	Enzyme	20
		3.2.1 DNA-modifizierende Enzyme	20
		3.2.2 Endoglykosidasen	20
	3.3	Marker	21
	3.4	Kits	21
	3.5	Verbrauchsmaterialien	21
	3.6	Antikörper	22
	3.7	Rekombinante Plasmide	22
	3.8	Geräte	23
	3.9	Software	24
	3.10	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	25
		3.10.1 Bakterien	25
		3.10.2 Eukaryotische Zelllinien	25

4	Meth	noden		27
	4.1 Molekularbiologische Methoden		27	
		4.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	27
		4.1.2	Plasmid-DNA Isolierung und Aufreinigung aus Agarose-Gelen	27
		4.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
		4.1.4	Restriktion von Plasmid-DNA	28
		4.1.5	Oligo-Klonierung	28
		4.1.6	Ligation von DNA-Molekülen	28
		4.1.7	Zielgerichtete Mutagenese	29
		4.1.8	Transformation von E. coli-Bakterien mit Plasmid-DNA .	31
		4.1.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA und Sequenzanalyse	32
		4.1.10	Quantitative <i>real-time</i> PCR	33
	4.2	Mikroł	biologische Methoden	34
		4.2.1	Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Stämmen	34
		4.2.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	35
	4.3	Zellbic	blogische Methoden	35
		4.3.1	Beschichtung von Deckgläsern und Platten mit Poly-L-Lysin	35
		4.3.2	Kultivierung der Zelllinien	36
		4.3.3	Transfektion von HEK293-Zellen	36
		4.3.4	AlamarBlue®-Zytotoxizitätsassay	37
	4.4	Durchf	flusszytometrie	37
4.5 Konfokale Fluores		Konfol	kale Fluoreszenzmikroskopie	38
	4.6	Protein	biochemische Methoden	38
		4.6.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .	38
		4.6.2	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	39
		4.6.3	Detektion von immobilisierten Proteinen auf Membranen	
			(Western-Blot)	39
		4.6.4	Immunpräzipitation	40
		4.6.5	Glykosidaseverdau von immunpräzipitierten GPCR	41
		4.6.6	Proteinbestimmung nach Bradford	41
		4.6.7	Zellfraktionierung	42
		4.6.8	Absorptionsspektroskopie	43
	4.7	Pharma	akologische Methoden	43
		4.7.1	[¹²⁵ I]ET-1-Bindungsassay	43
		4.7.2	Inositolphosphat-Akkumulationsassay	44
	4.8	Stabile	e Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in der Zellkultur und	
		anschli	ießende massenspektrometrische Expressionsanalyse	45
		4.8.1	Behandlung der Zellen und Proteingewinnung	46
		4.8.2	Trichloressigsäurefällung	46
		4.8.3	Reduktion und Alkylierung	46
		4.8.4	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	47
		4.8.5	NanoLC-ESI-Tandem-Massenspektrometrie	47
		4.8.6	Proteinidentifizierung und Quantifizierung	48
	4.9	BioPle	ex-Immunoassay	48

5	Erge	ebnisse	50	
	5.1 Cotransin-abhängige Inhibition der Biosynthese einzelner GPCR .			
5.1.1 Wirkung von Cotransin auf HEK293-Zellen		50		
		5.1.2 Wirkung von Cotransin auf die Biosynthese einzelner GPCF	x 52	
		5.1.3 Etablierung eines Kaede-basierten Biosyntheseassays	59	
		5.1.4 Bedeutung des SP für die Cotransin-Wirkung	63	
	5.2	Identifizierung weiterer Cotransin-sensitiver Proteine	64	
		5.2.1 SILAC-basierte, massenspektrometrische Expressionsanalyse	e	
		von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen	64	
		5.2.2 BioPlex-Immunoassay-basierte Expressionsanalye von Zytoki	-	
		nen und Wachstumsfaktoren	67	
	5.3	Expressions-inhibitorische Analyse neuer Cotransin-Derivate	69	
		5.3.1 Wirksamkeit von Cotransin-Derivaten nach Deletion	70	
		5.3.2 Wirksamkeit von Cotransin-Derivaten nach Ala-Substitution	n 71	
		5.3.3 Wirksamkeit partiell methylierter Cotransin-Derivate	72	
		5.3.4 Wirksamkeit linearer Cotransin-Derivate	74	
	D 1 1			
6	Disk	Kussion und Ausblick	76	
	6.1	Cotransin – ein eingeschrankt substratspezifischer Innibitor der Protein	-	
		translokation	/6	
		6.1.1 Cotransin-wirkung in unterschiedlichen Zeiltypen	 רר	
	60	0.1.2 Die Kolle des SP für die Cotransin-Sensitivität	//	
	0.2	noglichkeiten zur verbesserung der Löstichkeit und zehunaren Auf	- 70	
	63	Struktur Wirkungsenelvse von Cetrensin	70	
	0.5 6 A	Verwendung eines Kaede basierten Biosyntheseassays zur Analyse de	79 r	
	0.4	Cotransin-Inhibition	۱ 	
	65	Pharmakologische Bedeutung von Cotransin und seinen Derivaten	81	
	0.0	Thanhakologisene Dededaang von Coltansin and semen Derivaten	01	
7	Zusa	ammenfassung	83	
8	Abst	tract	85	
A	Anh	nang	xiii	
т:	taratu	irvarzaichnis	vviii	
LI	ieratu		ХЛШ	
Ei	gene I	Publikationen	xxxiv	
	Pub	likationen	xxxiv	
	Post	terbeiträge	XXXV	
Da	nksag	gung	xxxvi	
Se	lbstän	ndigkeitserklärung	xxxvii	

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des sekretorischen Weges	2	
1.2	ER-Targeting und Insertionsmechanismus von Membranproteinen mit		
	SP (a) und SAS (b)	3	
1.3	Struktur des Sec61-Translokationskanals	5	
1.4	Chemische Struktur von ES_1	8	
1.5	Chemische Struktur von Apratoxin A	9	
1.6	Chemische Struktur von Hun-7293 und seinen Derivaten	11	
1.7	Inhibition der Proteintranslokation in der ER-Membran durch das		
	Zyklodepsipeptid Cotransin	12	
1.8	Aktivierung von GPCR	14	
4.1	Schematische Darstellung der verwendeten GPCR-Konstrukte	36	
4.2	Schematische Darstellung des SILAC-Experimentes	45	
4.3	Schematische Darstellung des BioPlex-Immunoassays	49	
5.1	Untersuchung der Zytotoxizität von Cotransin in HEK293-Zellen.	51	
5.2	Einfluss von Cotransin auf die allgemeine Proteinbiosynthese in		
	HEK293-Zellen	51	
5.3	Inhibitorischer Effekt von Cotransin auf die Biosynthese einzelner		
	GPCR	53	
5.4	Analyse der ET _B R.GFP Expression nach Cotransin-Behandlung mittels		
	Immunpräzipitation	54	
5.5	Konzentrationswirkungskurven der Cotransin-vermittelten Inhibition		
	der Biosynthese des $ET_BR.GFP$ und $CRF_1R.GFP$	55	
5.6	Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung des ET _B R.GFP nach		
	Cotransin-Behandlung	56	
5.7	qRT-PCR Analyse der mRNA Expression nach Cotransin-Behandlung	58	
5.8	Mikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von		
	$ET_BR.GFP$ nach Cotransin-Behandlung	59	
5.9	Absorptionsspektrum von ET _B R.Kaede	60	
5.10	Mikroskopische Quantifizierung der Biosynthese-Inhibition von		
	$ET_BR.Kaede durch Cotransin$	61	
5.11	Kinetik der Biosyntheseinhibition von ET _B R.Kaede und CRF ₁ R.Kaede		
	durch Cotransin	62	
5.12	Reversible Inhibition der Expression von ET _B R.Kaede durch Cotransin	63	
5.13	Bedeutung des SP für die Cotransin-Wirkung	64	
5.14	Auftrennung der isolierten Proteine mittels SDS-PAGE für die massen-		
	spektrometrische Analyse	65	

5.15	SILAC-basierte Expressionsanalyse von Membranproteinen (a) und	
	sekretorischen Proteinen (b) nach Cotransin-Behandlung	66
5.16	BioPlex-Immunoassay-basierte Expressionsanalyse sekretierter Zytoki-	
	ne nach Cotransin-Behandlung	68
5.17	Schematische Darstellung von Cotransin	70
5.18	Einfluss der schrittweisen Deletion	71
5.19	Einfluss des schrittweisen Ala-Substitution	72
5.20	Einfluss partieller Methylierung	73
5.21	Untersuchung der Zytotoxizität von Derivat III an HEK293-Zellen	74
5.22	Einfluss des Auslassens der Zyklisierungsreaktion (lineare Derivate)	75

Tabellenverzeichnis

1.1	In dieser Arbeit untersuchte GPCR	16
5.1	C _T -Werte der durchgeführten qRT-PCR Analyse	58
5.2	Charakterisierung Cotransin-sensitiver und -insensitiver Membranpro-	
	teine hinsichtlich ihrer Signalsequenz	67
A.1	Membranproteine, Cotransin-sensitiv	xiv
A.2	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (1 von 5)	XV
A.3	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (2 von 5)	xvi
A.4	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (3 von 5)	xvii
A.5	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (4 von 5)	xviii
A.6	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (5 von 5)	xix
A.7	Sekretorische Proteine, Cotransin-sensitiv (1 von 2)	XX
A.8	Sekretorische Proteine, Cotransin-sensitiv (2 von 2)	xxi
A.9	Sekretorische Proteine, Cotransin-insensitiv	xxii
A.10	Sekretorische Proteine, durch Cotransin hoch-reguliert	xxii

Abkürzungsverzeichnis

A Abb. Abbildung AG Arbeitsgruppe Arg Arginin AT ₂ R Angiotensin II Rezeptor Typ-2 ATP Adenosintriphosphat AVP 8-Arginin-Vasopressin
B Bmax Maximalbindung BiP Binding immunoglobulin protein, Immunglobulin-bindendes Protein BSA Bovine-serum-albumin, Rinder-Serum-Albumin
$\begin{array}{c} C & & & & & \\ ^{\circ}C & & & & & \\ cAMP & & & & & \\ cAMP & & & & & \\ cRF_1R & & & & & \\ cRF_{2a}R & & & & \\ crF_{2a}R & & & & \\ crficotropin-releasing factor-Rezeptor Typ 1 \\ crF_{2a}R & & & \\ crficotropin-releasing factor-Rezeptor Typ 2a \\ c_T & & & \\ crficotropin-releasing factor-Rezeptor Typ 2a \\ c_T & & \\ \end{array}$
D DGCN
E EC ₅₀

endoplasmatisches Retikulum
ER-assoziierte Degradation
ER-Golgi-Intermediärkompartiment
Eeyarestatin 1
Endosomal sorting complex required for transport
Endothelin-1
radioaktiv markiertes ET-1
Endothelin Rezeptor Typ-A
Endothelin Rezeptor Typ-B

F

FKS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
Fl-1	Fluoreszenzkanal 1
FMP	Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
FSC	
fw.	

G

g	Fallbeschleunigung, Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green-fluorescent-protein, grünfluoreszierendes Protein
gKaede	grünfluoreszierendes Kaede
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphat-Hydrolase

H

Н	
HASM	
HEK293-Zellen	. <i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2-Zellen	humane Hepatokarzinoma-Zelllinie
HPLC high pressure liquid	l chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
Hun-7293	cyclo[N-methyl-L-alanyl-(2R)-
4-cyano-2-hydroxybutanoyl- (2S,4	R)-2-amino-4-methyloctanoyl-N-methyl-L-leucyl-L-leucyl-
1-methoxy-N-methyl-L-tryptophyl-(2S,4R)-2-amino-4-methyloctanoyl]

I	
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	interzellulares Adhäsionsmolekül 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP-10	Interferon-gamma induced protein 10 kD

K

Kb	
$K_{\rm D}$	Dissoziationskonstante
kD	

L

Llight, leic	cht
La ³⁺ Lanthanum-Io	on
λ_{em}	ige
λ_{exc} Anregungswellenlän	ige
laclactic acid, 2-Hydroxypropansäu	ıre
LB-Medium Luria-Bertani-Mediu	ım
LC-MS/MS Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Flüssigchromatographic	ie /
Tandem-Massenspektrometrie	
Leu Leuc	cin
LSM Laser Scanning Microscop	pe
Lys Lys	sin

Μ

M	
mA	
MCP	Monozyten-Chemoattraktives Protein
MCS	multi-cloning-site
min	
MIP	. Macrophage Inflammatory Protein, Makrophagenentzündungsprotein
μOR	
mRNA	messenger RNA
MT	
МТО	
μg	
μ1	
ml	
mM	

N	
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm

0

OD							•				•	 •		•		•		•					•	•			•	•		•	• •			• •	•	•		•						0	p	oti	is	cł	ne	D	icl	ht	e
OST	Г	•	•	•••	• •	•	••	• •	•	• •		 •	•		•	• •	• •		 •			•	• •		•	•	 •	•	•	 •	•	•		•		•	•	0	li	go	osa	ac	c	h	a	ry	yli	tra	an	sf	era	as	e

P

PAG	periaquäduktales Grau
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PBS-CM	Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer mit
	Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDI	Proteindisulfidisomerase
РЕ	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimine
PF	Peptid-Endoglykosidase F
Phe	Phenylalanin
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Azetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSP	Pseudo-Signalpeptid

Q

-		
qRT-PCR	 	 quantitative <i>real-time</i> -PCR

R

RII <i>α</i>	. regulatorische Untereinheit (Isoform RII α) der Proteinkinase A
RANTES	. Regulated on activation in normal T cell expressed and secreted
rev	
rKaede	rot fluoreszierendes Kaede
RNA	
RNCriboso	me-nascent chain complex, Ribosom-naszierende Kette Komplex
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	

S	
SAS	Signalankersequenz
SDS-PAGE	$\dots so dium-dode cyl-sulfate-polya crylamide-gel-electrophores is,$
	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture,
	stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in der Zellkultur
SP	Signalpeptid
SPC	Signalpeptidasekomplex
SP _{etb}	Signalpeptid des ET _B R
SR	SRP-Rezeptor
SRP	signal recognition particle, Signalerkennungspartikel
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht

Т

_	
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	tris buffered saline, Tris-gepufferte Saline
TEMED	
ΤΜ	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	translocating chain associating membrane
TRAP	translocon associated protein, Translokon-assoziiertes Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
TSHR	

U

U	Unit (1 U = 1 μ mol/min)
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
UT_2R	Urotensin-2 Rezeptor
UV-Licht	ultraviolettes Licht

V

V	
v/v	volume per volume, Volumen pro Volumen
V _{1a} R	Vasopressin-Rezeptor Typ 1a
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

\mathbf{W}

W .			•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•						•					•	•	•	•	•	•	•					•	•	•	•	•		•			• •				•				• •					•	1	W	'at	tt	
w/v	•	•	•		•		•		•	•	•	•	•	•					•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	 • •	•	•		•	•	•	•	v	ve	ei,	g	h	t	Þ	<i>e</i>	r	1	\mathcal{C}	ol	u	m	e	,	G	e	W	i	cł	ıt	p	or	0	I	V	ol	u	m	ie	n	l

1 Einleitung

Die Biosynthese eines Proteins oder Polypeptids in Prokaryoten und Eukaryoten umfasst Transkription und Translation. Die Transkription des betreffenden Gens erfolgt bei Eukaryoten im Zellkern. Die Translation des Proteins dagegen findet in verschiedenen Kompartimenten der Zelle statt, je nach Bestimmungsort des zu synthetisierenden Proteins. So durchlaufen alle sekretorischen Proteine und die meisten Membranproteine den sekretorischen Weg. Sekretorische Proteine werden dabei aus der Zelle ausgeschleust, Membranproteine werden Bestandteil von intrazellulären Membrankompartimenten oder der Plasmamembran.

Fast alle pharmakologischen Strategien zur Heilung von Erkrankungen beruhen auf der Interaktion von Wirkstoffen mit speziellen Zielproteinen. Neu dagegen sind Ansätze, die Biosynthese und den Transport dieser Zielproteine mit Substanzen zu regulieren. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Zyklodepsipeptids Cotransin auf die Biosynthese von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) untersucht, speziell dessen Inhibitionswirkung auf die Insertion in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER).

1.1 Der sekretorische Weg von Proteinen

Alle sekretorischen Proteine und Membranproteine (Ausnahme: Membranproteine von Mitochondrien und Chloroplasten) durchlaufen in ihrer Biogenese den sekretorischen Weg (Abb. 1.1). Der sekretorische Weg ist bei Eukaryoten weitestgehend konserviert. Während die einzelnen Abschnitte Gegenstand vieler Studien waren, wurden die entsprechenden Regulationsmechanismen bisher nur wenig untersucht [1].

Der erste Schritt des sekretorischen Weges ist die Translokation der noch unfertigen Proteine über die Membran des ER oder die Insertion in dessen Membran. Die naszierende Polypeptidkette gelangt mit Hilfe eines proteinleitenden Kanals, dem Translokon, vom Ribosom in das Lumen des ER (sekretorische Proteine) oder wird Bestandteil der ER-Membran (Membranproteine). Sind keine speziellen Sortierungssequenzen im naszierenden Polypeptid für dessen Retention im ER vorhanden, wird es in Vesikel verpackt und über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Dort fusionieren die Vesikel mit der Plasmamembran und die Membranproteine werden in die Plasmamembran integriert. Sekretorische

Proteine werden hingegen in das extrazelluläre Milieu abgegeben [2]. Im Verlauf des sekretorischen Weges werden die Proteine glykosyliert und die Disulfidbrücken ausgebildet, wodurch die Stabilität und korrekte Faltung der Proteine beeinflusst wird [3–5].



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des sekretorischen Weges

Über den sekretorischen Weg werden sekretorische Proteine sekretiert und Membranproteine in die Plasmamembran eingebaut [2]. Der sekretorische Weg beginnt mit der Translokation der naszierenden Polypeptidkette über den proteinleitenden Kanal in das Lumen (sekretorische Proteine) oder in die Membran (Membranproteine) des ER. Die Proteine werden in Vesikeln über das ERGIC und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Durch Fusion mit der Plasmamembran werden die Membranproteine in die Plasmamembran integriert, sekretorische Proteine werden in das extrazelluläre Milieu abgegeben. Modifizierte Darstellung nach Alberts *et al.* [6].

1.1.1 Translokation von Proteinen über und Insertion in die ER-Membran

Sekretorische Proteine und Membranproteine werden initial an zytosolischen Ribosomen gebildet. Die zytosolische Translation schreitet fort, bis die erste hydrophobe Sequenz, die so genannte Signalsequenz, erschienen ist (Abb. 1.2). Verlässt die Signalsequenz das translatierende Ribosom, wird sie vom Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) erkannt und gebunden. Dadurch wird die Translation verzögert und der Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (*ribosomenascent-chain complex*, RNC) wird zur ER-Membran geführt (ER-*Targeting*). Dort bindet das SRP an dem SRP-Rezeptor (SR), einem heterodimeren, integralen Membranproteinkomplex. Der SR vermittelt den Transfer des RNC zum Translokon, wobei sich das SRP von der Signalsequenz löst und die Translation fortgesetzt wird [7]. Es lassen sich dabei zwei Arten von Signalsequenzen unterscheiden (Abb. 1.2):

- Signalpeptide (SP) Alle sekretorischen Proteine und einige Membranproteine besitzen als Signalsequenz ein SP, das unmittelbar am N-Terminus lokalisiert ist (Abb. 1.2a). An das SP bindet das SRP und die Translokation des Proteins erfolgt kotranslational. Nach erfolgter Translokation wird das SP durch Signalpeptidasen des Translokon-Komplexes entfernt [8,9]. Eine Ausnahme bildet der *Corticotropin-releasing factor*-Rezeptor Typ 2a (CRF_{2a}R), der ein Pseudo-Signalpeptid (PSP) besitzt, welches nicht abgespalten wird [10, 11]. SP sind in der Regel 20 bis 40 Aminosäuren lang und enthalten drei Bereiche – die N-terminale, positiv geladene n-Region; die hydrophobe, mittlere h-Region und die C-terminale c-Region, die die Spaltstelle beinhaltet [11, 12]. Trotz des gleichen Grundaufbaus sind die Sequenzen der SP nicht konserviert [13]. Durch diese Diversität ist es ihnen möglich individuell bestimmte Aufgaben zu übernehmen. So beeinflussen SP z.B. den Ablauf und die Effizienz der Translokation, den Zeitpunkt der Abspaltung durch die Signalpeptidase und können zudem auch nach der Abspaltung eine Funktion ausüben. In diesem Zusammenhang wurden auf Immunzellen präsentierte Autoantigene gefunden, welche von SP stammen [14, 15].
- Signalankersequenz (SAS) Die Mehrheit der Membranproteine besitzt eine SAS in der Regel die erste Transmembrandomäne (TM) des reifen Proteins (Abb. 1.2b). An diese



Abbildung 1.2: ER-*Targeting* und Insertionsmechanismus von Membranproteinen mit SP (a) und SAS (b)

Initial beginnt die Synthese im Zytosol. Die zytosolische Translation erfolgt solange, bis die erste hydrophobe Sequenz erscheint, welche als Signalsequenz fungiert. Im Fall von Membranproteinen mit SP (a) befindet sich das SP am N-Terminus. Im Fall von Membranproteinen mit SAS (b) bildet die erste Transmembrandomäne die Signalsequenz. Die jeweilige Signalsequenz wird vom SRP gebunden, wodurch es zu einem Translationsarrest (Stop) im Zytosol kommt. Der entstandene Komplex wird zum Translokon an die ER-Membran transportiert. Nach erfolgter Bindung wird der Translationsarrest wieder aufgehoben (Start) und das Protein wird in die Membran integriert. Das Signalpeptid (a) wird anschließend durch die membrangebundene Signalpeptidase abgespalten. Modifizierte Darstellung nach Köchl *et al.* [8]. hydrophobe Sequenz bindet das SRP und das oben beschriebene ER-*Targeting* wird eingeleitet. Der komplette N-Terminus, der sich vor der SAS befindet, muss post-translational durch das Translokon transloziert werden. Das restliche Protein wird kotranslational in die ER-Membran integriert [9].

Der Grund, warum es evolutionär zur Ausbildung von SP bei Membranproteinen gekommen ist, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird die Möglichkeit, dass der Besitz eines SP die Expression begünstigt oder die Translokation des N-Terminus der Proteine erleichtert [8, 16, 17]. Statistische Analysen ergaben, dass die Anzahl der positiven Ladungen im N-Terminus und die Länge des N-Terminus dabei eine Rolle spielen [9].

1.1.2 Das Translokon und seine Aufgaben im sekretorischen Weg

Die Translokation durch bzw. in die ER-Membran erfolgt über den Translokonkomplex. Als Translokon wird die Gesamtheit aller an der Proteintranslokation beteiligten Komponenten bezeichnet [7]. Der Hauptbestandteil des Translokons ist der proteinleitende Kanal (Sec61). Weitere Bestandteile sind der Signalpeptidasekomplex (SPC), die Oligosaccharyltransferase (OST), das Translokon-assoziierte Membranprotein (TRAM) und das Translokon-assoziierte Protein (TRAP). Zu den Proteinen, die nur während des Translokationsprozesses mit dem Translokon assoziiert sind, gehören der SR, luminale Faltungshelfer wie Calnexin, Calreticulin, Immunglobulin-bindendes Protein (*Binding immunoglobulin protein*, BiP) und die Proteindisulfidisomerase (PDI). Einige SP sind während des Translokationsprozesses auf die Interaktion mit Translokon-assoziierten Komponenten wie TRAM oder TRAP angewiesen. Der Grund, warum andere SP auch alleine den Translokationsprozesses einleiten können, ist noch nicht hinreichend geklärt [18].

Sec61 besteht in Säugerzellen aus einem heterotrimeren Komplex, welcher sich aus einer großen Sec61 α -Untereinheit (UE) und zwei kleineren UE, Sec61 β und Sec61 γ , zusammensetzt (Abb. 1.3). Die Sec61 α -UE bildet mit zehn TM die membrandurchspannende Pore. Diese Pore weist einen Aufbau auf, der Ähnlichkeit mit einer Sanduhr hat. Im lumenalen Trichter befindet sich eine kurze Helix, die so genannte *Plug*-Helix, die den Kanal verschließt. Des Weiteren wird der Kanal durch hydrophobe Aminosäurereste verschlossen [19,20]. Die zehn TM der α -UE unterteilen sich in zwei Bereiche (TM 1-5, TM 6-10), welche eine laterale Öffnung bilden. Auf der gegenüberliegenden Seite werden die zwei Bereiche durch eine sich ausbildende Schleife zwischen TM 5 und TM 6 und die γ -UE zusammengehalten. Die β -UE ist ebenfalls mit der α -UE nur eine unterstützende Funktion während des Translokationsprozesses [21,22]. Die Anzahl der Sec61-Komplexe, die an einer Translokation beteiligt sind, war lange unklar. Beckmann *et al.* konnten vor kurzem zeigen, dass nur ein heterotrimerer Sec61-Komplex mit dem translatierenden Ribosom in Wechselwirkung tritt [23].

Damit ein Membranprotein durch das Translokon in die ER-Membran eingebaut oder ein sekretorisches Protein durch das Translokon in das Lumen des ER transloziert werden kann, muss mittels des RNC die Signalsequenz im Translokon so platziert werden, dass diese als Schlüssel zum Öffnen des Kanals dient (Abb. 1.2). Sekretorische Proteine werden dabei durch den geöffneten Kanal kotranslational in das Lumen des ER transloziert. Bei Membranproteinen öffnet sich das Translokon während der Translokation lateral, so dass die Transmembrandomänen kotranslational in die ER-Membran integriert werden können [24]. Das Translokon spielt somit eine zentrale Rolle im sekretorischen Weg. Da das Translokon mit einer Vielzahl von Proteinsubstraten interagiert, war es bisher nur von geringem pharmakologischem Interesse. Dies änderte sich mit der Entdeckung von Inhibitoren, die nur im Zusammenspiel mit einigen Signalsequenzen ihre Wirkung entfalten.



Abbildung 1.3: Struktur des Sec61-Translokationskanals

(a) Ansicht von der zytosolischen Seite auf den Sec61-Translokationskanal. Neben der β - und γ -UE, sind die zwei Hälften der α -UE in blau (TM 1–5) und rot (TM 6–10) dargestellt. Die *Plug*-Helix (1) ist gelb gefärbt, die hydrophoben Aminosäurereste (2), welche die Pore verschließen, sind grün dargestellt. Der purpurne Pfeil zeigt die Richtung der lateralen Öffnung des Kanals an. Der schwarze Pfeil zeigt die Richtung des Kanals an. (b) Längsschnitt des Sec61-Translokationskanals. Modifizierte Darstellung nach Rapoport *et al.* [20, 24].

1.2 Möglichkeiten der Regulation der Expressionsstärke von Proteinen

Die Regulation der Expressionsstärke von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen ist von erheblichem pharmakologischem Interesse [25,26]. Für die spezifische Hemmung der Biosynthese von Zielproteinen werden in der Pharmakologie heute bereits vereinzelt sogenannte therapeutische Nukleinsäuren eingesetzt. Ein völlig neuer Ansatz der spezifischen Hemmung war die Entdeckung von Inhibitoren, welche innerhalb des sekretorischen Weges ihre Wirkung entfalten.

1.2.1 Nukleinsäurederivate als spezifische Inhibitoren der Proteinbiosynthese

Antisense-Strategien spielen eine wichtige Rolle in der zellbiologischen Methodik (in Einzelfällen auch bereits in der Pharmakologie). Es werden dabei drei unterschiedliche *Antisense*-Strategien verfolgt, mit denen spezifische mRNA inhibiert werden können [27]:

- Synthetisch hergestellte Antisense-Oligonukleotide binden spezifisch an die Ziel-mRNA, wobei es zu einem Abbau dieser Doppelstrang-RNA durch die Ribonuklease RNaseH kommt. Des Weiteren kommt es durch ein Binden der Oligonukleotide zur Behinderung der Translation. 1998 wurde das erste, und bis heute einzige, Antisense-Oligonukleotid-Medikament namens VitraveneTM (Fomivirsen), auf den Markt gebracht [28].
- Katalytisch aktive Ribozyme sind in der Lage, gezielt mRNA zu schneiden, wodurch diese ihre Funktion als *Template* f
 ür die Translation nicht mehr aus
 üben kann. Zus
 ätzlich wird durch Bindung der Ziel-mRNA die Translation behindert. Drei synthetisch hergestellte Ribozyme sind derzeit Gegenstand klinischer Studien (Angiozyme[™], Herzyme[™], Heptazyme[™]) [29–31].
- 3. Bei der RNA-Interferenz werden mit Hilfe doppelsträngiger RNA-Moleküle Enzymkomplexe aktiviert, wodurch die mRNA spezifisch zerschnitten wird. Therapien, die auf RNA-Interferenz basieren, befinden sich noch in der Entwicklung [32].

Während *Antisense*-Strategien erfolgreich in der zellbiologischen Methodik verwendet werden, ist deren Einsatz in der Pharmakologie schwierig. Hierfür sind toxischen Effekte, eine nichteffiziente zelluläre Aufnahme und die Instabilität der Oligonukleotide in den Zellen verantwortlich [27, 33, 34].

1.2.2 Inhibitoren des sekretorischen Weges

Ein weiteres Zielmolekül für die Inhibition der Proteinsynthese stellt das Translokon dar. Aufgrund der zentralen Rolle des Translokons in der Biogenese von Membran- und sekretorischen Proteinen erscheint das Translokon als *Target* für die Entwicklung von spezifischen Hemmstoffen der Proteinbiosynthese auf den ersten Blick wenig geeignet. Bis vor kurzen waren nur wenige, unspezifische Inhibitoren der ER-Translokation bekannt, wie z.B. Sterole, dreiwertige Ionen (Lanthanum- und Aluminium-Ionen) und Eeyarestatin I. Kürzlich wurden jedoch Zyklodepsipeptide beschrieben (Apratoxin A, CAM741 und Cotransin), welche das Potential haben, die Proteinsynthese von spezifischen Proteinen zu hemmen.

Sterole

Sterole gehören zusammen mit Glycerophospholipiden, Glyceroglycolipiden, Phospholipiden und Sphingolipiden zu den wichtigsten Bestandteilen von biologischen Membranen und bestimmen u.a. deren physikalische Eigenschaften. Durch ihre kondensierte Ringstruktur sind sie weit weniger flexibel als die langen Kohlenwasserstoffketten anderer Membranlipide. So verleihen die Sterole den Membranen insgesamt weniger Fluidität [35].

Speziell Cholesterol vermindert die Beweglichkeit der Fettsäurereste. Dies kann Auswirkungen auf die Aktivität von Membranproteinen haben. Auch durch eine direkte Bindung von Cholesterol an Membranproteine kann deren Funktionalität beeinflusst werden [36–38]. Zwischen den einzelnen Kompartimenten einer Säugerzelle unterscheidet sich der Cholesterolgehalt der Membranen sehr stark. In der ER-Membran ist der Cholesterolgehalt am geringsten, entlang des sekretorischen Weges nimmt die Konzentration stetig zu [39].

Nilsson *et al.* konnten zeigen, dass durch einen erhöhten Cholesterolgehalt die Proteintranslokation über die ER-Membran inhibiert wird [40]. Vermutet wird eine Störung der Bindung des SRP am SRP-Rezeptor. Aber auch eine Störung der Interaktion von RNC-Komplex und Translokon wurde diskutiert. Es wurde postuliert, dass auf diesem Weg auch Translokonkomplexe inhibiert werden, die aus dem ER heraus transportiert wurden, da es entlang des sekretorischen Weges zu einem natürlichen Anstieg des Cholesterolgehalts kommt. Des Weiteren wäre es denkbar, dass auch das Translokon im ER inhibiert wird, wenn bestimmte physiologische Bedingungen zu einem erhöhten Cholesterolgehalt in der Plasmamembran und in der ER-Membran führen [40].

Dreiwertige Ionen

Erdmann *et al.* untersuchten mittels *in vitro* Transkription / Translation den Einfluss von dreiwertigen Kationen wie Lanthanum- und Aluminium-Ionen auf den Sec61-Komplex [41]. Es wurde vermutet, dass durch das Binden der Kationen an die negativ geladene Gruppen des Sec61-Komplexes der Transport von Anionen erleichtert wird, wodurch die spannungsleitenden Eigenschaften des Kanals beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch Lanthanum- (La³⁺) und Aluminium-Ionen (Al³⁺) die geöffnete Konformation des Sec61-Kanals stabilisiert wird. Die daraus resultierende, eingeschränkte Beweglichkeit des Komplexes erschwert das Binden der Signalsequenz des zu translozierenden Proteins am Translokon. Dies hat eine Inhibition der Translokation zur Folge [41].

Eeyarestatin 1

Eeyarestatin 1 (ES₁, Abb.1.4) ist eine Substanz, die einen oder mehrere Schritte der ER-assoziierten Degradation (ERAD) inhibieren kann [42,43]. Die Hemmung erfolgt vermutlich durch Interaktion mit der p97 ATPase, wodurch die Deubiquitinylierung der zu degradierenden Substrate verhindert wird. Die Deubiquitinylierung der fehlgefalteten Proteine ist für die Retrotranslokation aus dem ER und den Transport zum Proteasom essenziell [43].



Abbildung 1.4: Chemische Struktur von ES₁. Modifizierte Darstellung nach Wang *et al.* [44].

Cross *et al.* konnten mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Experimenten zeigen, dass ES_1 auch den kotranslationalen Proteintransport über die ER-Membran inhibiert [45]. Ihre Experimente lassen vermuten, dass ES_1 die Konformation des Sec61-Komplexes verändert und dadurch der SR-SRP-RNC nicht mehr effektiv am Translokon binden kann. Dabei kommt es zur Hemmung der Expression nahezu aller sekretorischen Proteine und fast aller untersuchten Membranproteine [45].

Zyklodepsipeptide

Kürzlich wurde eine weitere die ER-Translokation inhibierende Stoffgruppe gefunden – die Zyklodepsipeptide. Sie verfügen über ein völlig neues Wirkprinzip und hemmen selektiv die Biosynthese von einigen sekretorischen Proteinen und Membranproteinen [46]. Zyklodepsipeptide, wie Hun-7293 und Apratoxin, sind natürlich vorkommende Verbindungen, die sowohl aus Pilzen als auch aus Bakterien und marinen Organismen isoliert wurden. Charakteristisch für diese Substanzen ist eine zyklische Anordnung der Aminosäuren, wobei eine oder mehrere Peptidbindungen durch Esterbindungen ersetzt sind. Des Weiteren sind sie durch das Vorhandensein untypischer Aminosäuren und einer nicht zu den Aminosäuren gehörenden Position charakterisiert [47]. Aufgrund ihrer antiviralen, antibakteriellen, antitumoralen, antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften haben Zyklodepsipeptide ein großes pharmakologisches Potential [48–50]. Kahalalide F z.B. ist ein antitumoral wirkendes Zyklodepsipeptid, welches sich zur Zeit in Phase II der klinischen Studie zur Behandlung verschiedener Krebsarten und Psoriasis befindet [51].

Die Wirkungsmechanismen der Zyklodepsipeptide zu studieren ist schwierig. Einerseits erschwert deren stereochemische Komplexität die Synthese. Andererseits kann es zu einer schnellen enzymatischen Degradation im Zytoplasma kommen. Inzwischen wurden Derivate der natürlich vorkommenden Zyklodepsipeptide entwickelt, die eine vergleichbare Wirksamkeit bei erhöhter Stabilität aufweisen und einfacher zu synthetisieren sind [52]. Eine erste, limitierte Struktur-Wirkungs-Analyse liegt nur für das aus Pilzen isolierte Hun-7293 vor [52]. Hiervon wurden die Derivate CAM741, NFI028 und Cotransin abgeleitet. Es zeigte sich, dass die Zyklodepsipeptide nur die Proteinbiosynthese von einigen wenigen Proteinen hemmen, indem sie mit den SP der Zielproteine und dem proteinleitenden Sec61-Kanal im ER wechselwirken [46,53]. Crosslinking-Experimente sprechen dafür, dass Zyklodepsipeptide die Position des SP innerhalb des Sec61-Kanals verschieben und so die Öffnung des proteinleitenden Kanals verhindern [46,54]. Als Bindungsstelle kommt die hydrophobe Bindungstasche innerhalb des Sec61-Kanals oder das SP selbst in Frage. Auffällig ist die selektive Wirkung der Zyklodepsipeptide, die nur die Synthese einiger weniger Proteine verhindert. Diese Selektivität scheint auf der Sequenzdiversität der SP zu beruhen, die neben dem Sec61 Protein das zweite Target der Peptide darstellen. Es ist aber unklar, ob es auf Seiten der SP eine Konsensussequenz für die Zyklodepsipeptid-Sensitivität gibt [46, 53].

Apratoxin A Apratoxine sind eine Klasse zytotoxischer, natürlich vorkommender Zyklodepsipeptide in marinen Cyanobakterien [55]. Die fünf bis heute bekannten Apratoxine haben antiproliferative Eigenschaften, wobei Apratoxin A (Abb. 1.5) die höchste Potenz aufweist. Es führt zu einem Arrest im G₁-Zellzyklus und zur Apoptose [56]. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt. Als möglicher Interaktionspartner der Apratoxine wurde die Translokonuntereinheit Sec61 α diskutiert [57].



Abbildung 1.5: Chemische Struktur von Apratoxin A Modifizierte Darstellung nach Liu *et al.* [57].

Hun-7293 Hun-7293 ist ein in Pilzen gebildetes makrozyklisches Peptid (Abb. 1.6a). Es besteht (bis auf die Aminosäure Leucin, Leu) aus nicht-proteinogenen Aminosäuren und einer Hydroxysäure. Bei einer systematischen Suche nach potentiellen Therapeutika für chronisch entzündliche oder Autoimmunerkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Substanz die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) inhibiert [58]. Später konnten weitere inhibitorische Effekte auf die Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 (VCAM1) und E-Selektin belegt werden [52, 59]. Die Synthese von Hun-7293 ist aufgrund der nicht-proteinogenen Aminosäuren, der kovalenten Verknüpfung sterisch anspruchsvoller Aminosäuren, dem Einbau einer Esterbindung in das Peptidrückgrad und einer epimerisierungsfreien Peptidzyklisierung sehr schwierig. Trotzdem gelang es Boger *et al.* in einer Flüssigphasensynthese Hun-7293 herzustellen und systematisch zu derivatisieren [60]. Es konnten die Derivate CAM741, NFI028 und Cotransin abgeleitet werden. Es zeigte sich, dass Hun-7293 und seine bis heute beschriebenen Derivate das Translo-kon SP-abhängig inhibieren und so die Biosynthese einiger weniger Proteine hemmen (selektive Wirkung).

CAM741 Das Zyklodepsipeptid CAM741 (Abb. 1.6b), ein Decyanopropylester-Derivat von Hun-7293, wurde als selektiv wirkender Inhibitor der kotranslationalen Translokation vom VCAM1 und des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) beschrieben. Bei der SP-abhängigen Hemmung des Sec61-Kanals scheint die Sec61 β -UE eine wichtige Rolle zu spielen. Auf Seiten des SP scheint eine erhöhte Hydrophobizität in der h-Region zu einer erniedrigten CAM741-Sensitivität zu führen [13, 53, 54].

NFI028 NFI028 entstand durch Änderung der zyklischen Heptadepsipeptidstruktur von CAM741 in eine zyklische Hexapeptidstruktur (Abb. 1.6c). NFI028 inhibiert die Expression von VCAM1, aber nicht von VEGF [13]. Dies zeigt, dass durch Variation der Struktur prinzipiell die Selektivität der Zyklodepsipeptide verändert werden kann.

Cotransin Cotransin ist im Vergleich zur Ausgangssubstanz Hun-7293 strukturell stark vereinfacht und ausschließlich aus leicht verfügbaren Aminosäuren aufgebaut (Abb. 1.6d). Die Substanz besitzt eine mit Hun-7293 vergleichbare selektive Wirkung auf die Biosynthese bestimmter Proteine. Allerdings ist die inhibitorische Potenz in zellulären Systemen um den Faktor 2000 verringert (bezogen auf VCAM1) [46, 52, 59].

Garrison *et al.* beschrieben Cotransin als einen spezifischen, reversiblen Inhibitor der Proteintranslokation [46]. Als Cotransin-sensitive Proteine wurden die Membranrezeptoren VCAM1, P-Selektin und der *Corticotropin releasing factor receptor 1* (CRF₁R) und die sekretorischen Proteine β -Lactamase und Angiotensinogen beschrieben. Durch den Einfluss von Cotransin kommt es zu einer schwächeren Bindung des RNC an die Sec61 α -UE und luminale Chaperone (wie z.B. die Proteindisulfidisomerase, PDI) und zu einer verstärkten Bindung an Sec61 β . Durch die



Abbildung 1.6: Chemische Struktur von Hun-7293 und seinen Derivaten

Hun-7293 (a) ist ein zyklisches Heptadepsipeptid, welches bis auf die Aminosäure Leu aus nicht proteinogenen Aminosäuren und einer Hydroxysäure besteht. CAM741 (b) ist ein Decyanopropylesterderivat von Hun-7293. Das Derivat NFI028 (c) entstand durch Seitenkettenmodifikationen und Modifikationen im Peptidrückgrad. Cotransin (d) besteht ausschließlich aus leicht verfügbaren Aminosäuren und an Stelle von DGCN ist 2-Hydroxypropansäure als Hydroxysäure vorhanden. (DGCN) (*R*)-2*hydroxy-4-cyanobutyric acid*, (MTO) $N^{1'}$ -*methoxy-N-methyl-L-tryptophan*. Modifizierte Darstellungen nach Coin *et al.*, Harant *et al.*, Chen *et al.* [13,52,61].

Verschiebung der Bindung zwischen RNC und Translokon wird die effiziente Öffnung des Translokationskanals verhindert und die Translokation inhibiert (Abb. 1.7) [46].

Für die Synthese von Cotransin ist keine aufwändige Herstellung von Aminosäurebausteinen notwendig, trotzdem wurde ein zu Hun-7293 analoger Weg mit Hilfe einer Flüssigphasensynthese beschritten [52]. Diese Synthesestrategie erlaubt bisher keine Automatisierung und erschwert die Herstellung einer großen Anzahl von Derivaten für *Screening-* und Struktur-Funktions-Untersuchungen. Dieses Problem wurde kürzlich durch eine Festphasensynthese des linearen Peptides und eine effiziente und epimerisierungsfreie Zyklisierung gelöst [61].



Abbildung 1.7: Inhibition der Proteintranslokation in der ER-Membran durch das Zyklodepsipeptid Cotransin

Cotransin beeinflusst die SRP-abhängige Bindung des RNC am Translokon nicht. Es kommt zu einer schwächeren Bindung des RNC an die Sec61 α -UE und das zytosolische Chaperon PDI (UE des Translokons) und zu einer verstärkten Bindung an Sec61 β . So wird die Signalsequenz-abhängige Insertion der naszierenden Kette in den Kanal des Translokons inhibiert, wodurch das Translokon nicht effizient geöffnet werden kann. Modifizierte Darstellung nach Garrison *et al.* [46].

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die bedeutendste Proteinfamilie, welche eine Zelle mit der sie umgebenden Umwelt verbindet, bilden die GPCR. Aus diesem Grund nehmen sie heutzutage in der Medizin eine zentrale Rolle ein. Etwa die Hälfte aller Medikamente wirken auf GPCR [62]. Somit war es ein Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, welche GPCR empfindlich gegenüber Cotransin sind.

GPCR sind integrale Membranproteine (Typ III Membranproteine) und reagieren auf ein ausgedehntes Spektrum von Reizen wie Licht, Neurotransmitter, Duftstoffe, Pheromone, Nukleotide, Aminosäuren, biogene Amine, Lipide, Hormone oder Chemokine (Abb. 1.8). Die Diversität der Liganden spiegelt den evolutionären Erfolg der GPCR wider und erklärt die Bedeutung der GPCR in vielen biologischen Prozessen [63].

1.3.1 Struktur und Funktion von GPCR

GPCR sind durch einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus und sieben transmembranäre α -Helizes charakterisiert, welche durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Abb. 1.8). Die sieben TM sind für die Verankerung des Rezeptors in der Membran verantwortlich und können zur Signalisierung beitragen [64]. Die Bindungsstellen für die Liganden der GPCR befinden sich innerhalb der extrazellulären Schleifen, innerhalb des N-Terminus oder innerhalb der Transmembranhelizes. Zur Unterstützung der Stabilität und der korrekten Faltung sind die extrazellulären Domänen und der N-Terminus häufig glykosyliert. Auch die korrekte Orientierung in der Membran wird so begünstigt [65]. Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und der geringen Rezeptordichte in der Membran ist die Kristallisation und damit verbundene Strukturaufklärung von GPCR sehr schwierig. Nur die Struktur weniger GPCR konnte bis heute aufgeklärt werden [66–72]. Die Rezeptoren können anhand von funktionalen Eigenschaften in drei Klassen eingeteilt werden, die untereinander nur wenig Sequenzhomologien aufweisen. Die zahlenmäßig größte Klasse 1 umfasst die olfaktorischen Rezeptoren, welche wiederum in drei Gruppen (a, b, c) unterteilt werden. Die Gruppe 1a enthält Rezeptoren für kleine Liganden, deren Bindung innerhalb der sieben Transmembranbereiche erfolgt. Die Gruppe 1b umfasst Peptid-Rezeptoren, deren Liganden innerhalb der N-terminalen Domäne und an den extrazellulären Schleifenregionen binden. Die Gruppe 1c beinhaltet die Glykoproteinhormonrezeptoren, bei denen die Bindung der Hormone an die große extrazelluläre Domäne erfolgt. Die Rezeptoren der Klasse 2 zeigen einen ähnlichen Aufbau wie die Rezeptoren der Gruppe 1c. Bei den Liganden handelt es sich hier allerdings um große Peptidhormone. Die Klasse 3 umfasst die metabotropen Glutamatrezeptoren und G₀-bindende Pheromonrezeptoren [63].

1.3.2 Aktivierung von GPCR

Die Bindung des Liganden an einen GPCR führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und so zur Interaktion mit einem heterotrimeren (α -, β - und γ -UE) Guaninnukleotid-bindenden Protein (G-Protein, Abb. 1.8). Durch diese Bindung kann an der α -UE des G-Proteins Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt werden und der heterotrimere G-Proteinkomplex wird instabil. Die α -UE dissoziiert anschließend vom Rezeptor und dem membranständigen $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die α - als auch die $\beta\gamma$ -UE sind in der Lage, unabhängig voneinander synergistisch oder auch antagonistisch mit verschiedenen Effektoren wie Enzymen oder Ionenkanälen zu interagieren und so die exogenen, durch den Liganden übertragenen Signale in das Zellinnere weiterzuleiten [73, 74]. Die intrinsische Aktivität der α -UE ermöglicht es nach Aktivierung der Rezeptoren, den zellulären Effekt zeitlich zu begrenzen und die Zellen vor einer Reizüberflutung zu schützen. Mit Hilfe von akzessorischen Proteinen führt die Hydrolyse des gebundenen GTP zu einer Reassoziation der drei UE des G-Proteins und somit zur Inaktivierung des GPCR [75].

Der großen Vielzahl an GPCR und ihren Liganden steht zur Weiterleitung des Signals in die Zelle nur eine begrenzte Anzahl von G-Proteinen zur Verfügung. Die strukturelle und funktionale Klassifizierung der G-Proteine wird durch die α -UE bestimmt, welche sich aufgrund von Sequenzhomologien in vier Familien unterteilen lassen [76]:



Abbildung 1.8: Aktivierung von GPCR

GPCR besitzen sieben TM (TM 1-7), die über je drei intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Sie werden durch verschiedenartige Liganden aktiviert. Die aktivierten Rezeptoren interagieren mit einem heterotrimeren G-Protein, das aus einer α -, einer β und einer γ -UE besteht. Durch die Interaktion kommt es zu einem Austausch des GDP an der α -UE durch GTP, was die Instabilität des Komplexes zur Folge hat. Die UE sind nun in der Lage, mit ihren entsprechenden Effektoren zu interagieren und das Signal ins Zellinnere weiterzuleiten. Modifizierte Darstellung nach Bockaert *et al.* [63].

• $G\alpha_s$

Die stimulatorische Untereinheit $G\alpha_s$ aktiviert die membranständige Adenylylcyclase, wodurch Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt wird. Der in dieser Arbeit verwendete CRF_{2a}R führt beispielsweise zu einer G α_s vermittelten Signaltransduktion (Tab. 1.1).

• Gα_i

Die inhibitorische Untereinheit $G\alpha_i$ hemmt die Adenylylcyclase, wodurch es zu einer Erniedrigung des cAMP-Spiegels in der Zelle kommt. Zu den in dieser Arbeit verwendeten $G\alpha_i$ -gekoppelten GPCR zählt der μ -Opioid-Rezeptor (μ OR).

• $G\alpha_q$

Durch aktiviertes $G\alpha_q$ wird die Phospholipase-C- β aktiviert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol und dem *second messenger* Inositoltriphosphat hydrolysiert wird. Der hier verwendete Urotensin-2 Rezeptor (UT₂R) aktiviert $G\alpha_q$.

• Gα_{12,13}

Die Proteine G $\alpha_{12,13}$ sind in der Lage, ρ -GTPasen zu aktivieren, welche im aktivierten Zustand mit weiteren Effektoren interagieren.

Auch die $\beta \gamma$ -UE der G-Proteine unterscheiden sich in Struktur und Funktion und können beispielsweise die Adenylylcyclase inhibieren, Phospholipasen aktivieren oder mit GPCR-Kinasen interagieren [77–81].

1.3.3 Charakterisierung der in dieser Arbeit als Modell dienenden GPCR

Während die Blockade oder die Aktivierung von GPCR in der Plasmamembran wichtige pharmakologische Prinzipien darstellen, wäre eine spezifische Verhinderung der GPCR-Biosynthese ein völlig neues Wirkprinzip. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob einige pharmakologisch relevante GPCR Cotransin-sensitiv sind. Diese GPCR sollen in Tab. 1.1 näher charakterisiert werden.

In Tabelle 1.1 sind die ausgewählten Rezeptoren aufgelistet. Angegeben sind u.a. Zuordnung zu den jeweiligen Klassen, *second messenger*, posttranslationale Modifikationen und das jeweilige Expressionsgewebe.

GPCR (Spezies ¹)	Klasse	Signal- sequenz	G-Protein	second messenger	posttranslationale Modifikation ²	Expressionsgewebe	physiologische Bedeutung
ET _B R ^(Hu)	1	SP	G_i, G_q	${ m IP}_3$	N59, C402, CC(174-255)	Endothelzellen, Epithelzellen, glatte Muskelzellen	Vasodilatation, Vasokonstrikti- on
TSHR ^(Hu)	-1	SP	$G_s, (G_q)$	cAMP	N77, N99, N113, N177, N198, N302	Schilddrüse	Schilddrüsenmetabolismus
CRF ₁ R ^{(Rt) 3}	7	SP	G_s, G_q	cAMP, IP ₃	N38, N45, N78, N90, N98, CC(30-45,44-87,68-102)	SNZ	Stressantwort, Immunantwort, Adipositas
ET _A R ^(Hu)	-1	SP	${\rm G}_q, {\rm G}_i$	\mathbb{IP}_3 , DAG^4	N29, N62	glatte Muskelzellen der Blut- gefäße	Vasokonstriktion, Zellprolife- ration von Epithelzellen
CRF _{2a} R ^(Rt)	2	PSP	G _s	cAMP	N41, N74, N86, N94	Stressantwort, Immunabwehr	Hypothalamus
PAR1 (Hu)	-1	SP	${\rm G}_q, {\rm G}_i$	\mathbb{IP}_3 , DAG	N35, N62, N75, N250, N259	Blutplättchen, vaskuläre Endo- thelzellen	Hämostase, Thrombose, Hy- pertrophie, Entzündungen
$\mathbf{UT}_{2}\mathbf{R}^{(\mathrm{Rt})}$	-	SAS	${\rm G}_q$	IP_3, DAG	N29, N33	Herz, Bauchspeicheldrüse	Blutdruck, Harnausscheidung, Angiogenese
AT ₂ R ^(Hu)	-1	SAS	G _i	cGMP	N4, N13, N24, N29, N34, CC(35-290,117-195)	Myometrium, Niere, Darm	neuronale Regeneration, Apoptose, Zelldifferenzierung
$V_{1a}R^{(Rt)}$	1	SAS	$G_{q/11}$	IP ₃ , DAG	N14, N27, N198	glatte Gefäßmuskelzellen, glatte Muskulatur, Hepatozy- ten, Thrombozyten	Gefäßfunktion, Vasokonstrik- tion, Blutdruck, Blutgerin- nung
μOR ^(Rt)	1	SAS	G _i	cAMP	N9, N31, N38, N46, N53, CC(140-217)	PAG ⁵ , Hinterhorn des Rücken- marks, Nase, <i>Nucleus accum- bens</i> , zerebraler Kortex	Blutdruck, Wundheilung, Schmerzempfindung
¹ (Hu) <i>human</i> , Mensch;	(Rt) rat, Ratt	0					

Tabelle 1.1: In dieser Arbeit untersuchte GPCR

 2 (N) N-Glykosylierung, (C) Palmitoylierung, (CC) Disulfidbrücke, (S,T) O-Glykosylierung

³ Cotransin-Sensitivität beschrieben in [46]

⁴ (DAG) Diacylglycerol
 ⁵ (PAG) periaquäduktales Grau

2 Ziel dieser Arbeit

Die spezifische Hemmung der Biosynthese von Proteinen ist in der Pharmakologie ein relativ neues Prinzip. Bisher werden dafür Nukleinsäuren eingesetzt, die *in vivo* häufig nur schlecht in Zellen aufgenommen werden [27]. Kürzlich wurden zellpermeable Zyklodepsipeptide beschrieben, die über ein völlig neues Wirkprinzip verfügen und spezifisch die Biosynthese von Proteinen inhibieren können [13, 46, 52, 57]. Cotransin, ein Zykloheptadepsipeptid, wurde als selektiv wirkender Inhibitor der Biosynthese von sekretorischen Proteinen, wie β -Lactamase und Angiotensinogen beschrieben. Auch einige wenige Membranproteine (CRF₁R, P-Selektin und VCAM1) waren Cotransin-sensitiv [46].

Ziel dieser Dissertation war es, die Selektivität von Cotransin zu untersuchen. Wegen der besonderen pharmakologischen Bedeutung von GPCR sollte u.a. der Frage nachgegangen werden, ob es weitere Cotransin-sensitive GPCR gibt.

Um strukturelle Gemeinsamkeiten im Aufbau der SP sensitiver Proteine zu finden, sollten ferner weitere Cotransin-sensitive Proteine mit einem Proteomics-Ansatz identifiziert werden. Diese Analyse sollte die Selektivität von Cotransin weiter untersuchen.

Weiter stellte sich die Frage, ob es möglich ist, durch gezielte Veränderung der funktionalen Gruppen des Cotransins die Selektivität für ausgewählte GPCR zu verändern.

3 Materialien

In diesem Abschnitt werden alle für die Versuche verwendeten Materialen sowie Geräte und Software aufgeführt.

Material	Lieferant
Acrylamid (30%), Bisacrylamid (0,8%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	peqlab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Arginin (¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)	Silantes GmbH, München, Deutschland
CasyTon® isotonischer Puffer	Innovatis, Reutlingen, Deutschland
Cotransin	Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie,
	AG Peptidsynthese, Berlin, Deutschland
DMEM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
6 x DNA Ladepuffer	Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutsch-
	land
dNTPs	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Essigsäure	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
ET _B R-Primer (HS 00240752_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
FACS Clean TM	FACSCalibur TM , Becton Dickinson, Heidelberg,
	Deutschland
FACS Rinse TM	FACSCalibur TM , Becton Dickinson, Heidelberg,
	Deutschland
	Fortsetzung auf der nächsten Seite

3.1 Reagenzien und Chemikalien

Material	Lieferant
FACS Flow TM	FACSCalibur TM , Becton Dickinson, Heidelberg,
I	Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GAPDH-Primer (4326317E)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Iodacetamid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutsch-
1	land
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat G	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
LumiLight Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutsch-
1	land
Magermilchpulver 0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutsch-
I	land
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutsch-
I	land
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TE-	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MED)	
Oligonukleotidprimer	BioTez, Berlin, Deutschland
Phorbol 12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pepton	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim,
]	Deutschland

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der vorhergehenden Seite	
Material	Lieferant
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ProteinA-Sepharose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RNase Away	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RotiLoad-Probenpuffer, 4 x konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutsch-
	land
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol Reagent®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Seromed GmbH, Wien, Österreich
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.2 Enzyme

3.2.1 DNA-modifizierende Enzyme

Enzym	Lieferant
DpnI, EcoRI, Sall	FastDigest®, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutsch-
	land
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am
	Main, Deutschland

3.2.2 Endoglykosidasen

Enzym	Lieferant
Endoglykosidase H (EH)	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
Peptidendoglykosidase F (PF)	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland

3.3 Marker

Marker	Lieferant
GeneRuler TM DNA-Marker 1 Kb-Leiter	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
PageRuler TM Plus Prestained Protein	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Ladder	

3.4 Kits

Material	Lieferant
BigDye® Terminator Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BioPlex Pro Human Cytokine 27-plex	BioRad, München, Deutschland
Assay	
NucleoBond Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Pierce® SILAC Protein Quantitation Kit	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
$QuickChange^{TM}$ Site-directed Mutagenesis	Stratagene, La Jolla, USA
Kit	
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SS III First strand synthesis super mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TagMan® Gene Expression Master Mix	AppliedBiosystems, Foster City, USA

3.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Lieferant
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, Dänemark
Elektroporationsküvetten	BioRad, München, Deutschland
μ -dish ibiTreat	ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Gradientengele (4–12%)	Invitrogen, NuPAGE® 4-12 % Bis Tris Gel
	1mm x 12well
Nitrozellulosemembran (OPTITRAN	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
BA-S 85)	

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der vorhergehenden Seite	
Material	Lieferant
Parafilm	Laboratory Film, Chicago, USA
Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
Quarzküvette QS (105.251)	Hellma, Müllheim, Deutschland
Sep-Pak Vac 3cc AccellTM Plus QMA	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Kartuschen	
Zellkulturschalen (12-, 24-Lochplatten),	TPP, Trasadingen, Schweiz
-flaschen	
Zellkulturschalen (10 cm, 36 mm)	Grainer Bio-One GmbH, Frickenhausen,
	Deutschland
Zentrifugenröhrchen (Rundboden)	Cotech Vertriebs GmbH, Berlin, Deutschland

3.6 Antikörper

Antigen	Wirt	Lieferant
GFP (monoklonal)	Maus	Clontech Laboratories Inc., Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
GFP (polyklonal)	Kaninchen	AG Protein Trafficking, Leibniz-Institut für Moleku- lare Pharmakologie, Deutschland
anti-Maus-IgG- Peroxidase (polyklo- nal)	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

3.7 Rekombinante Plasmide

Als Klonierungsvektoren wurden der pEGFP-N1 und der pKaede-MN1 benutzt. Wenn nicht anders angegeben stammen alle Konstrukte vom FMP, Berlin, Deutschland.

Das Konstrukt SPetb $-\mu$ OR.GFP wurde im Rahmen dieser Arbeit angefertigt.
3.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Blotkammern	Mini-PROTEAN® 3 Western TransBlot, Bio-
	Rad, München, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur-Durchflusszytometer, Becton
	Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Eksigent 2D NanoLC-System	Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Elektrophoresekammern	Mini-PROTEAN® 3 Cell, BioRad, München,
	Deutschland
Elektroporationsgerät	GenePulser Xcell Electroporation System,
	BioRad, München, Deutschland
Heizblock	Thermomixer Comfort, Eppendorf GmbH,
	Hamburg, Deutschland
γ-Zähler	Wallac 1470 Wizard, GMI Inc., Ramsey, USA
Labormikroskop	Zeiss Axiovert 40, Carl Zeiss GmbH, Jena,
	Deutschland
Laser Scanning Microscope (LSM) und	ConfoCor3, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutsch-
angeschlossene Geräte	land
	Heizkammer, FMP, Berlin, Deutschland
	LSM 510 META, Carl Zeiss GmbH, Jena,
	Deutschland
LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
LumiImager-F1 [™]	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim,
	Deutschland
Mikroinjektionsspritze	700 series syringe, Hamilton Co., Bonaduz,
	Schweiz
NanoDrop 100	Thermo Scientific, Wilmington, Deutschland
Nanosprayquelle	Proxeon, Odense, Dänemark
PicoTip ESI Emitter	New Objective, Woburn, MA, USA
Pipettierhilfe	Pipettboy, Integra Biosciences, Fernwald,
	Deutschland
Pipetten	Research® 0,5–10 µl, Eppendorf GmbH,
	Hamburg Deutschland

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der vorhergehenden Seite	
Gerät	Hersteller
pH-Meter	HI9321 Microprocessor pH-Meter, Hanna
	Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Photometer	Ultraspec2000, Amersham Pharmacia Biotech,
	Wien, Österreich
Plattenlesegerät (Safire)	TECAN, Crailsheim, Deutschland
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Fa. Millipore, Schwalbach,
	Deutschland
Rotator	Multishaker Rotator RS-24, Biosan, Warren,
	USA
Rotoren/Zentrifugen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
	DuPont, Delaware, USA
	Tomy Seiko, Fremont, USA
	Christ, Osterode, Deutschland
	GMI Inc., Ramsey, USA
Spektrophotometer V-550 UV/VIS	Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-
	Umstadt, Deutschland
StepOne TM RT PCR Systems	Applied Biosystems, Foster City, USA
Szintillationszähler	β -Counter, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld,
	Deutschland
Sequenziergerät	ABI PRISM TM 3100 Avant Genetic Analyzer,
	Applied Biosystems, Foster City, USA
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellhomogenator	Potter S, Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen,
	Deutschland

3.9 Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro (V6)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ClustalW	EMBL-EBI, Cambridge, UK
	Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung der vorhergehenden Seite			
Software	Hersteller		
FCS Express (V3)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland		
GraphPad Prism (V4)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA		
IPI humane Proteindatenbank	international protein index, Version 3.52,		
	148380 Sequenzeinträge; 62526836 Aminosäu-		
	ren beinhaltend		
MASCOT Suchmaschine (V 2.2)	Matrix Science Ltd., London, UK		
MaxQuant (V 1.0.12.31)	Max Planck Institut für Biochemistry, Martins-		
	ried, Deutschland		
SeqMan TM 2	DNASTAR, Madison, USA		
SignalP3.0	Center for Biological Sequence Analysis,		
	Lyngby, Dänemark		
StepOne	Applied Biosystems, Foster City, USA		
Zeiss LSM Image Browser	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland		

3.10 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

3.10.1 Bakterien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
E. coli DH5α	fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Stratagene, USA

3.10.2 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
HASM-Zellen	humane, glatte Muskelzellen der Atemwe- ge, immortalisiert mit humaner Telomerase, reverser Transkriptase (hTERT)	Andrew Halayko, Universi- ty of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Kanada
	Fortsetzung auf der nächsten Seite	2

Fortsetzung der vorhergehenden Seite

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
HEK293-Zellen	humane, embryonale Nierenzellen; trans-	DSMZ, Braunschweig,
	formiert mit Adenovirus Typ 5 (DSMZ-	Deutschland
	Nr. ACC 305)	
HepG2-Zellen	humane Leberkarzinom-Zelllinie, von	DSMZ, Braunschweig,
	Patient mit primärem Hepatoblastom	Deutschland
	(DSMZ-Nr. ACC 180)	
Jurkat-Zellen	humane T-Zelllinie, von Patient mit akuter,	DSMZ, Braunschweig,
	lymphoblastischer Leukämie (DSMZ-	Deutschland
	Nr. ACC 282)	

4 Methoden

Für die Herstellung der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, bi-destilliertes Wasser verwendet, welches mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem von organischen und ionischen Bestandteilen befreit wurde und eine Leitfähigkeit von höchstens $10 \,\mu$ S/cm bei Raumtemperatur (RT) besaß.

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach erwarteter Größe in 0,8 - 2,0 prozentigen Agarosegelen in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer). Dafür wurden die DNA-Proben mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 V/cm. Als Größenstandart wurde ein 1 Kb-Leiter verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden die Gele mit 60 μ g Ethidiumbromid versetzt. Aufgrund der planaren Struktur ist Ethidiumbromid in der Lage, sich reversibel in die DNA einzulagern. Unter UV-Bestrahlung (256 nm) tritt eine Fluoreszenz auf. Die Empfindlichkeit liegt bei 5 ng DNA pro Bande.

TAE-Puffer 0,8 M Tris; 0,4 M Essigsäure; 0,25 M EDTA (pH 7,8)

4.1.2 Plasmid-DNA Isolierung und Aufreinigung aus Agarose-Gelen

Für die Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli*-Bakterien wurden die kommerziell erwerblichen Kits Nucleobond® AX und NucleoSpin® Plasmid QuickPure verwendet. Zum Isolieren von DNA aus Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen wurde das Kit NucleoSpin® ExtraktII benutzt. Die Durchführung erfolgte wie in den dazugehörigen Handbüchern angegeben.

4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe des Nanodrop 100 bestimmt. Aufgrund der Extinktion der Lösung konnte die Konzentration anhand folgendes Verhältnisses berechnet werden: $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Proben konnte mit Hilfe des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} bestimmt werden (DNA = 1,8; RNA = 2,0).

4.1.4 Restriktion von Plasmid-DNA

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen ist es möglich, DNA-Moleküle an bestimmten Positionen zu schneiden. Laut Hersteller der Restriktionsenzyme wird 1 μ g Plasmid DNA von 1 U Restriktionsenzym in 5 min bei 37 °C geschnitten. Für eine analytische Spaltung wurden 1 μ g, für eine präparative Spaltung 2,5 μ g Plasmid-DNA verwendet.

4.1.5 Oligo-Klonierung

Unter Oligo-Klonierung versteht man das Präparieren eines *forward* (Primer A) und eines *reverse* (Primer B) Oligoprimers, um einen daraus resultierenden Oligonukleotiddoppelstrang zu erhalten.

	Für den Oligo-Klonierungs-Ansatz wurden verwendet:		
30 µ1	Primer A (50 μ M)		
30 µ1	Primer B (50 μ M)		
15 µ1	5 x Annealingpuffer		

Der Ansatz wurde für 2 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und der Reaktionsansatz stehen gelassen, um so eine langsame Abkühlung auf RT zu gewährleisten. Die annealten Oligos wurden über die Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 4.1.1) aufgereinigt und in $20 \,\mu$ l H₂O aufgenommen.

5 x Annealing puffer 400 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8,0); 333 μ l 3 M NaCl; 1267 μ l H₂O

4.1.6 Ligation von DNA-Molekülen

Unter Verwendung von DNA-Ligasen werden DNA-Stränge miteinander verknüpft, indem eine Esterbindung zwischen dem Phosphatrest und der Desoxyribose ausgebildet wird. Als Kofaktor

Für den Ligations-Ansatz wurden verwendet:		
3 µ1	Insert (15 % des Endvolumens einer Gelelution)	
1 µ1	Vektor (5 % des Endvolumens einer Gelelution)	
2 µ1	10 x Ligase-Puffer (NEB)	
1μ l	T4-DNA-Ligase	
ad 20 µ1	H ₂ O	

benötigt das Enzym dafür ATP. Um DNA-Stränge (Insert und Vektor) miteinander zu verknüpfen wurde folgender Ligations-Ansatz angesetzt:

Für die Ligation von Oligo-Fragmenten und einem geöffneten Vektor der Oligo-Klonierung wurde verwendet:

Für den Ligations-Ansatz wurden verwendet:		
10 µ1	Vektor (50 % des Endvolumens einer Gelelution)	
1 µ1	Oligonukleotide (5 % des Endvolumens der Gelelution nach der Oligo-Klonierung)	
2 µ1	10 x Ligase-Puffer (NEB)	
1 µ1	T4-DNA-Ligase	
ad 20 µ1	H ₂ O	

Die Ligations-Ansätze wurden für 30 min bei RT oder über Nacht (üN) bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 μ l des Ansatzes in elektrokompetende *E. coli*-Bakterien transformiert (Kap. 4.1.8).

4.1.7 Zielgerichtete Mutagenese

Um eine gezielte Mutation in einem Vektor hervorzurufen, wurde das *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* verwendet. Durch spezifisch generierte Primer kann man auf diesem Weg Nukleotide austauschen, deletieren oder hinzufügen, um z.B. Schnittstellen für Restriktionsenzyme zu generieren.

Für den Mutagenese-Ansatz wurden verwendet:			
2 µ1	10 x Reaktionspuffer (Stratagene)		
50 ng	dsDNA Template		
1 µ1	$10\mu\text{M}$ Primer 5'		
1 µ 1	$10\mu\text{M}$ Primer 3'		
1 µ1	dNTPs		
2,5 U	PfuTurbo-DNA-Polymerase		
ad 20 µ1	H ₂ O		

PCR-Protokoll:			
Zyklen	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	30 sec	
	95 °C	30 sec	
16	58 °C	1 min	
	68 °C	1 min / [Kb] Plasmid	
1	68 °C	7 min	

Anschließend wurde der PCR-Ansatz 30 min mit 2 μ l der Restriktionendonuklease DpnI bei 37 °C verdaut, wodurch die methylierte Ursprungs-DNA zerstört wurde.

Der verdaute Mutagenese-Ansatz wurde mit 5 μ l 3 M Na-Acetat und 125 μ l 100 % Ethanol vesetzt und für 30 min bei -70 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde für 20 min bei 20000 g zentrifugiert und das Pellet mit 250 μ l 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und anschließend in 20 μ l H₂O aufgenommen. Die Transformation in *E. coli*-Bakterien erfolgte mit 4 μ l dieses Ansatzes. Anschließend wurden mehrere Klone gepickt, die DNA isoliert und die Mutation anhand von Kontroll-Restriktionen und Sequenzierungen kontrolliert.

Erhält man nach dem oben angegebenen PCR-Protokoll keine positiv mutierten Klone, wurde die PCR-Reaktion auf zwei Ansätze verteilt. So wurde die Mutation unabhängig voneinander auf dem forward- und auf dem reverse-Strang induziert. Anschließend wurden beiden Reaktionsanätze vereint und mit Hilfe der DNA-Polymerase komplementiert.

Für den Mutagenese-Ansatz wurden verwendet:			
Probenreaktion A		Probenreaktion B	
2,5 µ1	10 x Reaktionspuffer	2,5 µl	10 x Reaktionspuffer
25 ng	dsDNA Template	25 ng	dsDNA Template
125 ng	Oligonukleotidprimer 5'	125 ng	Oligonukleotidprimer 3'
0,5 µ1	dNTPs	0,5 µ1	dNTPs
2,5 U	PfuTurbo-DNA-Polymerase	2,5 U	PfuTurbo-DNA-Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O	ad 25 µl	H ₂ O

Für den	Mutagenese	-Ansatz wu	rden verwe	ndet:

PCR-Protokoll:			
Zyklen Temperatur		Zeit	
1	95 °C	30 sec	
3	95 °C	30 sec	
	55 °C	1 min	
	68 °C	1 min / [kb] Plasmid	
3	95 °C	30 sec	
	45 °C	1 min	
	68 °C	1 min / [kb] Plasmid	

Ansätze A und B wurden vereint und 2,5 U PfuTurbo-DNA-Polymerase dazugegeben.

PCR-Protokoll:		
ZyklenTemperaturZeit		Zeit
1	95 °C	30 sec
	95 °C	30 sec
16	50 °C	1 min
	68 °C	1 min / [Kb] Plasmid
1	68 °C	7 min

Anschließend erfolgte auch hier ein DpnI-Verdau, die DNA-Fällung und die anschließende Transformation.

4.1.8 Transformation von E. coli-Bakterien mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von DNA in E. coli-Bakterien wurden elektrokompetente E. coli-Bakterien $(DH5\alpha)$ verwendet. 40 µl der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die entsprechende Menge DNA dazugegeben (1 µl bei Retransformationen, 4 µl bei Mutagenesen oder Ligationsansätzen). Der Bakterien-DNA-Ansatz wurde komplett in eine vorgekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte im GenePulser Xcell Elektroporationssystem bei einer Spannung von 1250 V und einer elektrischen Kapazität von 25 μ F. Der Ansatz wurde in 500 μ l LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf selektiven Agarplatten ausplattiert (Kap. 4.2.1).

4.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA und Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde die Didesoxymethode nach Sanger benutzt [82]. Hierbei wurden Didesoxynukleosidtriphosphate eingesetzt, welche mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert waren. Die durch die Didesoxynukleosidtriphosphate entstehenden Kettenabbruchprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Enden, welche mit dem Fluoreszenz-Farbstoff markiert waren, mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Für die Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v3.0 Kit verwendet.

	Für den Sequenzier-Ansatz wurden verwendet:
0,9 µg	Plasmid-DNA
1 µ 1	$10\mu M$ Oligonukleotidprimer
1,5 µ1	5 x Sequenzierpuffer (BigDye Terminator v3.0 Kit)
1 µ 1	BigDye (BigDye Terminator v3.0 Kit)
ad 10 µ1	H ₂ O

PCR-Protokoll:		
Zyklen Temperatur Zeit		Zeit
	95 °C	10 sec
25	50 °C	5 sec
	60 °C	4 min
	4 °C	8

Nach der PCR wurde die DNA mit 42 μ l Präzipitationsmix gefällt, bei 13000 g pelletiert und mit 125 μ l 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in einer SpeedVac für 15 min getrocknet und anschließend im institutseigenen Sequenzierlabor sequenziert. Dort wurde die Probe in 20 μ l Hi-DiTM Formamid resuspendiert und in den automatischen Sequenzierer ABI PRISMTM 3100 Avant Genetic Analyzer gegeben. Die Daten wurden mit der Software SeqManTM 2 (DNA-Star) ausgewertet.

DNA-Präzipitationsmix	1,45 ml H ₂ O; 300 μ l 3 M Natriumacetat (pH 4,6); 6,25 ml 100 %
	Ethanol

4.1.10 Quantitative real-time PCR

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) ist es möglich die Amplifikation und den Nachweis einer mRNA simultan in einem Reaktionsgefäß ablaufen zu lassen. Die gRT-PCR, welche auf der TaqMan® PCR (Perkin Elmer Applied Biosystems) beruht, zeichnet sich zunächst durch eine Oligonukleotid-Sonde aus, die an ihrem 5'-Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff VIC oder FAM besitzt (GAPDH: VIC; ET_BR / CRF₁R: FAM). An ihrem 3'-Ende befindet sich ein Quencher. Bei intakten TaqMan®-Sonden wird die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung unterdrückt. Die Sonde bindet im amplifizierten Bereich des Gens. Die forward und reverse Primer wurden so gewählt, dass deren Sequenz sich über zwei aufeinanderfolgende Exons erstreckt, so dass nur mRNA amplifiziert wird, nicht aber genomische DNA. Während der PCR werden durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase einzelne Nukleotide der Sonde in 5'-3'-Richtung entfernt. Dadurch gelangt die Reporterfluoreszenz in räumliche Entfernung zum Quencher und wird nicht mehr unterdrückt. Als Maß für die Menge an cDNA wurde der threshold cycle (C_T)-Wert angegeben, welcher den Zyklus angibt, in dem zum ersten Mal ein vom unspezifischen Hintergrund signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal messbar ist. Bei einem niedrigen C_T -Wert liegen weniger cDNA Kopien vor als bei einem hohen [83].

Für die Durchführung einer qRT-PCR wurden HEK293-Zellen einer 35 cm Zellkulturschale abgelöst und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 μ l TRIzol aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert, wodurch es zu einer Lyse der Zellen und einer Inaktivierung von RNasen und anderen Enzymen kommt. Für die weitere RNA-Präparation wurde der Arbeitsplatz mit *RNase away* gereinigt und nur spezielle Spitzen und Lösungen, welche ausschließlich für die RNA-Präparation ausgewiesen sind, benutzt. Im Phenol des TRIzols lösen sich die Proteine und die DNA. Durch Zugabe von 100 μ l Chloroform und gutes Durchmischen, einer weiteren Inkubationszeit von 3 min und Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C) erfolgte die Phasentrennung. Danach waren drei Phasen zu erkennen. Die obere, wässrige Phase enthielt RNA, die Interphase DNA und die untere Phenolphase Proteine. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 250 μ l Isopropanol präzipitiert. Dafür wurde die Lösung wieder gut durchmischt, anschließend 10 min bei RT inkubiert und für 15 min zentrifugiert (12000 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 μ l 70 prozentigem Ethanol aufgenommen. Zur Aufreinigung der RNA wurde das *RNaesy Mini Kit* verwendet (Durchführung laut Hersteller).

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde das Kit SS III First strand synthesis super mix verwendet. Das Ansetzen der ersten Reaktion, zum Anlagern der Primer, erfolgte wie in der nachstehenden Tabelle beschrieben. Die Inkubation erfolgte bei 65 °C für 5 min.

	Für den Ansatz der reversen Transkription wurden verwendet:
1 µ1	Random hexamere
1 µ1	Annealingpuffer
1 µg	RNA (Probe)
ad 8 µ1	RNase / DNase freies H ₂ O

Zu diesem Ansatz wurden $10 \,\mu l \, 2 \,x$ first strand buffer und $2 \,\mu l \, SS \, III \, RNase$ out enzyme mix hinzugegeben (Verwenden eines Mastermixes). Die reverse Transkription erfolgte zunächst bei $25 \,^{\circ}C \, (5 \,\text{min})$ und anschließend bei $50 \,^{\circ}C \, (50 \,\text{min})$. Zur Kontrolle der DNase-Behandlung und dem nicht-Binden des Primers an genomische DNA wurde in eine Probe keine reverse Transkriptase gegeben.

	Für den qRT-PCR-Ansatz wurden verwendet:
$1 \mu l$	cDNA (Probe)
10 µ 1	Master-Mix
1 µ 1	Gen1-Primer
1 µ 1	GAPDH-Primer
7 µ1	RNase freies H ₂ O

Zur Kontrolle des Versuches wurde eine Probe ohne cDNA (Probe) und eine Probe ohne Primer mitgeführt. Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des *StepOne*TM RT-PCR Systems durchgeführt und mit Hilfe der *StepOne* Software ausgewertet.

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von E. coli-Stämmen

Die Kultivierung von transformierten *E. coli*-Stämmen erfolgte in Kanamycin-haltigem Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) oder auf Kanamycin-haltigen Agarplatten. Zum Animpfen einer LB-Flüssigkultur wurde ein *E. coli*-Klon von einer Agarplatte gepickt. Die ausplattierten Agarplatten oder angeimpften LB-Kulturen wurden üN bei 37 °C inkubiert. Für eine ausreichende Sauerstoffversorgung wurden die Flüssigkulturen während der Inkubation geschüttelt. Zur längerfristigen Lagerung von transformierten *E. coli*-Stämmen wurde 1 ml einer frischen üN-Kultur und 500 μ l autoklaviertes Glyzerin zusammengegeben und bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	10 g/l Pepton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
LB-Agarplatten	12 g Agar/1 LB-Medium
Kanamycin (LB-Medium / LB-Agarplatten)	$30 \mu g/ml$

4.2.2 Herstellung elektrokompetenter E. coli-Bakterien

Zur Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Bakterien wurde der Stamm DH5 α verwendet. Aus einem Glyzerolstock wurden 250 ml LB-Medium angeimpft und üN bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 x 8 ml der Übernachtkultur in je 492 ml LB-Medium überführt (21-Kolben) und bei 37 °C inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 0,35 und 0,4 lag. Anschließend erfolgte eine Inkubation der beiden Kolben für mindestens 25 min auf Eis und eine anschließende Verteilung der Suspensionen auf 4 Zentrifugengefäße. Nach Zentrifugation bei 1000 g (15 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die Pellets in 250 ml kaltem Wasser resuspendiert. Anschließend erfolgte wieder eine Pellettierung der Bakterien durch Zentrifugation. Jeweils zwei der Pellets wurden in 250 ml eiskaltem 10 prozentigem Glyzerin vereint. Die Bakterien wurden wieder zentrifugiert, die Pellets in je 10 ml eiskaltem 10 prozentigem Glyzerin aufgenommen und in zwei sterile Falcons überführt. Die Bakterien wurden bei 1000 g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert und zusammen in 2 ml GYT-Medium vereint. Die Bakteriensuspension wurde in 40 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

GYT-Medium 10 % Glyzerol; 0,125 % Hefeextrakt; 0,25 % Trypton

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Beschichtung von Deckgläsern und Platten mit Poly-L-Lysin

HEK293-Zellen lösen sich sehr leicht von Deckgläsern und Lochplatten ab. Um ein Ablösen zu vermeiden, wurden Oberflächen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Die negativ geladene Membran der Zellen wird von der positiv geladenen Poly-L-Lysin-Schicht gebunden.

Zur Beschichtung wurde eine 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin-Lösung hergestellt. Davon wurden $500 \,\mu$ l auf ein 30 mm-Deckglas oder in ein Loch einer 24-Lochplatte pipettiert. Die Lösung wurde nach 30 min abgesaugt und die Oberfläche unter sterilen Bedingungen getrocknet.

4.3.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung von HEK293-, HepG2-, Jurkat- und HASM-Zellen erfolgte in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM-Medium) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 2 mM L-Glutamin. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

4.3.3 Transfektion von HEK293-Zellen

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde das Transfektionsmittel Polyethylenimin (PEI) verwendet. PEI wurde so aufgearbeitet wie von Polysciences Europe GmbH beschrieben. Einen Tag nach der Aussaat der HEK293-Zellen erfolgte die Transfektion, wenn die Zellen zu ca. 70 % konfluent waren. Für die Transfektion wurde PEI in FKS-freies DMEM-Medium (Transfektionsmedium) gegeben und bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge DNA (nachstehende Tab.). Nach einer weiteren Inkubation bei RT für 20 min wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben.

Zellkulturschale	Zellzahl [x 10 ⁵]	Transfektionsmedium [ml]	ΡΕΙ [μ1]	DNA [µg]
24 Loch	0,7	0,1	1,5	0,6
12 Loch	2	0,1	3	1,2
6 Loch	3	0,2	2	0,8
6 cm	8,7	0,5	4	1,6



Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der verwendeten GPCR-Konstrukte

Alle in dieser Arbeit verwendeten GPCR-Konstrukte sind mit GFP oder Kaede am C-Terminus fusioniert und befinden sich im pEGFP-N1- bzw. pKaede-MN1-Vektor. Damit wird eine mikroskopische oder durchflusszytometrische Quantifizierung ermöglicht. (SP) Signalpeptid, (SAS) Signalankersequenz, (1./7.TM) 1./7. Transmembrandomäne, (GFP) green fluorescent protein. Die Konstrukte, welche transfiziert wurden, sind in Abb. 4.1 schematisch dargestellt. Mit Hilfe der C-terminalen Markierung mit dem *green fluorescent protein* (GFP) bzw. Kaede war eine zelluläre Lokalisation und Quantifizierung möglich.

4.3.4 AlamarBlue®-Zytotoxizitätsassay

AlamarBlue® ist ein nicht toxischer Indikator für den Zellmetabolismus, welcher auf dem blauen Redoxfarbstoff Resazurin beruht. In lebenden, vitalen Zellen wird Resazurin allmählich irreversibel zu pinkfarbenem Resorufin reduziert. Zytotoxische Stoffe verlangsamen oder stoppen diese Reduktion abhängig von ihrer Toxizität. Für einen Toxizitätstest wurden HEK293-Zellen in einer 96-Lochplatte ausgesät. Nach 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit der zu testenden Substanz in steigenden Konzentrationen. Nach weiteren 24 h wurde zu dem Medium der Zellen das *alamarBlue*®-Reagenz dazugegeben (Verdünnung 1 : 10) und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Farbumschlag konnte bei einer Wellenlänge (λ_{exc}) von 570 nm und einer Referenzwellenlänge (λ_{em}) von 600 nm mittels eines Plattenlesegerätes gemessen werden [84].

4.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen. Neben den Streulichteigenschaften (Vorwärtsstreulicht (*Forward-Scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC)) mit denen die Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden kann, kann auch die Fluoreszenz einer vorher mit einer bestimmten Wellenlänge angeregten fluoreszierenden Gruppe gemessen werden. Zur Bestimmung der Gesamt-Fluoreszenz eines GFP- oder Kaede-gekoppelten Rezeptors in HEK293-Zellen wurden diese in einer 12-Lochplatte ausgesät. Die transiente Transfektion erfolgte 24 h nach der Aussaat. Einen Tag später wurde die Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Dafür wurden die Zellen mit 1 ml PBS mechanisch von der Lochplatte abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 250 μ l PBS aufgenommen. Die GFP-Fluoeszenz bzw. Fluoreszenz des grünen Kaedes wurde mit Hilfe des Fluoreszenzkanals 1 (Fl-1) des Durchflusszytometers bestimmt. Die mathematische Analyse erfolgte, nach dem Exportieren der Daten, mit Hilfe von GraphPad Prism. Es erfolgte nur die Auswertung lebender Zellen (Gate 1), welche mit Hilfe des FSC und SSC bestimmt wurden. Fluoreszenzintensitäten bis 10¹ wurden als Autofluoreszenz definiert, die bei allen Zellen (d.h. auch bei nicht-transfizierten) vorhanden ist. Für eine Quantifizierung der GFP- bzw. Kaede-Fluoreszenzen und damit des Cotransin-Effektes wurden die Fluoreszenzintensitäten von 10⁴ Zellen addiert und als Maß für die Expressionsstärke benutzt. Nach erfolgter Transfektion verlief die Expression und der Transport der Rezeptoren recht schnell. Um den Teil der GFP-markierten Rezeptoren mit zu berücksichtigen, welcher schon vor Cotransin-Zugabe vorhanden war, wurden transfizierte Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt ($20 \mu g/ml$, 17 h). Dieser Wert und der Wert für Zellen, welche mit einem Leervektor transfiziert und mit Cotransin behandelt wurden, wurden in der Auswertung mit berücksichtigt.

10 x PBS 80 g/1 NaCl; 2 g/1 KCl; 11,5 g/1 Na₂HPO₄; 2 g/1 KH₂PO₄ (pH 7,4)

4.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisationsbestimmung und Quantifizierung von GFP- bzw. Kaede-markierten Rezeptoren in transient transfizierten HEK293-Zellen erfolgte mikroskopisch mit Hilfe des konfokalen *Laser-Scanning-Microscope* (LSM). HEK293-Zellen wurden dazu auf einem beschichteten 30 mm Deckglas in einer 6-Lochplatte ausgesät und einen Tag später transfiziert. Nach 24 h konnten die Zellen analysiert werden (100er Objektiv). Die Einstellungen erfolgten individuell entsprechend der Fluoreszenz-Intensitäten. GFP und grünes Kaede (gKaede) wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm detektiert, Trypanblau und rotes Kaede (rKaede) bei einer Wellenlänge von 543 nm.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich Proteine eines Proteingemisches nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Proteine wurden durch Zugabe des SDS-haltigen *RotiLoad*-Probenpuffers denaturiert, wodurch nicht kovalente Proteinaggregate aufgelöst wurden und die Proteine eine negative Ladung erhielten. Durch das Anlegen einer Spannung wurden die Proteine mit Hilfe eines Acrylamidgels (Zusammensetzung siehe nachstehende Tabelle) nach ihrer Größe getrennt. Durch den Vergleich mit einem Proteingemisch mit bekannten Molekülmassen (*prestained protein ladder*) ließ sich die Molekülmasse unbekannter Proteine abschätzen. Die denaturierten Proteine wurden auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Elektrophoresepuffer (20 mA pro Gel).

Elektrophoresepuffer	30,3 g/l Tris; 144,1 g/l Glyzin; 10 g/l 0,1 % SDS
Sammelgel (4%)	835 µl 30 % / 0,8 % Acrylamid–Bisacrylamid; 625 µl 0,625 M Tris-HCl
	(pH 6,8); 25 µl 20 % SDS; 5 µl TEMED; 3,5 ml H ₂ O; 25 µl 10 % APS
Trenngel (8%)	3 ml 30 % / 0,8 % Acrylamid–Bisacrylamid; 5,625 ml 0,75 M Tris-HCl
	(pH 8,8); 56,5 µl 20 % SDS; 5,65 µl TEMED; 2,5 ml Wasser; 79 µl
	10 % APS

4.6.2 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die Seitenketten von Aminosäuren anlagert und zum Anfärben von Proteinen verwendet wird. Dafür wurde das Proteingel für 1 h bei RT in Coomassie-Brillian-Blau-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte mit Hilfe der Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung ebenfalls bei RT üN. Dadurch wurde der Coomassie-Brilliant-Blau-Farbstoff aus dem Gel gelöst und blieb spezifisch an den Proteinbanden gebunden.

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	0,625 g Coomassie (G-250); 125 ml Methanol;
	100 ml H ₂ O; 25 ml Essigsäure
Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärber	10% Essigsäure; 10% Methanol

4.6.3 Detektion von immobilisierten Proteinen auf Membranen (Western-Blot)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine eines Proteingemisches wurden aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde das Nass-Blot-Verfahren angewendet. Der Transfer erfolgte in 1 x Blot-Puffer, bei 2,5 mA/cm² und 4 °C unter Verwendung eines Eisakkus für 90 min. Zum Blockieren von freien Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT in Blockpuffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Membran mit 1 x TBST. Anschließend wurde die Membran in 3 prozentiger BSA-TBST-Lösung mit dem primärem monoklonalen Antikörper (Maus-anti-GFP-IgG, 1:4000) inkubiert (4 °C, üN). Die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper konnten durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBST entfernt werden. Für die Detektion wurde die Membran in 3 prozentiger BSA-TBST-Lösung mit einem polyklonalem Peroxidase-konjugiertem Zweit-Antikörper (Ziegeanti-Maus, 1:2000) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion über die Zugabe eines chemilumineszierenden Substrats, wie vom Hersteller beschrieben. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe des *LumiImager*-F1TM detektiert.

10 x Blot-Puffer	24 g/l Tris; 112,6 g/l Glycin; (pH 8,3) (zum
	Gebrauch dazugeben: 20% Methanol; $0,015\%$
	20%SDS)
10 x TBST	30 g/1 Tris, 80 g/1 NaCl, pH 7,2, 5 ml Tween 20
Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung	10 % APS in H ₂ O; Lagerung bei -20 °C
Blockpuffer	5 % Milchpulver in TBS-T; 0,1 % NaN_3

4.6.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation von HEK293-Zelllysaten wurde ProteinA-Sepharose verwendet. ProteinA ist ein bakterielles Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur F_c-Region von Immunglobulinen (Ig) der G-Klasse, wodurch die Kopplung an Antikörper ermöglicht wird. 100 mg Sepharose wurde in 30 ml PBS aufgenommen und bei 4 °C 20 min quellen gelassen. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 1125 g zentrifugiert und 2 x mit PBS gewaschen. Am Ende wurde die Sepharose in 10 mg / ml PBS aufgenommen und 0,02 % NaN₃ für eine längere Lagerung bei 4 °C dazugegeben. Für das Proteinlysat einer 10 cm Petrischale wurden 10 mg Sepharose benötigt. Dazu wurden 2 μ l polyklonaler Kaninchen-GFP Antikörper gegeben und üN im Rotator bei 4 °C gekoppelt. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung mit der Sepharose für 2 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Für die Herstellung von HEK293-Zelllysaten wurden HEK293-Zellen in einer 10 cm Petrischale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Mit 1 ml Lysispuffer erfolgte das Lysieren der Zellen für 1 h (200 rpm, 4 °C). Die Zelltrümmer wurden bei 20000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu der Antikörper-gekoppelten Sepharose gegeben und üN bei 4 °C im Rotator inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschen des Pellets: 2 x mit Waschpuffer 1, 1 x mit Waschpuffer 2 (300 g, 2 min).

Lysispuffer	10 ml Puffer A; 125 μ l PMSF; 80 μ l PI-Cocktail
Puffer A	6 g / l Tris (pH 8,0); 8,8 g / l NaCl; 0,37 g / l EDTA (pH 8,0); 1 % Triton X-100;
	0,1 % SDS
Waschpuffer 1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 % Triton
	X-100; 0,1% SDS
Waschpuffer 2	50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 1 mM EDTA (pH 8,0); 0,5 % Triton X-100; 0,1 %
	SDS

4.6.5 Glykosidaseverdau von immunpräzipitierten GPCR

Der Glykosidasverdau von immunpräzipitierten GPCR erfolgte direkt an den an der Sepharose gekoppelten Rezeptoren unter Verwendung der Peptidendoglykosidase F (PF) und der Endoglykosidase H (EH). EH spaltet nur die mannosereichen N-Glykosylierungen der Proteine, während PF sowohl die mannosereichen als auch die komplexen N-Glykosylierungen entfernt. Für einen Verdau von GPCR mit PF und EH wurde der Überstand des Sepharosepellets restlos mit einer Mikroinjektionsspritze abgesaugt. Zu der Sepharose wurde PBS und der zu den Enzymen mitgelieferte Denaturierungspuffer gegeben (nachstehende Tab.). Durch Erhitzen auf 95 °C wurde sichergestellt, dass die Disulfidbrücken gespalten wurden, um ein Binden der Endoglykosidasen zu gewährleisten. Nach kurzem Abkühlen wurden die entsprechenden Puffer und 500 U des Enzyms dazugegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 4 x *RotiLoad*-Probenpuffer und PBS hinzugefügt. Die Entkopplung der Proteine von der Sepharose und die Denaturierung erfolgte bei 95 °C.

unverdaut	ЕН	PF			
22,5 µl PBS	23,7 µl PBS	21,75 µl PBS			
2,5 μ l 10 x Denaturierungspuffer	2,64 µl 10 x Denaturierungs-	$2,42 \mu$ l 10 x Denaturierungs-			
	puffer	puffer			
10 min, 95 °C					
25μ l 4 x Probenpuffer	2,64 µl G5	2,42 µl G7			
50 µl PBS	1 µ1 EH	2,42 μl NP-40			
		1 µ1 PF			
	1 h, 37 °C				
$10 \mu l 4 \mathrm{x}$ Probenpuffer					
45,5 µl PBS					
3 min, 95 °C					

4.6.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford, unter kalorimetrischen Bedingungen. Coomassie-Brillantblau bildet in saurer Umgebung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Der ungebundene Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm, was photometrisch gemessen werden kann.

Die zu analysierenden Proben wurden mit H₂O und 50 μ l 2 M NaOH auf ein Endvolumen von 100 μ l verdünnt. Nach Erhitzen (60 °C, 10 min) und anschließendem Abkühlen auf RT wurde 1 ml

Bradford-Reagenz dazugegeben und die Absorption bei 595 nm am Photometer bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde eine Standartkurve bekannter Proteinkonzentrationen erstellt (BSA: 1, 2, 5, 10, 20, 40 μ g). Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer quadratischen Gleichung aus der Standartkurve interpoliert.

Bradford-Reagenz 0,1 g/l Coomassie-Brillantblau G250; 4,25 % v/v Ethanol; 8,5 % v/v Phosphorsäure

4.6.7 Zellfraktionierung

Zellen können in Membranbestandteile und zytoplasmatische Bestandteile fraktioniert werden. Die Zellfraktionierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Abcam zur Zellfraktionierung [85]. Aufgrund von Sucrose im Fraktionierungspuffer ist eine Gradientenzentrifugation möglich, bei der die einzelnen Zellkompartimente, wie Zellkern, Plasmamembran und Zytoplasma, in einzelnen Zentrifugationsschritten aufgetrennt werden können. Durch die Anwesenheit von Ionen kann eine strukturerhaltene Wirkung der Zellkerne und Ribosomen erzielt werden. Störende Kationen werden durch die Chelatoren Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) eliminiert. Proteasen werden durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren wie Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Dithiothreitol (DTT) inhibiert. Für die Zellfraktionierung wurden HEK293-Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit DMSO bzw. Cotransin behandelt. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, 2 x mit eiskaltem PBSI gewaschen und in $100 \,\mu$ l Fraktionierungspuffer gepottert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4 °C erfolgte die Abzentrifugation der Zellkerne bei 720 g (5 min). Anschließend wurde der Überstand bei 10000 g zentrifugiert (5 min). Die Trennung der Zytosolfraktion von der Membranfraktion erfolgte mittels Ultrazentrifugation bei 100000 g für 1 h. Für die letzte Trennung wurde der Überstand (Zytosolfraktion) erneut zentrifugiert und das Pellet (Membranfraktion) mit Fraktionierungspuffer gewaschen (100000 g, 45 min). Zum Auftragen auf ein SDS-Gel wurde der Zytosolfraktion 40 µl 4 x Rotiload-Probenpuffer zugefügt, die Membranfraktion wurde in 50 µl 1 x Rotiload-Probenpuffer aufgenommen.

Fraktionierungspuffer	250 mM Sucrose; 20 mM HEPES (pH 7,4); 10 mM
	KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; kurz
	vor Gebrauch zu 10 ml dazugeben: 1 mM DTT; 80 μ l
	PI Cocktail; 125 µl 40 mM PMSF
PBSI	10 ml PBS; 80 μ l PI Cocktail
Protease-Inhibitor-Mix (PI-Cocktail)	0,4 mg/ml Trypsin Inhibitor Typ IS Soybean;
	0,25 mg/ml Aprotinin; 9,8 mg/ml Benzamidin

4.6.8 Absorptionsspektroskopie

Es ist möglich, das Spektrum von Kaede zu bestimmen, in dem die Absorption gemessen wird, die eingestrahltes Licht beim Durchgang durch Kaede erfährt. Eine Absorption erfolgt dann, wenn die Lichtfrequenz mit einer Resonanzfrequenz von Kaede übereinstimmt. In diesem Fall bewirkt das Licht den Übergang von einem tieferen in ein höher liegendes Energieniveau der Atmone bzw. Moleküle [86].

Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums von Kaede markiertem ET_BR wurden HEK293-Zellen in einer 12-Lochplatte ausgesät. Die transiente Transfektion mit ET_BR .Kaede erfolgte 24 h nach der Aussaat. Am nächsten Tag wurden die Zellen eines Lochs in 250 µl PBS aufgenommen und in eine Helma-Quarzküvette QS mit 3 mm Schichtdicke überführt. Das Spektrum wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers aufgenommen. Die Messung erfolgte von 495 – 750 nm in 0,1 nm Schritten, bei einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min und einer Spaltbreite von 1 nm.

4.7 Pharmakologische Methoden

4.7.1 [¹²⁵I]ET-1-Bindungsassay

Mit Hilfe des ET_BR -Liganden Endothelin-1 (ET-1) und seinem radioaktiv markierten Analogon ist es möglich, die Anzahl an ET_BR in der Plasmamembran (maximale Bindung, B_{max}) sowie deren Liganden-Affinität (Dissoziationskonstante, K_D) zu bestimmen. Die spezifische Bindung von ET-1 wird aus der Differenz von gesamter und unspezifischer Bindung berechnet. Dies ist notwendig, weil Liganden auch unspezifisch an die Plasmamembran binden können. Um die unspezifische Bindung zu messen, wird gebundener, radioaktiv markierter Ligand mit Hilfe des unmarkierten Liganden verdrängt, bis nur noch die unspezifischen Bindungsstellen besetzt sind [87]. Dafür wurden HEK293-Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h transfiziert. Die Behandlung der Zellen mit DMSO bzw. 30 μ M Cotransin erfolgte 5 h nach der Transfektion. Nach weiteren 17 h wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und in 1 ml Tris-Bame Puffer resuspendiert.

Tris-Bame Puffer50 mM Tris-HCl; 2 mM EGTA in 11 H2O lösen (pH 7,5); 10 mM MgCl2,
15 mg Aprotinin; 213 mg Bacitracin

Mit Hilfe eines Potters erfolgte das Zerstören der Zellen. Nach Zentrifugation bei 26000 g für 35 min bei 4 °C wurden die ausgefallenen Plasmamembranen in 150 μ l Tris-Bame Puffer aufgenommen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit [¹²⁵I]ET-1 in den entsprechenden Konzen-

trationen bei 4 °C (verzögert Rezeptorinternalisierung). Nicht spezifische Bindung wurde durch Zugabe von 1 μ M unmarkiertem ET-1 in die Auswertung nicht mit einbezogen. Anschließend wurden die Proben 2 x mit PBS gewaschen und mit 100 μ 1 0,1 M NaOH lysiert. Das Lysat wurde in entsprechende Gefäße überführt und die Radioaktivität mit Hilfe eines γ -Zählers quantifiziert [87].

4.7.2 Inositolphosphat-Akkumulationsassay

Die Stimulation des ET_BR führt zur Aktivierung der Phospholipase-C und zur Bildung des second *messengers* IP₃. Aus experimentellen Gründen kann IP₃ nicht einzeln, sondern nur die Summe (IP_x) aus IP₃, Inositolmonophosphat und Inositoldiphosphat gemessen werden. Zur IP_x-Bestimmung wurden HEK293-Zellen in einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Lochplatte ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen und nach weiteren 5 h die Behandlung mit DMSO bzw. 30 µM Cotransin (in DMSO gelöst) und 0,5 ml myo-[2-³H]-Inositol pro Loch (74 kBq / ml in Zellkulturmedium, spezifische Aktivität = 630 GBq/mmol). Nach 20 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit Inkubationspuffer gewaschen und in Inkubationspuffer mit steigenden 8-Arginin-Vasopressin (AVP)-Konzentrationen (100 pM - 1 μ M) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen der Stimulationslösung konnten die Zellen mit 150 µl 0,1 M NaOH pro Loch lysiert werden. Zur Einstellung der geeigneten Ausgangsbedingungen für die Ionenaustauschchromatographie wurden die Lysate mit 50 µl 0,2 M Ameisensäure und 1 ml Akkumulationspuffer pro Loch versetzt und nach Überführung in Reaktionsgefäße zentrifugiert (20 min, 23000 g). Aus den Überständen konnte durch Anionenaustauschchromatographie IP_x vom überschüssigem Inositol getrennt werden. Zur Äquilibrierung wurden die Säulen nacheinander mit 0,5 M NaOH, Regenerationspuffer und Wasser behandelt. Nach Probenauftrag wurden die Säulen mit Wasser und Waschpuffer gewaschen und das gebundene IP_x mit 3,5 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde mit 16 ml Aquasafe 300 Plus Szintillator gemischt und die Zerfälle pro Minute mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen. Die Konzentrationswirkungskurve wurde mit dem Programm GraphPad Prism nach iterativer, nicht linearer Regression erstellt und die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) bestimmt.

Akkumulationspuffer	5 mM Natriumtetraborat; 0,5 mM EDTA
Elutionspuffer	0,1 M Ameisensäure; 0,4 M Ammoniumformiat
Inkubationspuffer	10 mM LiCl; 10 mM HEPES; 0,5 % w/v BSA in DMEM
Regenerationspuffer	0,1 M Ameisensäure; 3 M Ammoniumformiat
Waschpuffer	5 mM Natriumtetraborat; 60 mM Natriumformiat

4.8 Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in der Zellkultur und anschließende massenspektrometrische Expressionsanalyse

Die metabolische Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC)) erlaubt eine quantitative, massenspektrometrische Analyse. Aufgrund der Verwendung von leichten (*light*, L) und schweren (*heavy*, H) Aminosäuren in unterschiedlichen Zellpopulationen und dem daraus resultierenden Massenunterschied ist eine eindeutige Zuordnung von tryptischen Peptiden zu den Zellpopulationen (DMSO- bzw. Cotransin-behandelt) möglich (Abb. 4.2). Um sicherzustellen, dass nach dem tryptischen Verdau (Spaltung nach Lysin (Lys) und Arginin (Arg)) alle generierten Peptide eine markierte Aminosäure enthalten, wurden für die Markierung die Aminosäuren Lys und Arg verwendet.



Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des SILAC-Experimentes

Die Analyse der Proben erfolgte in der AG Massenspektrometrie am FMP in Berlin. Modifizierte Darstellung nach [88].

4.8.1 Behandlung der Zellen und Proteingewinnung

Die Durchführung der SILAC-basierten Analyse erfolgte unter Verwendung des *Pierce*® *SILAC Protein Quantitation Kits* ($^{12}C_6$ L-Lys enthalten) mit zusätzlichem Einsatz von schwerem Arg ($^{13}C_6$, $^{15}N_4$ L-Arg). Für die Herstellung der entsprechenden Medien wurden je 84 mg/l Arg und 146 mg/l Lys eingesetzt. Um einen möglichst vollständigen Einbau der Aminosäuren in den Metabolismus der Zellen zu erreichen, wurde je eine HepG2-Zellpopulation (L und H) parallel über fünf Verdopplungszeiten (ca. zwei Wochen) im entsprechenden Medium inkubiert (Abb. 4.2). Der Markierungsgrad wurde mittels massenspektrometrischer Analyse einer Zelllysatprobe bestimmt und ergab einen Einbau der isotopenmarkierten Aminosäuren von über 90 %.

Die Zellpopulationen wurden mit DMSO bzw. $30 \,\mu$ M Cotransin behandelt. Nach 17 h erfolgte eine Trennung des Mediums von den Zellen und eine Vereinigung der Medien bzw. der Zellen der unterschiedlich behandelten Populationen. Es folgte die Präparation der Zellmembranen (Kap. 4.6.7) und eine Trichloressigsäurefällung (Kap. 4.8.2) des Mediums. Die Proteine wurden anschließend reduziert und alkyliert (Kap. 4.8.3). Dabei kam es zur irreversiblen Spaltung der Disulfidbrücken, wodurch eine optimale Entfaltung der Proteine erreicht wurde und eine maximale Peptidausbeute und Sequenzabdeckung in der Massenspektrometrie sichergestellt werden konnte. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer SDS-PAGE. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Kap. 4.6.2) angefärbt. Daraufhin folgte das Zerschneiden der beiden Gelspuren und die Proben wurden für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet (Kap. 4.8.4).

4.8.2 Trichloressigsäurefällung

Proteine können mit Säuren aus wässriger Lösung durch Veränderung des pH-Wertes ausgefällt werden. Dazu wurde 1 Volumen 100 % Trichloressigsäure (TCA) zu 4 Volumen des zu fällenden Mediums gegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 13000 g abzentrifugiert (5 min) und das Pellet 3 x mit 200 μ 1 kaltem Aceton gewaschen. Zum Entfernen jeglicher Acetonrückstände wurde das Pellet für 10 min bei 95 °C getrocknet und in 50 μ 1 1 x *Rotiload*-Probenpuffer und 15 μ 1 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen.

4.8.3 Reduktion und Alkylierung

Die Reduktion und Alkylierung der in Proteinen enthaltenen Cystine bzw. Cysteine erfolgte durch DTT und Iodacetamid direkt vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel. Dabei wurden die Disulfidbrücken irreversibel getrennt und die Proteine optimal für die massenspektrometrische Analyse entfaltet. Dafür wurden zu den Proben DTT in einer Endkonzentration von 5 mM gegeben und

30 min bei 55 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde Iodacetamid zugegeben (Endkonzentration 15 mM) und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

4.8.4 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Zu jedem Gelstückchen wurden 100 μ l Wasch- und Schrumpfpuffer gegeben und bei 30 °C 10 min geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 100 μ l Equilibrier- und Verdaupuffer dazugegeben und wieder bei 30 °C geschüttelt (10 min). Der Überstand wurde verworfen. Die Dehydrierung der Gelstückchen erfolgte mit 50 μ l Acetonitril, der Überstand wurde verworfen und der im Gel verbleibende Anteil in der Vakuumzentrifuge entfernt (15 min). Im Anschluss erfolgte der tryptische Verdau mit 0,05 μ g Trypsin pro Gelstück bei 37 °C üN in 20 μ l Verdaupuffer. Die enzymatische Spaltung wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Abstopplösung und einer 10 minütigen Inkubation im Ultraschallbad abgestoppt. Der Überstand wurde in Glasvials überführt. Zu den Gelstückchen wurden nochmals 20 μ l Acetonitril gegeben und auch dieser Überstand wurde in Glasvials überführt. Die vereinigten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge eingeengt. Der Rückstand wurde in 6 μ l 5 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure gelöst.

Die tryptischen Peptidpärchen wurden mittels Flüssigchromatographie getrennt und mittels der Tandem-Massenspektrometrie (*Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) analysiert.

Abstopplösung	0,5 % Trifluoressigsäure in Acetonitril
Equlibrier- und Verdaupuffer	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 7,8)
Wasch- und Schrumpfpuffer	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat / Acetonitril 1:1

4.8.5 NanoLC-ESI-Tandem-Massenspektrometrie

Die Analyse der Proben erfolgte in der AG Massenspektrometrie am FMP in Berlin. Nach Trypsinspaltung der gelgetrennten Proteine wurden die LC-MS/MS-Analysen mit einem *LTQ Orbitrap* XL-Massenspektrometer, ausgestattet mit einem *Eksigent 2D NanoLC-System*, durchgeführt. Das LC-System war über eine Nanosprayquelle mit einem 10 μ m Innendurchmesser *PicoTip ESI Emitter* mit dem Massenspektrometer verbunden. 6 μ l der Probe wurden injiziert und auf einer Vorsäule unter Verwendung von 0,1 % Trifluoressigsäure und 2 % Acetonitril in H₂O aufkonzentriert. Nach Elution auf die analytische Säule wurden die Peptide mit einer Flussrate von 250 nl / min und einem linearen Gradienten von 0–40 % B in 50 min getrennt. Das Elutionssystem bestand aus A: 0,1 % Ameisensäure (FA) (v/v) in H₂O, B: 0,1 % FA (v/v) in Acetonitril. Die MS/MS-Spektren wurden im datenabhängigen Modus (*data dependent mode*) erstellt. Dazu wurde ein MS-*Scan* (Auflösung: 60000) in der Orbitrap und parallel MS/MS-*Scans* der fünf intensivsten Vorläuferionen in der LTQ erzeugt. Der Massenbereich des MS *Scan* war m/z 350–1500 mit einer dynamischen Ausschlusszeit für Vorläuferionen von 120 sec. Die automatische Ionenzahlmessung wurde auf 3 x 10⁶ und 20000 für Orbitrap-MS bzw. LTQ-MS/MS *Scans* gesetzt [89].

4.8.6 Proteinidentifizierung und Quantifizierung

Für SILAC-Experimente wurde die Identifizierung und Quantifizierung mittels der Software *MaxQuant* durchgeführt. Dafür wurden generierte Peaklisten (msm-Dateien) an eine Mascot-Suchmaschine übertragen und gegen eine IPI humane Proteindatenbank gesucht. Die Massentoleranz der Vorläufer- und Tochterionen wurde auf 7 ppm bzw. 0,35 Da gesetzt. Als variable Modifizierungen wurden sowohl Oxidationen am Methionin als auch Propionamidaddukte am Cystein berücksichtigt. Grundlage für die Einhaltung der Falschidentifizierungshäufigkeit (*false discovery rate*, FDR) mit < 0,01 war die statistische Fehlerwahrscheinlichkeit (*posterior error probability*, PEP) basierend auf einer implizierten inversen Nonsense-Datenbank. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn mindestens zwei Peptide der Sequenz zugeordnet werden konnten (*unique peptide*). Proteinverhältnisse wurden akzeptiert, wenn mindestens zwei Sequenzierungsereignisse (*ratio counts*) zur Quantifizierung beitrugen [89].

Von den identifizierten Proteinen wurden zunächst Verunreinigungen und Proteine, welche keine sekretorischen Proteine bzw. Membranproteine waren, aussortiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte auf Basis des quantitativen, normierten Verhältnisses der Peptide von Zellen welche mit DMSO behandelt worden sind, zu den Peptiden von Zellen welche mit Cotransin behandelt wurden (Abb. 4.2). Um mögliche Unterschiede zwischen den L und H Zellkulturen auszuschließen, wurde ein so genanntes *forward* (fw) und ein *reverse* (rev) Experiment (Überkreuzexperiment) durchgeführt (fw: H = DMSO, L = Cotransin; rev: L = DMSO, H = Cotransin).

4.9 BioPlex-Immunoassay

Es ist möglich die Zytokinausschüttung von mehreren Zytokinen im Medium von Zellen zu quantifizieren. Dafür wurde hier das *BioPlex Pro Human Cytokine 27-plex Assay Kit* verwendet, mit dem es möglich ist, 27 Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren zeitgleich zu bestimmen (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis):

GM-CSF	Eotaxin	FGF basic	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6
RANTES	IFN- γ	PDGF-bb	IL-7	IL-8	IL-9	IL-10	IL-12
MIP-1α	MIP-1 β	G-CSF	VEGF	IL-13	IL-15	IL-17	IL-1ra
TNF- α	IP-10	MCP-1					

Das System basiert auf Zytokinantikörpern, welche auf verschiedenfarbig fluoreszierenden Polysterolkügelchen immobilisiert sind (Abb. 4.3). Jedem Zytokinantikörper ist eine Art von Polysterolkügelchen mit spezifischer Fluoreszenz zugeordnet, wodurch später das Zytokin identifiziert werden kann. Die Quantifizierung erfolgte über einen zweiten Phycoerythrin (PE)-markierten Antikörper. Die Analyse wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Durch den ersten Laser erfolgte die Identifizierung des Polysterolkügelchen und somit des Zytokins, mit dem zweiten Laser wurde die PE-Intensität gemessen und somit die Quantifizierung vorgenommen. Mit Hilfe einer Eichkurve bekannter Zytokin-Konzentrationen wurde die genaue Quantifizierung vollzogen. Die Durchführung erfolgte gemäß Anleitung des Herstellers.

Für die Quantifizierung von sekretierten Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurden 500000 Jurkat-Zellen und 1 x 10⁶ human airway smooth muscle cells (HASM-Zellen) in 24-Lochplatten pro Loch ausgesät. Einen Tag später erfolgte die Stimulation der Zellen und die gleichzeitige Zugabe von DMSO bzw. Cotransin. Jurkat-Zellen wurden mit 1 μ M Ionomycin und 50 ng/ml Phorbol 12-Myristat-13-Azetat (PMA) stimuliert. PMA ist ein Phorbolester, welcher die Proteinkinase C bindet und aktiviert. Ionomycin ist ein Calciumionophor und induziert die Freisetzung von Calciumionen. Beide Substanzen führen so zur Aktivierung von T-Zellen und somit zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. HASM-Zellen wurden mit Medium stimuliert, welches den gelösten Zigarettenrauch von zwei Zigaretten enthielt. Nach weiteren 17 h wurde das Medium von den Zellen getrennt und bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren. Für eine Normierung der späteren Ergebnisse auf die Zellzahl wurde die Vitalität der Zellen mit Hilfe des *alamarBlue*®-Zytotoxizitätsassay bestimmt (Kap. 4.3.4). Die Durchführung des BioPlex-Immunoassays erfolgte im Rahmen eines Workshops der Firma BioRad.





5 Ergebnisse

Cotransin wurde als selektiver, reversibler Inhibitor der Proteintranslokation beschrieben, der die Translokation der Membranrezeptoren VCAM1, P-Selektin und CRF₁R sowie der sekretorischen Proteine β -Lactamase und Angiotensinogen am proteinleitenden Kanal der ER-Membran hemmt [46]. Bisher ist es unklar, ob es in den SP der Proteine eine Konsensus-Sequenz gibt, die für die Cotransin-Sensitivität verantwortlich ist. Ein Ziel dieser Arbeit war zunächst, den Effekt von Cotransin auf die Biosynthese von verschiedenen GPCR mit SP oder SAS zu analysieren. Dafür wurde unter anderem ein auf Kaede-Fusionsproteinen basierender Biosyntheseassay entwickelt [87]. Um weitere sensitive Proteine zu finden und gegebenenfalls eine Konsensus-Sequenz innerhalb der SP zu identifizieren, wurde eine SILAC-basierte, massenspektrometrische Expressionsanalyse durchgeführt. Darüber hinaus war es Ziel, ein Cotransin-Derivat zu finden, welches selektiv die Biosynthese einzelner GPCR inhibiert. Mit diesen neusynthetisierten Derivaten sollte auch eine erste Struktur-Wirkungsanalyse von Cotransin begonnen werden. Entsprechende Daten liegen bisher nur für die Ausgangssubstanz Hun-7293 vor.

5.1 Cotransin-abhängige Inhibition der Biosynthese einzelner GPCR

Die Analyse der Cotransin-Wirkung auf die Biosynthese von GPCR wurde im HEK293-Zellsystem durchgeführt. Aufgrund der Inhibition der Translokation durch Cotransin kann die Cotransin-Wirkung durch Messung der Expressionsstärke der Proteine verfolgt werden [46].

5.1.1 Wirkung von Cotransin auf HEK293-Zellen

Der inhibitorische Effekt von Cotransin auf die Biosynthese von GPCR wurde in HEK293-Zellen analysiert. Um die Toxizität von Cotransin in HEK293-Zellen zu untersuchen, wurde ein Zellvitalitätstest mit *alamarBlue*® durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle für den Toxizitätstest wurde das Zellgift Puromycin verwendet. Ab einer Konzentration von $10 \,\mu g$ /ml Puromycin ist ein toxischer Effekt in HEK293-Zellen (17 h Inkubation) zu beobachten (Abb. 5.1a). Cotransin hingegen zeigte bis zu einer Konzentration von $100 \,\mu M$ keine toxischen Effekte (Abb. 5.1b).



(b) Cotransin



Abbildung 5.1: Untersuchung der Zytotoxizität von Cotransin in HEK293-Zellen HEK293-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen Puromycin (a) und Cotransin (b) inkubiert (17 h). Anschließend erfolgte die Zugabe von *alamarBlue*[®]. Die metabolische Reduktion des Farbstoffes wurde analysiert (gemessene Wellenlänge λ_{exc} : 570 nm, Referenzwellenlänge λ_{em} : 600 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte (Differenz A570/A600, ±SD) aus drei unabhängigen Experimenten.

Ferner wurde die Zytotoxizität und der Einfluss auf die allgemeine Proteinbiosynthese von Cotransin in HEK293-Zellen mittels SDS-PAGE analysiert. Hierfür wurden HEK293-Zellen für 17 h mit 30 μ M Cotransin behandelt. Sowohl das gesamte Zelllysat als auch die fraktionierten Membranund zytosolischen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (Gradientengel, 4-12 %) getrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt (Abb. 5.2). Das Muster der Proteinbanden zeigt nach Cotransin-Behandlung keine wesentlichen Unterscheide im Vergleich zur Kontrolle. Dies weist darauf hin,



Abbildung 5.2: Einfluss von Cotransin auf die allgemeine Proteinbiosynthese in HEK293-Zellen HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (17 h, 30 μM). Nach Fraktionierung der Zellen, wurden die Proteine des gesamten Zelllysates, die der Membranfraktion und die der Zytosolfraktion mit Hilfe einer SDS-PAGE (Gradientengel, 4-12 %) getrennt und mittels Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

dass Cotransin in HEK293-Zellen keinen Effekt auf die allgemeine Proteinbiosynthese hat und wie beschrieben nur selektiv die Expression weniger Proteine inhibiert [46].

5.1.2 Wirkung von Cotransin auf die Biosynthese einzelner GPCR

Zur Analyse der Cotransin-Sensitivität von GPCR wurden zunächst zehn GPCR mit unterschiedlichen Signalsequenzen untersucht. Zu den GPCR mit SP zählt der Endothelin B Rezeptor (ET_BR), der Thyrotropin Rezeptor (TSHR), der CRF₁R, der ET_AR und der Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1) [91, 92]. Ferner wurde der CRF_{2a}R verwendet, der ein PSP besitzt, das nicht vom reifen Rezeptor abgespalten wird [93]. Der UTR₂, der Angiotensin II Rezeptor Typ-2 (AT₂R), der Vasopressin-Rezeptor Typ 1a (V_{1a}R) und der μ OR besitzen eine SAS, die Teil des reifen Proteins ist und nicht abgespalten wird [91,92]. Um die Rezeptoren lokalisieren und quantifizieren zu können, wurden C-terminal mit GFP-fusionierte Konstrukte verwendet, deren Fluoreszenzintensität als Maß der Expressionsstärke gemessen werden kann (Abb. 4.1).

HEK293-Zellen wurden transient mit den Rezeptor-Konstrukten transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 μ M Cotransin bzw. DMSO für 17 h behandelt. Die Verdünnungen von Cotransin in DMSO wurden dabei so gewählt, dass die resultierende DMSO-Konzentration im Medium 1 % nicht überschritt (Konzentration bei der es nicht zu Zellschäden kommt) [94]. Die exprimierten, GFP-markierten Rezeptoren wurden anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert. In Abb. 5.3a ist die Expression der GPCR nach Behandlung mit 10 μ M Cotransin gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtexpressionen von drei unabhängigen Experimenten in Prozent, bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Die Rezeptoren mit SP wurden bereits durch 10 μ M Cotransin in ihrer Expression stark inhibiert. Eine Ausnahme bildet der CRF_{2a}R (Besitz eines PSP) und der PAR1. Die Rezeptoren mit SAS sind dagegen alle Cotransin-insensitiv bei dieser Konzentration. Die Expression der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A (Isoform RII α) wurde erwartungsgemäß nicht durch Cotransin beeinflusst, da dieses zytosolische Protein nicht den sekretorischen Weg durchläuft (Negativkontrolle). Abb. 5.3b zeigt beispielhaft die Histogramme der Durchflusszytometrie eines Experimentes für den ET_BR.GFP, den CRF₁R.GFP und den μ OR.GFP nach Cotransin-Behandlung.

Durch diese Untersuchungen wurden neben den fünf von Garrison *et al.* [46] beschriebenen Proteinen noch drei weitere Cotransin-sensitive Proteine gefunden (CRF₁R hier als beschriebene Positivkontrolle [46]). Dies deutet darauf hin, dass Cotransin weitaus weniger selektiv ist als ursprünglich beschrieben. Im Folgenden wurde nur die Cotransin-Wirkung auf den ET_BR näher charakterisiert. (a) Gesamtexpression nach Cotransin-Behandlung



(b) Histogramme



Abbildung 5.3: Inhibitorischer Effekt von Cotransin auf die Biosynthese einzelner GPCR

Mit GFP-markierten GPCR transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (17 h, 10 μ M). Anschließend erfolgte eine Quantifizierung des GFP-Signals der Zellen im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen, a). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) aus drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Die Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind für den ET_BR.GFP, den CRF₁R.GFP und den μ OR.GFP in (b) dargestellt. Die Fluoreszenz bis 10¹ wurde als Autofluoreszenz nicht tranfizierter Zellen definiert. Die rote Fläche repräsentiert die mit Cotransin-behandelten Zellen, die Fläche unter der schwarzen Linie repräsentiert die DMSO-behandelten Zellen.

Inhibitorischer Effekt von Cotransin auf die ET_BR-Expression

Um die Ergebnisse für den ET_BR zu bestätigen, wurden transient mit $ET_BR.GFP$ transfizierte HEK293-Zellen für 17 h mit 10 μ M Cotransin behandelt und der $ET_BR.GFP$ mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper präzipitiert. Die Rezeptoren wurden anschließend mit Hilfe eines Immunoblots detektiert (Abb. 5.4). In der unbehandelten Kontrolle waren zwei Proteinbanden detektierbar (*, •), welche bereits beschrieben wurden [95]. Zur Zuordnung der Proteinbanden wurden die präzipitierten Rezeptoren mit Endoglykosidase H (EH) bzw. Peptid-Endoglykosidase F (PF) deglykosyliert. Die Behandlung mit EH hatte keinen erkennbaren Einfluss auf das Laufverhalten der oberen Bande des $ET_BR.GFP$. Die Behandlung mit PF reduziert dagegen die obere Bande zur nicht-glykosylierten Form (#). Die obere, stärkere Proteinbande repräsentiert somit den reifen $ET_BR.GFP$ (*, ~75 kD). Die darunter liegende, schwächere Bande (•, ~55 kD) ist nicht Glykosidase-sensitiv und stellt Rezeptoren dar, deren N-Terminus durch eine Metalloprotease gespalten wurde [95]. Bei den mit Cotransin behandelten Zellen ist die $ET_BR.GFP$ Bande kaum detektierbar und bestätigt den inhibitorischen Effekt von Cotransin auf die Biosynthese des ET_BR .



Abbildung 5.4: Analyse der ET_BR.GFP Expression nach Cotransin-Behandlung mittels Immunpräzipitation

Mit ET_BR.GFP transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (17 h, $30 \,\mu$ M). Aus dem Zelllysat wurde der ET_BR.GFP mit einem anti-GFP Antiserum präzipitiert und auf einem Immunoblot mit einem monoklonalem anti-GFP Antikörper detektiert. Als Kontrolle für die Antikörperspezifität wurden nicht transfizierte HEK293-Zellen benutzt (Ktr). Die präzipitierten Rezeptoren wurden mit der Endoglycosidase H (EH) und Peptid-Endoglykosidase F (PF) behandelt, um die mannosereiche, komplex glykosylierte (*) und nicht glykosylierte (#) Proteinbande zu identifizieren. Des Weiteren ist ein bereits beschriebenes Abbauprodukt des ET_BR.GFP durch eine endogene Metalloprotease (•) nachweisbar [95]. Der dargestellte Immunoblot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Konzentrationswirkungskurve der Cotransin-vermittelten Inhibition der ET_BR -Biosynthese

Die Messung der Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie ermöglicht die Erstellung von Konzentrationswirkungskurven und damit die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀). Für diesen Versuch wurden HEK293-Zellen transient transfiziert und für 17 h mit unterschiedlichen Cotransin-Konzentrationen behandelt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Expressionsanalyse. Die Konzentrationswirkungskurve wurde für den ET_BR (Abb. 5.5a) und für den von Garrison *et al.* [46] als Cotransin-empfindlich beschriebenen CRF₁R (Abb. 5.5b) erstellt. Bei beiden Rezeptoren nimmt bei steigender Cotransin-Konzentration zunächst die Rezeptorexpression wieder zu. Vermutlich liegt hier ein Artefakt vor, das durch Ausfallen des Cotransins bei hohen Konzentrationen verursacht wird. Wird nur der Konzentrationsbereich vor dem Anstieg betrachtet, lässt sich für den ET_BR eine IC₅₀ von 3,6 μ M und für den CRF₁R eine IC₅₀ von 4,8 μ M Cotransin berechnen. Verglichen mit dem publizierten IC₅₀-Wert von Cotransin auf VCAM1 (0,5 μ M) [46] liegen die hier ermittelten Werte etwa um den Faktor 10 höher.

(a) ET_BR.GFP

(**b**) CRF₁R.GFP



Abbildung 5.5: Konzentrationswirkungskurven der Cotransin-vermittelten Inhibition der Biosynthese des ET_BR.GFP und CRF₁R.GFP

Mit $ET_BR.GFP$ (a) und $CRF_1R.GFP$ (b) transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit DMSO bzw. steigenden Konzentrationen Cotransin inkubiert (17 h). Anschließend erfolgte eine Quantifizierung des GFP-Signals im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) aus drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

Einfluss der Cotransin-Behandlung auf die pharmakologischen Eigenschaften des ET_BR

Die Expressionsanalyse der Durchflusszytometrie sowie in der Immunpräzipitation zeigte, dass die Biosynthese des ET_BR durch Cotransin inhibiert wird. Dieser Effekt war jedoch auch bei hohen Konzentrationen (30 μ M) nicht vollständig. Im nächsten Schritt wurden die pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren nach Cotransin-Behandlung untersucht. Nach vollständiger Inhibition der Proteinbiosynthese sollten die Rezeptoren in Bindungs- und *second messenger*-Assays nicht mehr nachweisbar sein. Bei unvollständiger Inhibition sollte dagegen eine Restaktivität nachweisbar sein.

Um die Bindungseigenschaften dieser Rezeptoren zum Liganden ET-1 zu charakterisieren, wurden mit ET_BR.GFP transient transfizierte HEK293-Zellen mit Cotransin (30 μ M, 17 h) bzw. DMSO behandelt. Daraus präparierte Membranen wurden mit radioaktiv markiertem ET-1 ([¹²⁵I]ET-1) versetzt und die Menge an gebundenem [¹²⁵I]ET-1 mit einem γ -Zähler bestimmt. Bei den präparierten Membranen DMSO-behandelter Zellen wurde eine typische Sättigungskurve mit K_D-(71,6 ± 3,0 pM) und B_{max}-Werten (105,2 ± 1,3 fmol/mg) ermittelt, welche mit publizierten Werten übereinstimmen (Abb. 5.6a) [96]. Die K_D- und B_{max}-Werte für die Rezeptoren Cotransinbehandelter Zellen konnten nicht berechnet werden, was zeigt, dass die Expression funktioneller Rezeptoren durch Cotransin offensichtlich vollständig inhibiert wird. Zum Bestätigen dieser Ergebnisse wurde analysiert, ob der ET_BR nach Cotransin-Behandlung noch in der Lage ist, die *second messenger*-Bildung zu initiieren. Dazu wurden mit ET_BR.GFP transient transfizierte HEK293-Zellen mit Cotransin (30 μ M, 17 h) bzw. DMSO behandelt. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen ET-1 stimuliert und die Bildung von ³H-markiertem Inositolphosphat gemessen







Abbildung 5.6: Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung des ET_BR.GFP nach Cotransin-**Behandlung**

Mit ET_BR.GFP transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (17 h, $30 \,\mu\text{M}$). Für die Analyse der spezifischen [¹²⁵I]ET-1 Bindung wurden die Membranen der Zellen isoliert und mit steigenden ET-1-Konzentrationen inkubiert. Die Menge an gebundenem [¹²⁵I]ET-1 wurde mit Hilfe eines γ -Zählers bestimmt (a). Für den ET-1 abhängigen Inositolphosphat-Akkumulationsassay wurden intakte Zellen verwendet und mit steigenden ET-1-Konzentrationen stimuliert. Das akkumulierte ³H-markierte Inositoltriphosphat wurde szintillatorisch bestimmt (b). Der [¹²⁵I]ET-1-Verdrängungsassay wurde mit den Membranen von untransfizierten, unbehandelten HEK293-Zellen durchgeführt (c). Es wurden je 50 pM des Radioliganden, 1 μ M unmarkiertes ET-1 bzw. 1 μ M Cotransin verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) aus je drei unabhängigen Experimenten.

(second messenger des ET_BR: IP₃, Tab. 1.1). Bei den DMSO-behandelten Zellen wurde eine typische Konzentrationswirkungskurve mit einer EC₅₀ von 1,3 nM ET-1 (95 % Konfidenzintervall: 0,95–1,8 nM) ermittelt (Abb. 5.6b). Diese Ergebnisse entsprechen den publizierten Werten [96]. Nach Cotransin-Behandlung ist die ET-1 induzierte Bildung des second messengers nicht nachweisbar, was die Ergebnisse des Bindungsassays bestätigt. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die in der Durchflusszytometrie und Immunoblot nach Cotransin-Behandlung noch detektierbaren

Rezeptoren nicht funktional sind. Es könnte sich dabei um Aggregate oder intrazelluläre Rezeptoren handeln, die eine lange Halbwertszeit haben und daher durch Cotransin nicht zu beeinflussen sind.

Formal musste ausgeschlossen werden, dass Cotransin als Antagonist an der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors bindet. Hierfür wurde ein [^{125}I]ET-1-Verdrängungsassay mit ET-1 bzw. Cotransin (je 1 μ M) durchgeführt. Es wurden Membranen von transient transfizierten HEK293-Zellen isoliert und mit [^{125}I]ET-1 inkubiert. Nach Zugabe von ET-1 bzw. Cotransin konnte der radioaktiv markierte Ligand nur durch ET-1 vom ET_BR verdrängt werden (Abb. 5.6c), was zeigte, dass Cotransin keine antagonistische Wirkung an der Ligandenbindungstasche des Rezeptors hat.

Einfluss von Cotransin auf die ET_BR mRNA-Expression

Garrison et al. konnten zeigen, dass Cotransin die Expression von VCAM1 über eine Wirkung auf das Translokon inhibiert. Die Transkription der mRNA blieb dabei unbeeinflusst [46]. Um dies für das hier verwendete Zellsystem und den ET_BR bzw. den CRF₁R zu bestätigen, wurden HEK293-Zellen transient transfiziert und mit DMSO bzw. Cotransin behandelt (30 µM, 17 h). Die mRNA wurde isoliert und mittels reverser Transkriptase-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Menge an cDNA wurde mit TaqMan®-Sonden in einer quantitativen real time-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die erhaltenen C_T-Werte für die DMSO- bzw. Cotransin-behandelten Zellen sind in Tab. 5.1 angegeben. Abb. 5.7 zeigt die graphische Darstellung der Anzahl der PCR-Zyklen gegenüber der Konzentration des Amplifikats (Fluoreszenzintensität, ΔRN). Die grünen Kurven repräsentieren die Ergebnisse untransfizierter HEK293-Zellen, die blauen Kurven transfizierte, mit DMSO behandelte Zellen. Die roten Linien repräsentieren die Ergebnisse transfizierter, mit Cotransin behandelter Zellen. Als Referenz wurde die mRNA-Menge der endogenen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) analysiert. Die nahezu identischen C_T-Werte für die Menge an GAPDH weisen auf gleiche Mengen mRNA in allen Proben hin. Daher können mRNA-Mengen von ET_BR bzw. CRF₁R nach DMSO bzw. Cotransin-Behandlung gegeneinander quantifiziert werden. Die CT-Werte zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen DMSO und Cotransin-Behandlung, was zeigt, dass Cotransin keinen Einfluss auf die mRNA-Bildung hat und somit der inhibitorische Effekt auf den ET_BR post-transkriptional ist.



Abbildung 5.7: qRT-PCR Analyse der mRNA Expression nach Cotransin-Behandlung

Mit ET_BR.GFP bzw. CRF₁R.GFP transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und in einer qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt ist die Anzahl der Zyklen der PCR gegenüber Δ RN als Maß für die Fluoreszenzstärke. Die grünen Linien repräsentieren untransfizierte HEK293-Zellen, die blauen Linien transfizierte, mit DMSO behandelte Zellen und die roten Linien transfizierte, mit Cotransin behandelte Zellen. Als Referenz wurde endogenes GAPDH analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

		FAM _{GPCR}		VIC _{GAPDH}	
		C _T -Wert	$\pm SD$	C _T -Wert	$\pm SD$
ЕТ В	DMSO	13,5	1,2	16,1	0,9
LIBK	Cotransin	13,6	0,9	16,2	0,6
CRF ₁ R	DMSO	12,7	2,2	17,9	0,2
	Cotransin	12,6	2,0	17,0	0,2

Tabelle 5.1: C_T-Werte der durchgeführten qRT-PCR Analyse

Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SD) aus drei unabhängigen Experimenten.

Subzelluläre Lokalisation des ET_BR nach Cotransin-Behandlung

Die Quantifizierung der Rezeptorexpression mittels Durchflusszytometrie und Immunpräzipitation ergaben nach Cotransin-Behandlung schwache ET_BR.GFP-Signale. Die Ligandenbindungsexperimente und *second messenger* Akkumulationsexprimente zeigten, dass es sich dabei um nicht funktionale Rezeptoren handelt. Um die Verteilung der Rezeptoren nach Cotransin-Behandlung in der Zelle zu untersuchen, wurde die subzelluläre Lokalisation des Konstrukts ET_BR.GFP mikroskopisch bestimmt (Abb. 5.8). (Zuvor war ein Ablösen der Zellen zweckmäßig, da Cotransin die Expression von Zelladhäsionsproteinen hemmt und zur teilweisen Ablösung der Zellen führt.) Als Plasmamembranmarker wurde Trypanblau verwendet. Nach Cotransin-Behandlung waren die GFP-Signale des Rezeptors in den Plasmamembranen nicht mehr zu detektieren. Intrazelluläre Signale konnten hingegen immer noch nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass es sich bei den nach Cotransin-Behandlung verbleibenden Rezeptoren um eine intrazelluläre Rezeptorpopulation handelt, die zwar nicht funktional ist, aber immer noch in der Durchflusszytometrie
und in Immunpräzipitationsexperimenten detektierbar ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein auf dem photokonvertierbaren Fluoreszenzprotein Kaede basierendes Biosyntheseassay entwickelt, welches unabhängig von Rezeptorpopulationen mit langer Halbwertszeit ist.



Abbildung 5.8: Mikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von ET_BR.GFP nach Cotransin-Behandlung

Mit ET_BR.GFP transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (17 h, 30 μ M) und in PBS aufgenommen. Die GFP-Fluoreszenzsignale der Rezeptoren sind in grün dargestellt. Für die Anfärbung der Plasmamembran wurde Trypanblau (rot) verwendet. Die abgebildeten Zellen sind repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Maßstab: 10 μ m.

5.1.3 Etablierung eines Kaede-basierten Biosyntheseassays

Neben GFP und seinen Derivaten existieren noch weitere Fluoreszenzproteine, mit denen es möglich ist, Proteine zu markieren. Kaede ist ein nicht-biolumineszierendes Fluoreszenzprotein aus der Steinkoralle *Trachyphyllia geoffroy*. Organismen, die nicht-biolumineszierende Fluoreszenzproteine wie Kaede exprimieren, benötigen zur Erzeugung der Fluoreszenz eine externe Lichtquelle.

Schmidt *et al.* konnten zeigen, dass Kaede verwendet werden kann, um GPCR zu markieren und in der Zelle zu lokalisieren [87,97]. Die C-terminale Fusion der Rezeptoren mit Kaede beeinflusst dabei weder die Rezeptoren selbst noch ihre Pharmakologie. Der Vorteil von Kaede gegenüber den meisten Fluoreszenzproteinen besteht darin, dass mit Hilfe von UV-Licht seine grüne Fluoreszenz (gKaede, $\lambda_{ex/em} = 508 \text{ nm} / 518 \text{ nm}$) irreversibel in eine rote (rKaede, $\lambda_{ex/em} = 572 \text{ nm} / 580 \text{ nm}$) photokonvertiert werden kann [98]. Nach annähernd vollständiger Umschaltung der Kaede-fusionierten GPCR einer Zelle von gKaede zu rKaede besitzen alle neu synthetisierten Rezeptoren eine grüne Fluoreszenz (gKaede). Auf diese Weise ist es möglich, deren Biosynthese in Abhängigkeit der Zeit zu untersuchen.

Neusynthetisierte, Kaede-markierte GPCR können mikroskopisch (*pulse-chase-microscopy*) oder durchflusszytometrisch anhand des gKaede-Fluoreszenzsignals quantifiziert und die Hemmwirkung

von Cotransin analysiert werden. Um die Effizienz der Photokonversion von gKaede zu rKaede in den transfizierten Zellen, für durchflusszytometrische Analysen, zu ermitteln, wurden transient mit ET_BR .Kaede transfizierte HEK293-Zellen 2, 3, 4, 5 und 10 min mit UV-Licht einer Quecksilberlampe bestrahlt. Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum der Zellen aufgenommen (Abb. 5.9). In diesem Spektrum ist ein Absorptionspeak von gKaede bei 515 nm zu erkennen. Nach der Photokonversion von gKaede zu rKaede wird der Absorptionspeak bei 515 nm zeitabhängig kleiner und es entsteht ein neuer Absorptionspeak bei 579 nm. Nach 4 min (Daten nicht gezeigt) ist eine ausreichende Photokonversion erreicht.



Abbildung 5.9: Absorptionsspektrum von ET_BR.Kaede

Mit ET_BR.Kaede transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit UV-Licht bestrahlt (Bestrahlungsdauer: 2-10 min). Anschließend wurde ein Absorptionsspektrum der Zellen aufgenommen. Dargestellt sind die Ergebnisse für unbestrahlte Zellen und 3 bzw. 10 min lang UV-bestrahlte Zellen. Die Kurven sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Pulse-chase-microscopy zur Quantifizierung der Biosynthese-Inhibition eines Kaede-markierten Rezeptors

Die Biosynthese eines Kaede-markierten Membranproteins (oder deren Inhibition) kann mikroskopisch dargestellt und quantifiziert werden. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit $ET_BR.Kaede transfiziert und mit DMSO bzw. Cotransin behandelt (30 <math>\mu$ M). Durch eine Inkubation über 3 h wurde der Cotransintransport zum Wirkort in der Zelle sichergestellt. Danach wurden gKaede-Signale von $ET_BR.Kaede$ mit Hilfe eines UV-Lasers am konvokalen Mikroskop zu rKaede umgeschaltet (Abb. 5.10). Neu synthetisierte $ET_BR.Kaede$ konnten über die gKaede-Signale zeitabhängig analysiert werdenn (150 min, ein Bild alle 15 min). Zu Beginn der Untersuchung war der Rezeptor ($ET_BR.Kaede$) u.a. in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert (gKaede, Abb. 5.10a). Durch die UV-Bestrahlung kommt es zu einer nahezu vollständigen Konvertierung zu rKaede. In Zellen, welche mit DMSO behandelt worden sind, waren schon nach 30 min wieder deutliche gKaede-Signale in den endosomalen Kompartimenten und der Zellmembran detektierbar. Die Cotransin-behandelten Zellen zeigten dagegen über den gesamten Zeitraum von 150 min keine nennenswerte Neusynthese (Quantifizierung des gKaede-Signals: Abb. 5.10b).



Abbildung 5.10: Mikroskopische Quantifizierung der Biosynthese-Inhibition von ET_BR.Kaede durch Cotransin

Mit ET_BR.Kaede transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin bzw. DMSO inkubiert (3 h, 30 μ M). Das gKaede-Signal von ET_BR.Kaede wurde anshließend durch UV-Bestrahlung komplett zu rKaede photokonvertiert. Über eine Zeitspanne von 180 min wurde rKaede und das Wiedererscheinen von gKaede mikroskopisch dokumentiert (a, ein Bild alle 15 min) bzw. quantifiziert (b). Die in (a) dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Maßstab: 10 μ m. In (b) sind die Mittelwerte (±SEM) von fünf Zellen gezeigt.

Kinetik der Biosyntheseinhibition durch Cotransin

Die *pulse-chase-microscopy* erlaubt die Analyse von einzelnen Zellen. Die Neusynthese Kaedemarkierter Rezeptoren kann ebenfalls durchflusszytometrisch im Rahmen einer großen Zellpopulation bestimmt werden. Dadurch ist es möglich, den Einfluss der Inkubationszeit von Cotransin auf den inhibitorischen Effekt zu analysieren. Die gKaede-Signale von transient mit ET_BR.Kaede und CRF₁R.Kaede transfizierten HEK293-Zellen wurden mit UV-Licht zu rKaede photokonvertiert und unterschiedlich lang mit Cotransin (30 μ M) bzw. DMSO behandelt. Anschließend wurden die gKaede- und rKaede-Fluoreszenzsignale durchflusszytometrisch analysiert. Um die Kinetik der Biosyntheseinhibition darzustellen, wurden nur die gKaede-Fluoreszenzsignale quantifiziert (Abb. 5.11a, 5.11b). Die berechnete Zeit für die halbmaximale Wirkung von Cotransin ($30 \mu M$) liegt dabei für den ET_BR.Kaede bei 7,1 h, für den CRF₁R.Kaede bei 3,7 h. Die Histogramme eines repräsentativen Experimentes sind in Abb. 5.11c gezeigt.



Abbildung 5.11: Kinetik der Biosyntheseinhibition von ET_BR.Kaede und CRF₁R.Kaede durch Cotransin

Mit ET_BR.Kaede (a) und CRF₁R.Kaede (b) transient transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Cotransin (30 μ M) bzw. DMSO behandelt. Nach Photokonversion von gKaede zu rKaede und verschiedenen Inkubationszeiten wurden die neusynthetisierten Rezeptoren (gKaede) durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Histogramme eines repräsentativen Experimentes für den ET_BR.Kaede sind in (c) dargestellt. Die Fluoreszenz bis 10¹ wurde als Autofluoreszenz nicht tranfizierter Zellen definiert. Die grüne bzw. rote Fläche repräsentiert jeweils die mit Cotransin-behandelten Zellen (t = 24 h), die Flächen unter den schwarzen Linien entsprechen den DMSO-behandelten Zellen.

Reversible Inhibition der ET_BR-Expression durch Cotransin

Mit Hilfe des etablierten Kaede-basierten Biosyntheseassays war es ebenfalls möglich, die Reversibilität der Cotransin-Wirkung zu untersuchen. Hierfür wurde das gKaede-Signal transfizierter HEK293-Zellen wieder mit UV-Licht zu rKaede photokonvertiert. Die Zellen wurden mit Cotransin (30 μ M) bzw. DMSO behandelt. Nach 17 h wurde Cotransin entfernt oder neu auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h erfolgte die Analyse der gKaede-Signale in der Durchflusszytometrie (Abb. 5.12). Das Diagramm zeigt, dass nach 41-stündiger Cotransin-Behandlung die Expression von ET_BR .Kaede auf 23 % der DMSO-Kontrolle reduziert wird. 24 h nach Entfernung von Cotransin ist der Effekt aufgehoben. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Cotransin die Biosynthese von ET_BR .Kaede reversibel inhibiert.



Abbildung 5.12: Reversible Inhibition der Expression von ET_BR.Kaede durch Cotransin Mit ET_BR.Kaede transient transfizierte HEK293-Zellen wurden nach Umschaltung mit DMSO bzw. Cotransin inkubiert (30μ M). Nach 17 h wurden DMSO und Cotransin neu zugegeben bzw. entfernt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Quantifizierung des gKaede-Signals im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.4 Bedeutung des SP für die Cotransin-Wirkung

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Daten, dass Cotransin die Biosynthese einiger GPCR mit SP reversibel inhibiert (ET_BR, CRF₁R, ET_AR, TSHR). Eine Ausnahme bildet der PARI und der CRF_{2a}R, welcher ein PSP besitzt. Am Beispiel des ET_BR wurde untersucht, ob der inhibitorische Effekt tatsächlich auf das Vorhandensein des SP zurückzuführen ist. Hierfür wurde zunächst die SP-Deletionsmutante des ET_BR.GFP (Δ SP-ET_BR.GFP) auf ihre Cotransin-Sensitivität hin untersucht. Weiter wurde überprüft, ob der Cotransin-Effekt durch das SP des ET_BR vermittelt werden kann, wenn dieses vor den N-Terminus des insensitiven μ OR fusioniert wird (SPetb- μ OR.GFP). Durch mikroskopische Analysen der Konstrukte konnte eingangs gezeigt werden, dass die Konstrukte exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). (Detaillierte Informationen über die ET_BR-Deletionsmutante siehe Köchl *et al.* [8].)

Zur Analyse des inhibitorischen Effekts von Cotransin auf die Biosynthese der Konstrukte wurden transient transfizierte HEK293-Zellen 17 h mit Cotransin (30 μ M) bzw. DMSO inkubiert. Anschließend wurde das GFP-Signal der Zellen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abb. 5.13). Die SP-Deletion des ET_BR.GFP führte zu einer wesentlich schwächeren Inhibition der Biosynthese im Vergleich zum Wildtyp. Der ursprünglich Cotransin-insensitive μ OR wird durch die Fusion mit dem SP des ET_BR zu einem sensitiven Rezeptor. Diese Daten zeigen, dass die Cotransin-Sensitivität des ET_BR tatsächlich durch das SP vermittelt wird.



Abbildung 5.13: Bedeutung des SP für die Cotransin-Wirkung

Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden DMSO bzw. Cotransin inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend erfolgte die Quantifizierung des GFP-Signals im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

5.2 Identifizierung weiterer Cotransin-sensitiver Proteine

Für die Identifizierung weiterer Proteine, die durch Cotransin in ihrer Expression gehemmt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Verfahren eingesetzt. Zunächst wurden die sekretorischen Proteine und Membranproteine von Leberzellen massenspektrometrisch auf deren Cotransin-Sensitivität hin untersucht. Anschließend erfolgte die immunologische Analyse von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von T-Zellen und Muskelzellen der Atemwege auf dessen Cotransin-Sensitivität hin. Ziel war es, durch die Identifizierung weiterer Cotransin-sensitiver Proteine Ähnlichkeiten zwischen den sensitiven SP zu finden.

5.2.1 SILAC-basierte, massenspektrometrische Expressionsanalyse von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen

Die metabolische Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, SILAC) erlaubt eine quantitative, massenspektrometrische Expressionsanalyse. Für die Identifizierung von Cotransin-empfindlichen Membranproteinen und sekretorischen Proteinen wurden Leberzellen (HepG2-Zellen) verwendet, da diese eine Vielzahl an Proteinen sekretieren. Die Durchführung der massenspektrometrischen Expressionsanalyse erfolgte in Kooperation mit der AG Massenspektrometrie am FMP.

Unmarkierte (*light*, L) und mit ¹³C₆-Lysin und ¹³C₆, ¹⁵N₄-Arginin markierte (*heavy*, H) HepG2-Zellen wurden mit DMSO bzw. Cotransin (30 μ M) für 17 h behandelt. Um mögliche Unterschiede zwischen den L und H Zellkulturen auszuschließen, wurden sogenannte *forward* (fw) und *reverse* (rev) Experimente (Überkreuzexperimente) durchgeführt. Das bedeutet, dass Cotransin und



Abbildung 5.14: Auftrennung der isolierten Proteine mittels SDS-PAGE für die massenspektrometrische Analyse

Markierte und unmarkierte HepG2-Zellen wurden mit DMSO bzw. Cotransin inkubiert (17 h, $30 \,\mu$ M). Nach Fusion des Mediums und der Zellen beider Populationen wurden die Membranproteine und sekretorischen Proteine isoliert und mittels einer SDS-PAGE (Gradientengel, 4-12 %) getrennt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hilfe von Coomassie-Brilliant-Blau.

DMSO-behandelte Zellen sowohl mit unmarkierten als auch mit markierten Proteinen analysiert wurden, woraus zwei unabhängige Experimente resultierten. Die isolierten Membranproteine und sekretorischen Proteine wurden mittels SDS-PAGE der Größe nach getrennt (Abb. 5.14) und anschließend massenspektrometrisch analysiert. In der Fraktion der Membranproteine wurden insgesamt 2070 Proteine identifiziert und quantifiziert, in der Fraktion der sekretorischen Proteine 1207. Kontaminanten, Proteine die keine Membran- oder sekretorischen Proteine waren und Proteine, deren Ergebnisse durch das zweite Experiment nicht bestätigt werden konnten, wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. So konnte die Cotransin-Sensitivität von 52 sekretorischen und 156 Zellmembranproteinen (außer Zellkernmembran) ausgewertet werden. Das quantitative, normierte Verhältnis der Peptide von DMSO- und Cotransin-behandelten Zellen wird im fw Experiment mit der Ratio H/L (DMSO/Cotransin) angegeben. Im rev Experiment als Ratio L/H (DMSO/Cotransin). Bei einer Ratio von eins, findet sich die gleiche Anzahl an Peptiden eines Proteins in DMSO- und Cotransin-behandelten Zellen. Ist das Verhältnis größer als eins, wurden in den DMSO-behandelten Zellen mehr Peptide des Proteins gefunden, als im Cotransin-Ansatz. Proteine, deren mittlere Ratio (fw und rev) sich zwischen 0,6 und 1,6 befindet, wurden als Cotransinunempfindlich definiert. Diese Grenzen wurden anhand der Auswertung der Rohdaten und der Punkteverteilung der Ergebnisse der Membranproteine definiert (Abb. 5.15). In Abb. 5.15 ist die Ratio H/L (fw) gegen die Ratio L/H (rev) aufgetragen. Jeder Punkt repräsentiert ein Protein. In

den grau gekennzeichneten Flächen befinden sich die Proteine, welche als Cotransin-insensitiv definiert wurden (gelbe Fläche = Hemmung der Proteinsynthese, grüne Fläche = Hochregulation). Die Daten der einzelnen Proteine sind in den Tab. A.1 bis A.10 aufgeführt.



Abbildung 5.15: SILAC-basierte Expressionsanalyse von Membranproteinen (a) und sekretorischen Proteinen (b) nach Cotransin-Behandlung

Markierte und unmarkierte HepG2-Zellen wurden mit DMSO bzw. Cotransin inkubiert (30 μ M, 17 h). Die Expression der isolierten Membranproteine (a) und der sekretierten Proteine (b) wurde massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt ist ein Punktediagramm der identifizierten Proteine. Aufgetragen ist die *Ratio* H/L (fw) gegen die *Ratio* L/H (rev). Die graue Fläche kennzeichnet den Bereich nicht Cotransin-sensitiver Proteine, die gelben bzw. grünen Flächen die Bereiche Cotransin-sensitiver Proteine (gelb: Inhibition der Expression; grün: Hochregulation der Expression).

Von den 156 identifizierten Membranproteinen werden 135 Membranproteine nicht in ihrer Biosynthese beeinflusst (Abb. 5.15a, Tab. A.2 bis A.6), bei 21 Membranproteinen konnte eine Cotransin-Sensitivität nachgewiesen werden (Tab. A.1). Beispiele hierfür sind das Membranprotein Erlin-2 (UniProt-Nr. O94905-1) und das *Endothelin-converting enzyme* (UniProt-Nr. P42892-1). Unter den 52 sekretorischen Proteinen wurden nur zwei Cotransin-unempfindliche Proteine gefunden (Abb. 5.15b, Tab. A.9). Interessanterweise konnte ein Protein identifiziert werden, welches durch Cotransin in seiner Biosynthese hochreguliert wird (Tab. A.10). Es handelt sich hierbei um das *Insulin-like growth factor-binding protein 1* (Uniprot-Nr. P08833). Für einige ausgewählte Proteine konnten die Ergebnisse, in Zusammenarbeit mit Frau Dr. A. Schmidt (Max-Delbrück-Centrum, Berlin), bereits in Immunoblot-Experimenten bestätigt werden. Dazu zählen die sensitiven Proteine *Apolipoprotein B-100*, Cadherin-2, Erlin-2, *Endothelin converting enzyme 1* und die insensitiven Proteine *Plasminogen activator Inhibitor 1*, Calnexin, Claudin-1 (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der SILAC-Analyse zeigen, dass nahezu alle sekretorischen Proteine Cotransinsensitiv sind, Membranproteine dagegen nur in geringem Umfang. Ferner wurde die Expression der sekretorischen Proteine, die als Signalsequenz ein SP besitzen, viel stärker inhibiert, was wiederum die Bedeutung des SP für die Cotransin-Sensitivität unterstreicht.

Bei der Analyse der Signalsequenzen von Cotransin-sensitiven und -insensitiven Membranproteinen zeigte sich jedoch, dass von den 81 identifizierten Membranproteinen mit SAS 10 Proteine Cotransin-sensitiv waren (Tab. 5.2, Tab. A.1 bis A.6). Von den 55 Membranproteinen mit SP waren ebenfalls 10 Proteine sensitiv [91,92]. Aus diesen Daten ergibt sich zunächst kein Hinweis darauf, dass bei Membranproteinen das Vorhandensein eines SP für die Cotransin-Sensitivität zwingend erforderlich ist. Offensichtlich kann aber die Cotransin-Sensitivität auch über eine SAS vermittelt werden.

]	Membranp	roteine
	sensitiv	insensitiv
SP	10	45
SAS	10	71

Tabelle 5.2: Charakterisierung Cotransin-sensitiver und -insensitiver Membranproteine hinsichtlich ihrer Signalsequenz

Diese Daten zeigen, dass Cotransin weitaus weniger selektiv wirkt, als ursprünglich beschrieben. Aufgrund des überraschenden Ergebnisses, dass fast 95 % der identifizierten, sekretorischen Proteine Cotransin-sensitiv waren, wurde ein weiterer *Screen* für die Cotransin-Sensitivität von sekretorischen Proteinen durchgeführt um die Daten zu bestätigen. Hierfür wurden sekretierte Zytokine und Wachstumsfaktoren in zwei verschiedenen Zelltypen untersucht.

5.2.2 BioPlex-Immunoassay-basierte Expressionsanalye von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Zytokine und Wachstumsfaktoren sind sekretorische Proteine und modulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Sie werden vorwiegend von Zellen des retikulohistiozytären Systems gebildet, wie Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten [99]. Als sekretorische Proteine sind Zytokine und Wachstumsfaktoren potentiell Cotransin-sensitiv. Dies wurde mit einer Auswahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren von T-Zellen (Jurkat-Zellen, humane T-Lymphozytenzelllinie) und glatten Muskelzellen der Atemwege (*human airway smooth muscle cells*, HASM-Zellen) überprüft. Die Quantifizierung der sekretierten Zytokine erfolgte mittels des BioPlex-Immunoassays. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit der Firma BioRad.





Abbildung 5.16: BioPlex-Immunoassay-basierte Expressionsanalyse sekretierter Zytokine nach Cotransin-Behandlung

Stimulierte HASM-Zellen bzw. Jurkat-Zellen wurden mit DMSO bzw. Cotransin inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung von 27 Zytokinen bzw. Wachstumsfaktoren im Medium mittels BioPlex-Immunoassay. Für die Normierung der Ergebnisse auf die gleiche Zellzahl wurde ein Vitalitätstest der Zellen durchgeführt. Angegeben sind die Proteinkonzentrationen, die in jeweils 1 ml Medium sezerniert wurden (von je 5 x 10⁵ Jurkat-Zellen bzw. 10⁶ HASM-Zellen).

Die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen erfolgte im Zellkulturmedium. Hierfür wurden Jurkat-Zellen und HASM-Zellen mit DMSO bzw. Cotransin (30μ M, 17 h) behandelt. Die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurde gleichzeitig stimuliert (Jurkat-Zellen: Ionomycin und PMA, HASM-Zellen: in Medium gelöster Zigarettenrauch). In Abb. 5.16 sind die jeweils gemessenen Konzentrationen der Zytokine und Wachstumsfaktoren dargestellt, welche sich in 1 ml Medium befanden. Die gemessenen Zytokine gehen bei den Jurkat-Zellen auf ca. 5×10^5 Zellen / ml zurück. Bei den HASM-Zellen auf ca. 10^6 Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse von unstimulierten Zellen und von stimulierten Zellen, welche mit Cotransin bzw. DMSO behandelt worden sind. Nach Stimulation wurden erwartungsgemäß viele der Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren hochreguliert. (Es wurden nur die Zytokine / Wachstumsfaktoren in der Auswertung

berücksichtigt, deren Expression über der sicheren Nachweisgrenze lag.) Durch die Cotransin-Behandlung wurde die Expression einiger Proteine wie VEGF oder IL-12 in den HASM-Zellen stark reduziert (Abb. 5.16a). Bei *FGF basic* hingegen wurde nach Cotransin-Behandlung eine Hochregulation der Expression festgestellt. In den Jurkat-Zellen wurde ebenfalls die Expression einiger Zytokine / Wachstumsfaktoren, wie VEGF, IL-2 oder MIP-1 α stark reduziert (Abb. 5.16b). Beim Vergleichen der Cotransin-Empfindlichkeiten einzelner Proteine fällt auf, dass diese in den unterschiedlichen Zellen zum Teil deutlich differiert. Während z.B. in HASM-Zellen die Expression von IL-8 nicht beeinflusst wird, wird sie in Jurkat-Zellen nach Cotransin-Behandlung um ein vierfaches reduziert.

Aufgrund der Vielzahl der hier identifizierten sensitiven Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse erweitert und bestätigt und zeigt erneut, dass es sich bei Cotransin um ein weitaus weniger selektiven Inhibitor handelt als beschrieben [46].

5.3 Expressions-inhibitorische Analyse neuer Cotransin-Derivate

Jede Änderung der chemischen Struktur eines Wirkstoffes führt zu Änderungen seiner physikalischchemischen Eigenschaften und seines biologischen Wirkspektrums [100]. Mit der Synthese neuer Derivate sollte die Wirkstärke und / oder die Selektivität modifiziert werden und der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Cotransin aufgeklärt werden. Durch die am FMP in der AG Peptidsynthese etablierte Festphasensynthese des Cotransins ist es möglich, relativ einfach Cotransin-Derivate zu synthetisieren und diese auf ihre Wirksamkeit hin zu testen [61].

Cotransin ist ein zyklisches Heptadepsipeptid und besteht aus einer 2-Hydroxypropansäure (lac) und sechs L-Aminosäuren, von denen drei N-methyliert sind (Abb. 1.6d, 5.17). Die Aminosäuren sind über sechs Säureamidbindungen (-CO-NH-) verbunden. Lac (Position 1) ist mit dem N-methylierten Alanin (Ala, Position 7) über eine Esterbindung (-CO-O-) verknüpft.

Die Derivatisierung von Cotransin erfolgte systematisch, indem zunächst schrittweise einzelne Positionen entfernt oder durch Ala substituiert wurden. Weitere Modifikationen waren der Ersatz Nmethylierter Aminosäuren durch unmodifizierte und das Weglassen der Zyklisierung während der Synthese. Aus der Wirksamkeit der Derivate sollten anschließend Rückschlüsse auf die Relevanz der einzelnen Positionen gezogen werden. Die experimentelle Untersuchung der Wirksamkeit erfolgte durchflusszytometrisch am Beispiel des Cotransin-sensitiven ET_BR.GFP und des insensitiven



Abbildung 5.17: Schematische Darstellung von Cotransin

Cotransin besteht aus einer lac, drei proteinogenen und drei N-methylierten L-Aminosäuren. Lac (Position 1) und das methylierte Ala (Position 7) sind über eine Esterbindung (rot) miteinander verbunden. Bei den restlichen Bindungen handelt es sich um Säureamidbindungen (schwarz). Die grünen Positionen markieren die L-Aminosäure Leu, die blaue Position markiert Phenylalanin (Phe), die gelbe Position lac und in lila ist die Position von Ala gekennzeichnet. N-Methylierungen (Me) sind rot dargestellt.

 μ OR.GFP. Der letztere Rezeptor wurde verwendet, um mögliche Änderungen in der Selektivität der Derivate zu erfassen.

5.3.1 Wirksamkeit von Cotransin-Derivaten nach Deletion

Es wurden sieben Derivate synthetisiert, die sich von Cotransin dadurch unterscheiden, dass während der Synthese eine Aminosäure oder lac in der Synthese weggelassen wurden (Derivate 1-7, Abb. 5.18a). Im Unterschied zu Cotransin handelt es sich daher um Hexapeptide.

Alle Deletionen führten zu einer deutlichen Reduktion der Wirksamkeit, bezogen auf den $\text{ET}_{\text{B}}\text{R}$, im Vergleich zu Cotransin (Abb. 5.18b). Die Entfernung der Aminosäuren an den Positionen 6, 5 und 3 (Derivat 3, 4 und 6) zeigt eine komplette Aufhebung der Wirkung. Bei Derivaten, bei denen die lac-Position bzw. die Aminosäuren an den Positionen 7, 4 und 2 weggelassen wurden (Derivat 1, 2, 5 und 7), wurde ein Verlust der Wirkung im Bereich von 71-89 % beobachtet.

Keines der Derivate (1-7) zeigte einen inhibitorischen Effekt auf die Expression des μ OR (Abb. 5.18c).



Abbildung 5.18: Einfluss der schrittweisen Deletion

Die Deletion der einzelnen Positionen des Cotransins führte zu sieben verschiedenen Derivaten (a). Um diese auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen, wurden mit $ET_BR.GFP$ (b) bzw. μ OR.GFP (c) transient transfizierte HEK293-Zellen mit DMSO bzw. Cotransin oder den Derivaten (1-7) inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rezeptoren im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

5.3.2 Wirksamkeit von Cotransin-Derivaten nach Ala-Substitution

Der in dieser Arbeit durchgeführte Ala-*Scan* basiert zunächst auf einer Substitution von lac gegen Ala, wodurch die Esterbindung gegen eine Säureamidbindung ausgetauscht wird und aus dem Depsipeptid ein Amid (Derivat a, Abb. 5.19a). Der weitere systematische sequenzielle Austausch jeder einzelnen Aminosäure im Amid führte zu sechs weiteren Derivaten (Derivate b-g).

Für alle Derivate (a-g) wurde wieder eine mehr oder weniger starke Abnahme der Wirkung, auf den ET_BR , beobachtet (Abb. 5.19b). Bei den Derivaten d-g war keine inhibitorische Wirksamkeit zu beobachten. Für die Derivate a-c lag der Wirkungsverlust im Bereich von 58-68 %. Verglichem mit dem Amid (Derivat a) kommt es durch die zusätzliche Substitution der Position 7 bzw. 6 (Derivat b und c) jedoch nicht zum weiteren Wirkungsverlust.

Die Expressionsanalyse des μ OR ergab, dass keines der Derivate (a-g) einen Einfluss auf das Expressionlevel hat (Abb. 5.19c).



Abbildung 5.19: Einfluss des schrittweisen Ala-Substitution

Der Austausch von einzelnen Positionen des Cotransins gegen Ala führte zu sieben verschiedenen Derivaten (a). Um diese auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen, wurden mit $ET_BR.GFP$ (b) bzw. μ OR.GFP (c) transient transfizierte HEK293-Zellen mit DMSO bzw. Cotransin oder den Derivaten (a-g) inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rezeptoren im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

5.3.3 Wirksamkeit partiell methylierter Cotransin-Derivate

Für die Untersuchung der Funktion der Methylierungen an den Aminosäure-Positionen 7, 5 und 3 im Amid wurden drei weitere Derivate synthetisiert. Dabei blieb die lac-Position durch Ala substituiert und die N-Methylierten Aminosäuren wurden nacheinander durch unmodifizierte Aminosäuren ersetzten (Derivat I, II und III, Abb. 5.20a).

Das Derivat I entspicht dabei dem Derivat b des Ala-*Scans* (Abb. 5.19), da ein methyliertes Ala durch Ala substituiert wurde. Die Expressionsanalyse des ET_BR nach Behandlung mit den Derivaten ergab, dass die Entfernung der Methylgruppe an der Position 7 sowie an der Position 5 (Derivat I und II), mit der Kombination der lac-Substitution zu einer vergleichbaren Reduktion der Expression führte, wie die lac-Substitution allein (Derivat a, Abb. 5.19b). Die entfernte Methylierung an der Position 3 (Deritav III) hingegen führte zu einem niedrigerem Expressionslevel im Vergleich zu den Derivaten I und II.



Abbildung 5.20: Einfluss partieller Methylierung

Die partielle Methylierung des Cotransins führte zu drei verschiedenen Derivaten (a). Um diese auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen, wurden mit $ET_BR.GFP$ (b) bzw. μ OR.GFP (c) transient transfizierte HEK293-Zellen mit DMSO bzw. Cotransin oder den Derivaten (I-III) inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rezeptoren im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

Beim μ OR führte die Behandlung mit dem Derivat III zu einer geringfügigen Inhibition der μ OR-Expression (Derivat I und II zeigten keinen inhibitorischen Effekt). Da eine veränderte Selektivität auch ein Hinweis auf eine höhere Toxizität der Substanz sein könnte, wurde für Derivat III ein Zellvitalitätstest durchgeführt (Abb. 5.21). Der Test ergab, dass das Derivat III bei Konzentrationen > 30 μ M tatsächlich eine toxische Wirkung in HEK293-Zellen hat. Die anschließende Untersuchung des inhibitorischen Effektes von Derivat III, in nicht-toxischer Konzentration (10 μ M), auf die Expression anderer Cotransin-unempfindlicher GPCR (UTR₂, AT₂R, V_{1a}R) zeigte, dass die Selektivität des Cotransins jedoch nicht verändert wurde, da keine inhibitorische Wirkung auf diese Rezeptoren gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5.21: Untersuchung der Zytotoxizität von Derivat III an HEK293-Zellen HEK293-Zellen wurden 17 h mit steigenden Konzentrationen Derivat III behandelt und anschließend 2 h mit *alamarBlue*® inkubiert. Die metabolische Reduktion des Farbstoffes wurde analysiert (gemessene Wellenlänge λ_{exc} : 570 nm, Referenzwellenlänge λ_{em} : 600 nm). Dargestellt sind die Mittelwerte (Differenz A570/A600, ±SD) aus drei unabhängigen Experimenten.

5.3.4 Wirksamkeit linearer Cotransin-Derivate

Die einzelnen Derivate des Ala-*Scans* (Abb. 5.19a) und der partiellen Methylierungen (Abb. 5.20a) wurden auch in linearer Form synthetisiert, was zu neun weiteren Derivaten führte (Derivate A-I, Abb. 5.22a).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zeigten, dass die Gesamtexpression des ET_BR nach der Behandlung mit den linearen Derivaten, mit der DMSO-behandelter Zellen vergleichbar ist (Abb. 5.22b). Bei dem μ OR zeigten ebenfalls alle Derivate keine inhibitorische Wirkung (Abb. 5.22c).

Die hier durchgeführten Derivatisierungen am Cotransin bewirkten in allen Fällen einen teilweisen oder kompletten Wirkungsverlust in Bezug auf den ET_BR , wobei es zu keiner Veränderung der Selektivität kam. Bezogen auf den inhibitorischen Effekt auf den ET_BR zeigte sich, dass die Entfernung der N-Methylierung an den Positionen 5 und 7 im Amid wenig Einfluss auf die Wirksamkeit hat. Die Entfernung der N-Methylierung an Position 3 im Amid hingegen zu einem toxisch wirkenden Derivat führte. Die Substitution der Position 6 im Amid hatte keinen Einfluss auf die Wirksamkeit, verglichen mit dem Amid selbst. Weiter zeigte sich, dass lineare Derivate sowohl auf den ET_BR als auch auf den μ OR keinen inhibitorischen Effekt haben.



Abbildung 5.22: Einfluss des Auslassens der Zyklisierungsreaktion (lineare Derivate)

Der Austausch von einzelnen Positionen des Cotransins gegen Ala führte zu sieben verschiedenen Derivaten. Die partielle Methylierung von Cotransin führte zu zwei weiteren Derivaten. Nach Weglassen der Zyklisierungsreaktion, lagen diese linear vor (c). Um sie auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen, wurden mit ET_BR.GFP (b) bzw. μ OR.GFP (c) transient transfizierte HEK293-Zellen mit DMSO bzw. Cotransin oder den Derivaten (A-I) inkubiert (17 h, 30 μ M). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rezeptoren im Durchflusszytometer (10⁴ Zellen). Dargestellt sind die Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Prozent bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

6 Diskussion und Ausblick

Cotransin wurde von Garrison *et al.* als substratspezifischer Inhibitor der Proteintranslokation beschrieben [46]. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es neben den fünf bekannten Proteinen noch eine große Zahl weiterer Proteine gibt, die durch Cotransin in ihrer Expression inhibiert werden. Die Ergebnisse konnten durchflusszytometrisch und biochemisch bestätigt werden. Mit Hilfe des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Kaede konnte ein Biosyntheseassay entwickelt werden, mit dem es möglich war, die Cotransin-Wirkung auf die Biosynthese von GPCR zu quantifizieren, unabhängig von der Lebenszeit der Rezeptoren [101]. Durch gezielte Änderungen in der chemischen Struktur wurde ferner versucht die Wirkstärke und Selektivität von Cotransin zu beeinflussen.

6.1 Cotransin – ein eingeschränkt substratspezifischer Inhibitor der Proteintranslokation

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Cotransin, neben den fünf beschrieben Proteinen, die Translokation einer großen Zahl weiterer Proteine inhibiert. Insgesamt wurden über 40 sensitive Membranproteine und sekretorische Proteine identifiziert, was zeigt, dass Cotransin weniger selektiv ist, als ursprünglich beschrieben [46]. Doch trotz der Vielzahl der sensitiven Proteine die durch Cotransin in ihrer Translokation gehemmt werden, zeigte sich, dass Cotransin auch in höheren Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte aufwies (Abb. 5.1). Über die Gründe dafür lässt sich spekulieren. Eine mögliche Ursache liegt mit Sicherheit darin, dass nicht alle sensitiven Proteine, wie der ET_BR bei 30 μ M, vollständig inhibiert werden, wodurch ein Überleben der Zellen gesichert ist.

Für die Inhibition der Translokation des ET_BR und des CRF_1R durch Cotransin wurde in dieser Arbeit eine IC₅₀ ermittelt (Kap. 5.1.2), die um den Faktor 10 höher ist, als die IC₅₀ bei VCAM1 (IC₅₀ = 0,5µM) [46]. Neben methodischen Gründen, könnten hierfür Unterschiede in den Signalsequenzen verantwortlich sein. Weitere Ursachen könnten in der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme in den einzelnen Studien liegen. Hier könnte eine abweichende Aufnahmeeffizienz von Cotransin eine Rolle spielen.

6.1.1 Cotransin-Wirkung in unterschiedlichen Zelltypen

Der inhibitorische Einfluss von Cotransin auf die endogene Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wurde in humanen, glatten Muskelzellen der Atemwege (HASM-Zellen) und T-Zellen (Jurkat-Zellen) untersucht. Dabei stellte sich in dieser Arbeit heraus, dass die Sensitivität eines Proteins gegenüber Cotransin in unterschiedlichen Zelltypen einer Spezies variieren kann. Ein Beispiel ist die Sensitivität von IL-8. Während in Jurkat-Zellen die IL-8 Expression mit 30 μ M Cotransin um mehr als 50 % inhibiert wird, wurde sie in HASM-Zellen durch Cotransin nicht signifikant beeinflusst (Abb. 5.16). Auch Garrison *et al.* zeigten, dass das endogene IL-8 in humanen Endothelzellen, humanen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes und humanen dermalen Fibroblasten nicht Cotransin-sensitiv ist [46].

Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse können verschiedene Ursachen haben. Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich im Aufbau der Plasmamembran, ihrem Stoffwechsel und der Proteinexpression [102]. So könnte ein heterogener Aufbau der Plasmamembran die Aufnahme von Cotransin beeinflussen. Ferner könnten die Abbaugeschwindigkeiten von Cotransin von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich sein. Unterschiede im sekretorischen Weg haben vermutlich keinen Einfluss, da dieser innerhalb der Eukaryoten und so auch zwischen den Zelltypen eines Organismuses hoch konserviert ist [1]. So weisen die einzelnen Proteinuntereinheiten des trimeren Sec61-Komplexes hohe Sequenzhomologien selbst zwischen Säugerzellen und Hefen auf, wobei die α -UE die am stärksten konservierte Komponente darstellt [103].

6.1.2 Die Rolle des SP für die Cotransin-Sensitivität

In früheren Studien stellte sich die Frage, ob das SP für die Empfindlichkeit eines Proteins eine essentielle Rolle spielt. Für VCAM1 konnte dies gezeigt werden [46]. Auch bei den hier untersuchten GPCR besitzen alle Cotransin-sensitiven GPCR als Signalsequenz ein SP (Abb. 5.3) und zumindest beim ET_BR ist das SP für die Cotransin-Wirkung essentiell (Abb. 5.13).

Die Aminosäuren im SP von VCAM1 und VEGF, die für eine Inhibition der Translokation durch CAM741 verantwortlich sind, konnten bereits identifiziert werden. Sie sind über das gesamte SP verteilt [13, 54]. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, ein Konsensus-Motiv in der Sequenz abzuleiten [46], möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl der bisher untersuchten Proteine. Die Vielzahl der in dieser Arbeit gefundenen Cotransin-sensitiven Proteine könnte helfen, hier zukünftig mit bioinformatischen Analysen einen Schritt weiter zu kommen.

Es konnte gezeigt werden, dass Cotransin und CAM741 eine schwächere Bindung des SP an die Sec61 α -UE und eine verstärkte Bindung an die Sec61 β -UE bewirken [46]. Dies stört die effiziente Bindung sensitiver Signalsequenzen am Translokon und damit dessen Öffnung [46, 54]. Wahrscheinlich beeinflusst die Stärke, mit der die diversen Signalsequenzen [13] am Translokon binden,

deren Cotransin-Sensitivität. Die Bindungsstärke wird von Hydrophobizität und Länge der Signalsequenz beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass SP unterschiedlicher Länge und Konformation diverse Komponenten des Translokons unterschiedlich stark binden. Beispielsweise bindet das SP von VCAM1 während des Translokationsprozesses an die Sec61 α -UE des Translokons, während bestimmte SP-Mutanten des Rezeptors neben der Sec61 α -UE auch an die Sec61 β -UE binden. VCAM1-SP-Mutanten, welche eine stärkere Translokon-Bindung aufweisen, zeigen auch eine geringere Sensitivität gegenüber CAM741 [13,54,104]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die unterschiedliche Bindungsstärke und die daraus resultierenden unterschiedlichen Bindungsstellen für Signalsequenzen im Translokon unterschiedlich stark durch Cotransin beeinflust werden. Dies würde die Selektivität der Cotransin-Wirkung erklären.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch Membranproteine mit SAS Cotransinsensitiv sein können. Hier ist davon auszugehen, dass die Bindung am Translokon aufgrund der Länge und der Hydrophobizität der SAS stärker ist als bei SP. Somit könnte eine höhere Cotransin-Konzentration nötig sein, um diese Bindung zu inhibieren. Einen wichtigen Beitrag für die Ermittlung eines möglichen Cotransin-Konsensus-Motivs sollte der Vergleich der in dieser Arbeit identifizierten SP und SAS liefern. Weiter sollte geklärt werden, ob sich die Bindung der SAS im Sec61-Kanal durch Cotransin ähnlich ändert wie die der SP. Zur Aufklärung des ebenfalls noch unbekannten Aufnahmemechanismus könnte Fluoreszenz-markiertes Cotransin verwendet werden, das eine mikroskopische Analyse des Transports und der Bindung am Zielort erlauben würde.

6.2 Möglichkeiten zur Verbesserung der Löslichkeit und zellulären Aufnahme von Cotransin

Bis zu einer Konzentration von 30 μ M konnte eine klassische Konzentrationswirkungskurve von Cotransin ermittelt werden (Abb. 5.5). Ab einer Konzentration von 50 μ M nimmt die Wirkung von Cotransin erstaunlicherweise wieder ab. Hier ist zu beachten, dass es sich bei Cotransin um ein sehr hydrophobes, zyklisches Depsipeptid handelt, dessen Wasserlöslichkeit durch die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren und den Methylgruppen herabgesetzt ist. Eine der wohl wahrscheinlichsten Ursachen für den Wirkungsverlust bei hohen Konzentrationen ist, dass Cotransin in der wässrigen, 1 % DMSO-haltigen Lösung ab einer Konzentration von 50 μ M präzipitiert. Dadurch würde sich die Konzentration an freiem Cotransin, welches für die Zellen verfügbar ist, verringern.

Um Cotransin löslicher zu machen, könnte man zukünftig Komplex-bildende Substanzen (z.B. Natriumbenzoat) oder Lösungsvermittler, welche die Cluster-Struktur des Wassers verändern (z.B. Glycerol) einsetzen [105,106]. Ferner könnten liposomale Trägersysteme zum Einsatz kommen, welche den Vorteil haben, dass sie nicht nur zur Verbesserung der Löslichkeit beitragen, sondern auch zur Stabilisierung von Arzneistoffen und zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit [107]. Eine pharmakologische Anwendung von liposomalen Trägersystemen ist inzwischen in neun Fällen von liposomalen Arzneimitteln belegt, die bis 2004 zur Marktreife entwickelt worden sind. Ein Beispiel ist Abelcet® der Firma Berna Biotech [106].

Zur Verbesserung der zellulären Penetration von Cotransin könnte die Fusion von zellpenetrierenden Peptiden, wie Penetratin, TAT und KLAL beitragen [108]. Zellpenetrierende Peptide besitzen häufig kationische sowie amphipathische Eigenschaften und sind in der Lage Membranen zu passieren und so den Transport anderer Molekülen zu ermöglichen bzw. zu verbessern. Ein zellpenetrierendes Peptid, das über ein Disulfid an Cotransin gebunden wird, wäre in der Zelle auch wieder abspaltbar.

6.3 Struktur-Wirkungsanalyse von Cotransin

Die in der AG Peptidsynthese (FMP-Berlin) etablierte Festphasensynthese ermöglichte die Synthetisierung eines breiten Spektrums von Cotransin-Derivaten. Ziel dieser Derivat-Analysen war es, neben der Erhöhung der Wirkstärke und Modulation der Selektivität, den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität von Cotransin aufzuklären, da für Cotransin bisher keine Struktur-Wirkungsbeziehungen beschrieben wurden. Ein Beispiel dafür, dass strukturelle Veränderungen tatsächlich die Selektivität von Zyklodepsipeptiden beeinflussen können, wurde durch Derivatisierung des Hun7293-Abkömmlings CAM741 erbracht. Während CAM741 die Translokation sowohl von VCAM1 als auch von VEGF hemmt, inhibiert das CAM741-Derivat NFI028 nur noch die Translokation von VCAM1 [13].

Bei der Untersuchung der inhibitorischen Wirkung aller hier synthetisierten Derivate auf die Expression des ET_BR konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung von Cotransin zum großen Teil oder komplett aufgehoben wurde. Das lässt darauf schließen, dass es durch die durchgeführten Modifizierungen des Cotransin-Moleküls zu chemischen und biologischen Veränderungen gekommen ist, die ein effizientes Binden am Zielort nicht mehr ermöglichen. Denkbar wären Veränderungen in der Lipophilie, die den Transport und die Verteilung der Substanzen ungünstig beeinflussen. Hydrophilere Substanzen können Lipidmembranen kaum überwinden, hydrophobe Substanzen sind dagegen in der wässrigen Phase schlecht löslich und akkumulieren in Membranen. Um eine optimale mittlere Lipophilie zu erzielen, ist es erforderlich, dass das Peptid an seiner Oberfläche überwiegend polare Aminosäurereste trägt [100]. Der lipophile Anteil sollte dabei in seiner Größe und Konformation zu dem hydrophilen Anteil passen. Der Austausch N-methylierter durch unmodifizierte Aminosäuren kann z.B. die Lipophilie eines Moleküls verändern. Die Methylgruppe erhöht die Hydrophobizität eines Peptids und trägt zur enzymatischen Stabilität und biologischen Verfügbarkeit bei. N-methylierte Amidbindungen können kaum durch Proteasen

gespalten werden und gelten deswegen als sehr stabil [100]. Die Entfernung der N-Methylierung an den Positionen 5 und 7 im Amid (Derivat I und II, Abb. 5.20) hatte jedoch nur wenig Einfluss den inhibitorischen Effekt, verglichen mit dem Amid, wo nur lac gegen Ala substituiert wurde (Derivat a, Abb. 5.19a). Für Cotransin und Hun-7293 wurde jedoch gezeigt, dass die Methylierung im Depsipeptid an Position 5 für die inhibitorische Wirkung auf VCAM1 essentiell ist [46,52]. Um einen direkten Vergleich ziehen zu können, wäre es nötig, auch den inhibitorischen Effekt dieses Derivates auf den ET_BR zu untersuchen. Die Rückgradmethylierung von Hun-7293 an Position 3 zeigte hingegen, dass es sich dabei immer noch um ein Derivat mit inhibitorischer Potenz handelt. Die Entfernung der Methylierung an Position 3 im Amid (Derivat III) führte hier zu einem Derivat, welches einen ähnlichen inhibitorischen Effekt aufwieß, wie das Amid, in hohen Konzentionen jedoch toxisch war. Zum Einen lässt sich dies durch eine verbesserte Verfügbarkeit des Moleküls erklären, z.B. aufgrund einer veränderten Lipophilie und/oder einer veränderten enzymatische Degradation. Zum Anderen könnte es zu einer Konformationsänderung gekommen sein, die die Bindung an einen anderen Wirkort ermöglichte.

Besonders die Auflösung der Heptastruktur zu einer Hexastruktur oder das Auflösen der zyklischen Struktur (lineare Derivate) ziehen große Konformationsänderungen nach sich. Entsprechend konnte hier gezeigt werden, dass die zyklische Struktur des Cotransins für die Wirksamkeit auf die Biosynthese des ET_BR essentiell ist. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass im Gegensatz zu den regiden, zyklischen Molekülen lineare Strukturen viel flexibler sind und so nicht mehr optimal in die Bindungstasche passen. Auch bei der Substitution von lac durch Ala (wodurch das Depsipeptid zu einem Amid wird, Derivat a), ist davon auszugehen, dass die Konformation des Moleküls stark beeinflusst wird (Abb. 5.19). Und auch durch diese Derivatisierung verlor Cotransin an Wirkstärke. Eine zusätzliche Substitution an Position 6 durch Ala (Derivat c) bewirkte jedoch keinen zusätzlichen Wirkungsverlust. Es ist somit denkbar, dass Leu an Position 6 eine untergeordnete Rolle in der Wirksamkeit spielt. In anschließenden Analysen von weiteren Derivaten sollte die Ala-Substitution an dieser Position im Depsipeptid untersucht werden. Sollte sich diese Position als variabel für die Cotransin-Wirksamkeit herausstellen, wäre es möglich hier einen Crosslinker einzubauen, um die direkte(n) Bindungsstelle(n) von Cotransin identifizieren zu können. Hinweise dazu könnten Modelling-Studien liefern, die mit Hilfe der bekannten 3D-Strukturen von Sec61 [109] und der Ausgangssubstanz Hun-7293 [110] durchgeführt werden könnten.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der Derivate zeigte für den Cotransin-insensitiven μ OR keine Veränderung in der Selektivität. Zukünftige Derivate könnten aber eine alternative Bindung am Sec61-Kanal eingehen und so eine Verschiebung des inhibitorischen Effektes von Cotransin auf den μ OR oder auf andere Proteine ermöglichen. Hier erscheint ein breites Vorgehen gerechtfertigt, da die bisherigen Informationen, die ausschließlich am Hun-7293 gewonnen wurden, nur sehr begrenzt auf Cotransin übertragbar sind.

Ein weiteres wichtiges Ziel wäre es, umgekehrt ein Derivat zu finden, das unabhängig von Signalpeptiden den Sec61-Kanal blockiert ("universeller" Sec61-Blocker). Ein solches Derivat wäre für die Forschung am proteinleitenden Translokon-Komplex sehr wertvoll.

6.4 Verwendung eines Kaede-basierten Biosyntheseassays zur Analyse der Cotransin-Inhibition

Kürzlich konnten Schmidt *et al.* zeigen, dass GPCR-Fusionen mit dem photokonvertierbaren Fluoreszenzprotein Kaede dazu benutzt werden können, um den Transport der Rezeptoren zwischen verschiedenen Kompartimenten einer Zelle zu untersuchen. Um die Wirksamkeit des Cotransins auf die Inhibition der Translokation weiter zu testen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Anwendung der Kaede-Technologie etabliert (Kap. 5.1.3). Hierfür wurde das gKaede-Signal der Rezeptoren zu einem bestimmten Zeitpunkt komplett zu rKaede konvertiert und die Neusynthese über das Wiedererscheinen der gKaede-Fluoreszenz quantifiziert. Die Quantifizierung ist sowohl in einzelnen Zellen mikroskopisch, als auch durchflusszytometrisch für eine große Zellpopulation möglich. Mit Hilfe dieser Technologie ist es möglich, nur neusynthetisierte Rezeptoren zu betrachten, da bereits vorhandene Rezeptoren aufgrund des rKaede-Signals nicht in die Quantifizierung einfließen. Es sollte leicht möglich sein, diese Anwendung der Kaede-Technologie an ein *Highthroughput-screening*-System anzupassen, um neue Substanzen zu finden, die einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Cotransin haben.

6.5 Pharmakologische Bedeutung von Cotransin und seinen Derivaten

Cotransin inhibiert höchst wahrscheinlich die Translokation, in dem es die effiziente Bindung des SP [46] oder der SAS am Sec61-Kanal behindert, so dass dieser nicht mehr geöffnet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich die Neusynthese des ET_BR durch Cotransin vollständig inhibieren lässt und damit auch dessen Signalisierung komplett unterbunden wird. Pharmakolisch wirkt Cotransin jedoch zu unselektiv auf die Expression von Membran- und sekretorischen Zielproteinen. Zu den Proteinen, die durch Cotransin inhibiert werden, gehören z.B. Zelladhäsionsproteine [46], Zytokine und Wachstumsfaktoren. Eine gleichzeitige Inhibition dieser Proteine würde zur Hemmung des Immunsystems und zu Organversagen führen. Aufgrund der Signalsequenz-Diversität ist es denkbar ein selektiveres Cotransin-Derivat zu entwickeln, welches dann auch ein therapeutisches Potential hätte [111].

Aufgrund der Homologien der Bindungstasche von Rezeptorsubtypen sind viele Antagonisten nicht Subtyp-spezifisch, was in der pharmakologischen Anwendung zu vielen unerwünschten

Nebenwirkungen führt. Ein Beispiel ist der Antagonist Bosentan, der sowohl den ET_BR als auch den ET_AR blockiert [112]. Ein selektiv wirkendes Cotransin-Derivat, das die Synthese des ET_BR blockiert, könnte hier von Vorteil sein.

Ein weiterer wichtiger pharmakologischer Ansatz wäre der Einsatz von selektiven Cotransin-Derivaten bei der Behandlung von viralen Erkrankungen. Denn auch viele virale Proteine werden über den sekretorische Weg transloziert und stellen somit potentielle Zielproteine dar. Beispielsweise wird das Vorläuferprotein des Glykoproteins der Lipidhülle des Lassa-Virus über den sekretorischen Weg transloziert [113]. Könnte dessen Translokation unterbunden werden, würde es nicht zum Zusammenbau des Viruspartikels kommen und der Ausbruch der Krankheit könnte möglicherweise verhindert werden. Bis heute existiert gegen das Lassa-Virus kein Impfstoff und nur eine unzureichende Ribavirin-Therapie [113].

7 Zusammenfassung

Der größte Teil der heutigen Arzneimittel stammt direkt oder indirekt von Biomolekülen ab. Sie dienen als Leitstrukturen und werden weiter chemisch verändert, um ihre erwünschten Eigenschaften zu optimieren und ihre Nebenwirkungen zu minimieren [100]. Auf der Suche nach einem Arzneimittel gegen chronisch entzündliche und Autoimmunerkrankungen konnte 1992 eine Leitstruktur identifiziert werden, welche einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von ICAM-1 zeigte [58]. Bei dieser Substanz handelte es sich um Hun-7293, ein sekundärmetabolitisch in Pilzen gebildetes makrozyklisches Heptadepsipeptid. Eine erste Optimierung dieser Substanz führte zum Derivat Cotransin [46, 52]. Bis heute ist die Cotransin-Wirkung noch nicht im Detail geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass es die Expression einiger sekretorischer und Membranproteine inhibiert. Es wird vermutet, dass Cotransin Signalsequenz-spezifisch die stabile Insertion der naszierenden Polypeptidkette in den Sec61-Translokationskanal des endoplasmatischen Retikulums inhibiert. Als Cotransin-sensitiv wurden vor dieser Arbeit nur fünf Proteine beschrieben, die Membranrezeptoren VCAM1, P-Selektin und CRF₁R und die sekretorischen Proteine β -Lactamase und Angiotensinogen [46].

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Pharmakologie wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Cotransin-Sensitivität einiger ausgewählter GPCR untersucht. Von den zehn untersuchten GPCR wurde die Expression des TSHR, des ET_AR und des ET_BR durch Cotransin inhibiert. Bei der Erstellung von Konzentrationswirkungskurven zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt von Cotransin bei höheren Konzentrationen abgeschwächt ist, was vermutlich auf Löslichkeitsprobleme und einer daraus resultierenden Präzipitation der Substanz zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnte im Falle des ET_BR gezeigt werden, dass durch die Cotransin-Behandlung der Zellen die Expression des Rezeptors vollständig unterbunden wird. Dafür wurde mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen eine neue Methode etabliert, mit der die Expression von Rezeptoren und damit die Cotransin-Wirkung in Echtzeit messbar ist – sowohl mikroskopisch, auf Einzelzellebene, als auch durchflusszytometrisch innerhalb einer großen Zellpopulation.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass das SP des ET_BR für die Cotransin-Sensitivität verantwortlich ist, und dass diese Eigenschaft durch Fusion des ET_BR -SP auf andere Cotransin-insensitive GPCR übertragbar ist. Um weitere Cotransin-sensitive Proteine zu identifizieren wurde eine massenspektrometrische Expressionsanalyse von Proteinen nach Cotransin-Behandlung von Zellen durchgeführt. Dabei wurden deutlich mehr Cotransin-sensitive Proteine gefunden als erwartet, wobei ein Teil von ihnen eine SAS besitzt. Die Cotransin-Sensitivität kann somit offensichtlich sowohl durch SP als auch durch SAS vermittelt werden.

Peptide, welche spezifisch die Biosynthese einzelner Proteine hemmen, wären wertvolle zellbiologische Werkzeuge und würden die Möglichkeit eröffnen, mit völlig neuartig wirkenden Substanzen in Signaltransduktionswege eingreifen zu können. Aus diesem Grund wurden im letzten Teil der Arbeit neue Cotransin-Derivate hergestellt, mit dem Ziel, Wirkstärke und Selektivität der Substanz zu verändern. Im Rahmen dieser Versuche ist es bisher nicht gelungen, die Spezifität von Cotransin zu verändern oder die Wirkstärke zu verbessern. Die Arbeiten liefern einen Beitrag zu ersten Struktur- / Funktionsanalysen des Cotransins. So zeigte sich, dass die zyklische Struktur des Heptadepsipeptids für die Wirkung essentiell ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Position 6 im Amid keinen weiteren Einfluss auf die Wirksamkeit gegenüber dem Amid hat.

Zusammengefasst wird in dieser Arbeit belegt, dass Cotransin keinesfalls so selektiv ist, wie von Garrison *et al.* publiziert [46]. Es wird ferner klar, dass es schwierig ist, die Struktur- / Funktionsbeziehung des Cotransins zu charakterisieren, um selektive Derivate zu finden. Da es sich bei den Zyklodepsipeptiden um völlig neue Wirkstoffe mit hohem Potential handelt, sollten diese Arbeiten fortgeführt werden.

8 Abstract

The majority of drugs today come directly or indirectly from biomolecules. They are used as lead compounds and are further chemically modified to optimize the required properties and minimize their side effects [100]. In search of a drug against chronic inflammatory and autoimmune diseases, a lead structure was identified in 1992, which shows an inhibitory effect on the expression of ICAM-1 [58]. This substance was Hun-7293, a macrocyclic heptadepsipeptide which is a secondary metabolite in fungi. A first optimization of this substance led to the derivate cotransin [46, 52]. Until today, the cotransin-effect has not yet been clarified in detail. However, it is known that the expression of some secretory and membrane proteins is inhibited. It is assumed that cotransin inhibits the stable insertion of the nascent polypeptide chain into the Sec61 translocation channel of the endoplasmatic reticulum in a signal sequence discriminative manner. Previous to this work only five cotransin-sensitive proteins were described – the membrane receptors VCAM1, P-selectin and CRF₁R and the secretory proteins β -lactamase and angiotensinogen [46].

As GPCRs play a central role in pharmacology, in the first part of this work, the cotransin-sensitivity of some selected GPCRs was examined. Ten GPCRs were analysed and the expression of the TSHR, the ET_AR and ET_BR was inhibited by cotransin. The concentration response curves showed that the inhibitory effect of cotransin is weakened at higher concentrations, presumably due to solubility problems and resultant precipitation of the substance. Furthermore, in case of the ET_BR , it was shown that due to the cotransin treatment the expression is completely inhibited. Additionally, using Kaede fusion proteins we developed a new method to measure the expression of receptors in real time and thus the cotransin-effect – both microscopically at single cell level and by flow cytometry within a big cell population.

It could be shown that the SP of the ET_BR is responsible for the cotransin-sensitivity and that this property can be transferred by fusion of the SP- ET_BR to other cotransin-insensitive GPCRs. To identify other cotransin-sensitive proteins a mass spectrometric analysis of protein expression after cotransin-treatment was carried out. There was a notably increased amount of cotransin-sensitive proteins than expected and part of them possess a SAS. The cotransin-sensitivity can thus be mediated by both SPs and SASs obviously.

Peptides that specifically inhibit the biosynthesis of individual proteins would be valuable cellbiological tools and would open the possibility of completely new active substances in signal transduction. Therefore in the last part of this thesis new cotransin derivatives were synthesized, with the aim to change the potency and selectivity of the substance. During the trials it has not yet been possible to alter the specificity of cotransin or modulate the potency in the desired direction. This work contributes to a first structure/function-analysis of cotransin, showing that the cyclic structure is essential for the effect of heptadepsipeptids. Furthermore, it was shown that the exchange of position 6 in the amide has no further influence on the effectiveness compared to the amide.

In summary, this work shows that cotransin is not as selective as Garrison *et al.* published [46]. It was also shown that it is difficult to assess the structure/function-relationships that characterize cotransin to find more selective derivatives. The cyclodepsipeptides are completely new agents with high potential, therefore the research work should be continued.

A Anhang

Tabellenverzeichnis

A.1	Membranproteine, Cotransin-sensitiv	xiv
A.2	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (1 von 5)	XV
A.3	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (2 von 5)	xvi
A.4	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (3 von 5)	xvii
A.5	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (4 von 5)	xviii
A.6	Membranproteine, Cotransin-insensitiv (5 von 5)	xix
A.7	Sekretorische Proteine, Cotransin-sensitiv (1 von 2)	XX
A.8	Sekretorische Proteine, Cotransin-sensitiv (2 von 2)	xxi
A.9	Sekretorische Proteine, Cotransin-insensitiv	xxii
A.10	Sekretorische Proteine, durch Cotransin hoch-reguliert	xxii

Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Signalsequenz
		H/L	Count	L/H rev	Count rev	
Integral membrane protein 2C	Q9NQX7-1	20,75	2	10,17	2	SAS
Integral membrane protein 2B	Q9Y287	12,23	L	5,08	4	SAS
HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	P04233-1	10,47	9	9,66	4	SAS
Trans-Golgi network integral membrane protein 2	O43493-1	4,70	3	4,48	3	SP
UPF0414 transmembrane protein C20orf30	Q96A57-2	4,16	2	4,01	2	SAS
Endothelin-converting enzyme 1	P42892-1	3,84	5	3,24	5	SAS
Acyl-CoA desaturase	O00767	3,72	9	5,02	3	SAS
Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	O00469-2	2,98	15	3,46	10	SP
MAN1A1 protein	Q6P052	2,71	ю	1,22	2	SAS
Neurotensin receptor 3	Q99523	2,36	2	1,99	9	SP
Integrin α -6	P23229-1	2,17	ю	2,51	3	SP
Carboxypeptidase D	O75976	2,15	15	2,10	15	SP
Nodal modulator 2	Q5JPE7-1	1,98	32	2,21	38	SP
Transmembrane protein 2	900HN6	1,91	4	2,31	9	k. A.
Zinc transporter ZIP14	Q15043-1	1,90	34	1,35	21	SP
Amyloid-like protein 2	Q06481-1	1,87	10	1,82	19	SP
Erlin-1	O75477	1,85	15	1,75	10	SAS
Lysosome membrane protein 2	Q14108	1,83	4	1,89	3	SAS
Erlin-2	O94905-1	1,83	20	1,70	18	SAS
Cadherin-2	P19022	1,71	4	1,89	8	SP
Lutheran blood group glycoprotein	P50895	1,63	20	1,99	17	SP

 Tabelle A.1: Membranproteine, Cotransin-sensitiv

Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Signalsequenz
		H/L	Count	L/H rev	Count rev	
Tyrosine-protein kinase-like 7	Q13308	1,74	6	1,44	12	SP
Asialoglycoprotein receptor 1	P07306	1,73	14	1,68	14	SAS
Melanoma inhibitory activity protein 3	Q5JRA6-1	1,64	8	1,66	4	SP
Putative uncharacterized protein KIAA0090	Q8N766-1	1,61	9	1,97	5	SP
Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor	Q6P9D1	1,56	22	1,80	19	SP
Malectin	Q14165	1,51	11	1,63	L	SP
Aminopeptidase N	P15144	1,50	51	1,68	46	SAS
Immunoglobulin superfamily member 1	Q8N6C5-1	1,48	3	1,85	2	SP
Vesicular integral-membrane protein VIP36	Q12907	1,47	19	1,43	19	SP
Nicastrin	Q92542-1	1,46	12	1,42	8	SP
Inhibitor of nuclear factor k-B kinase-interacting protein	Q70UQ0-4	1,45	13	1,28	34	SAS
Protein sel-1 homolog 1	Q9UBV2-1	1,43	14	1,30	15	SP
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	P11279	1,40	18	1,37	18	SP
Synaptogyrin-2	Q3KQZ2	1,39	9	1,28	2	SAS
Vesicle-associated membrane protein 8	Q9BV40	1,36	9	1,05	8	SAS
Tyrosine-protein kinase receptor ECK	B4DL04	1,36	5	1,75	3	k. A.
Integrin α -2	P17301	1,34	7	1,87	L	SP
Secretory carrier-associated membrane protein 2	015127	1,33	5	1,29	3	SAS
Zinc transporter SLC39A7	Q92504	1,33	5	1,15	3	SAS
Activated leukocyte cell adhesion molecule	Q13740-1	1,32	4	1,18	5	SP
Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	Q9Y3A6	1,32	5	1,30	L	SP
Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	P67812	1,32	11	1,33	9	
Scavenger receptor class B member 1	Q8WTV0-1	1,32	6	1,43	5	SAS
Integrin β -1	Q8WUM6	1,32	25	1,34	23	SP
Transmembrane protein 4	Q9Y2B0-1	1,30	11	1,38	12	SP
Receptor expression-enhancing protein 5	Q00765	1,29	L	1,08	11	SAS
Synaptobrevin-3	A8MVP3	1,27	11	1,02	10	SAS
Endoplasmic reticulum stress-response protein 25	Q7Z7H5-1	1,27	5	1,23	Э	SP
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	Q9BVK6	1,27	24	1,21	15	SP
Syntaxin-7	015400-1	1,27	L	1,22	8	SAS

 Tabelle A.2: Membranproteine, Cotransin-insensitiv (1 von 5)

Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Signalsequenz
		H/L	Count	L/H rev	Count rev	
Na(+)/K(+) ATPase α -1 subunit	P05023-1	1,26	211	1,45	165	SAS
Transmembrane protein Tmp21	P49755	1,25	22	1,34	17	SP
Nck-associated protein 1	Q9Y2A7	1,25	18	0,83	15	k. A.
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	P39656	1,25	30	1,23	37	SP
ER-Golgi intermediate compartment 32 kDa protein	Q969X5-1	1,24	10	1,17	4	SAS
Lectin mannose-binding 2-like	Q9H0V9-2	1,24	L	1,45	3	SP
Probable ergosterol biosynthetic protein 28	Q9UKR5	1,23	б	1,20	5	SP
Signal peptidase complex subunit 1	Q9Y6A9	1,23	7	1,31	3	SAS
Signal recognition particle receptor subunit α	P08240	1,23	4	1,03	8	SP
Signal sequence receptor subunit delta	P51571	1,22	16	1,22	18	SP
Receptor expression-enhancing protein 6	Q96HR9	1,22	5	1,27	4	SAS
Sterol-4- α -carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	Q15738	1,21	14	1,16	10	SAS
Lanosterol 14- α demethylase	Q16850	1, 19	5	1,74	9	k. A.
ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein	P49257	1,18	26	1,10	20	SP
E2-induced gene 5 protein	Q96A26	1,17	8	1,03	6	k. A.
Junctional adhesion molecule 1	Q9Y624	1,17	8	1,36	5	SP
Signal peptidase complex subunit 2	Q15005	1,17	13	1,09	13	SAS
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2	P04844	1,17	125	1,30	83	SP
Leukocyte activation antigen M6	P35613-1	1,17	31	1,32	33	SP
Signal sequence receptor subunit α	P43307-1	1,16	6	1,27	6	SP
Syntaxin 12	B1AJQ6	1,16	б	1,40	2	SAS
Fibronectin type III domain-containing protein 3B	Q53EP0-1	1,16	7	1,12	3	k. A.
Signal peptidase complex subunit 3	P61009	1,16	9	1,33	4	SAS
Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	P37268	1,15	25	1,03	25	k. A.
Flotillin-1	075955	1,15	5	1,36	9	k. A.
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	Q9H3N1	1,15	12	1,33	6	SP
Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	Q15363	1,15	14	1,39	6	SP
Inhibitor of nuclear factor k-B kinase-interacting protein	Q70UQ0-1	1,14	12	1,32	11	SAS

 Tabelle A.3: Membranproteine, Cotransin-insensitiv (2 von 5)

Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Signalsequenz
		H/L	Count	L/H rev	Count rev	
Toll-like receptor adapter molecule 2 (TICAM-2)	Q9Y3B3	1,14	3	1,56	3	SP
Transferrin receptor protein 1	P02786	1,14	99	1,10	67	SAS
Kinesin receptor	Q86UP2-1	1,14	69	1,10	67	SAS
Transmembrane protein 214	Q6NUQ4	1,13	14	1,11	10	k. A.
α-mannosidase 2	Q16706	1,13	13	1,25	12	SAS
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit β -1	P05026-1	1,13	11	1,30	12	SAS
Desmoglein-2	Q14126	1,13	Э	1,37	5	SP
Aspartyl/asparaginyl β -hydroxylase	Q12797	1,12	18	1,20	11	SAS
Signal sequence receptor subunit gamma	Q9UNL2	1,12	6	1,11	6	SAS
Sphingosine-1-phosphate lyase 1	095470	1,12	9	1,11	3	SAS
Oxidoreductin-1-L- α	Q96HE7	1,12	13	1,33	13	SP
Cytoskeleton-associated protein 4	Q07065-1	1,10	47	1,14	64	SAS
Cell adhesion molecule 1	Q9BY67-2	1,09	7	1,14	9	SP
Coiled-coil domain-containing protein 47	Q96A33-1	1,08	11	1,18	11	SP
ATP-binding cassette sub-family D member 3	P28288-1	1,08	43	1,03	15	SP
Syntaxin-4	Q12846	1,08	4	1,04	33	SAS
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	P04843	1,08	44	1,10	76	SP
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Q13724	1,08	31	1,21	28	SAS
Retinol dehydrogenase 11	Q8TC12-1	1,07	6	1,14	2	k. A.
Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	Q9UM00-1	1,07	10	1,24	11	k. A.
Serine palmitoyltransferase 1	015269	1,07	9	1,14	L	SAS
Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit STT3A	P46977	1,07	60	1,22	43	SAS
Plexin-B2	015031	1,07	4	1,17	2	SP
Lymphocyte activation antigen 4F2 large subunit	P08195	1,07	85	1,19	72	SAS
Monocarboxylate transporter 1	P53985	1,06	13	1,31	11	SAS
Transmembrane protein 111	Q9P0I2-1	1,06	4	1,15	5	SAS
Coiled-coil domain-containing protein 56	Q9Y2R0	1,06	7	0,93	9	SAS
Major histocompatibility complex class I antigen-binding protein p88	P27824	1,05	65	1,14	67	SP

 Tabelle A.4: Membranproteine, Cotransin-insensitiv (3 von 5)

Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Signalsequenz
		H/L	Count	L/H rev	Count rev	
Vesicle-trafficking protein SEC22b	075396	1,05	29	1,06	16	SAS
Alkaline phosphodiesterase I	P22413	1,05	8	1,60	6	SAS
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	P27105	1,04	14	1,18	3	SAS
Transmembrane protein 97	Q5BJF2	1,04	S	1,34	2	SAS
B-cell receptor-associated protein 31	P51572	1,04	31	1,09	29	SAS
Synaptic glycoprotein SC2	Q9NZ01-1	1,03	24	1,11	15	k. A.
Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	095292-1	1,03	21	1,06	12	SAS
Dolichyl-phosphate β -glucosyltransferase	Q9Y673	1,02	2	1,05	2	SAS
Reticulon-3	095197-1	1,02	5	0,90	4	SAS
Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	1,02	9	0,88	6	SAS
Estradiol 17- β -dehydrogenase 12	Q53GQ0	1,02	26	1,09	18	k. A.
Transmembrane 9 superfamily member 4	Q92544-1	1,01	22	1,36	11	SP
Neutral amino acid transporter B(0)	Q15758	1,01	17	1,21	18	SAS
Protein jagunal homolog 1	Q8N5M9	1,00	б	1,05	2	SAS
Claudin-1	095832	1,00	9	0,99	2	k. A.
CAAX prenyl protease 1 homolog	O75844	1,00	L	0,99	2	k. A.
Cytochrome b5	P00167-1	0,99	10	1,00	10	SAS
Dipeptidyl peptidase 4	P27487	0,99	4	1,18	4	SAS
Fatty aldehyde dehydrogenase	P51648-2	0,99	11	1,01	13	SAS
Prostaglandin E synthase 2	Q9H7Z7	0,97	L	1,01	4	SP
Membrane-associated progesterone receptor component 1	000264	0,96	13	1,09	14	SAS
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	O60488-1	0,96	11	0,84	6	SAS
Extended synaptotagmin-2	A0FGR8-1	0.95	2	1,08	2	k. A.
Protein tyrosine phosphatase-like protein PTPLAD1	Q9Р035	0,95	18	1,12	8	SAS
Epoxide hydrolase 1	P07099	0,95	9	1,12	26	SAS
Leucine-rich repeat-containing protein 59	Q96AG4	0,94	28	0,94	34	SAS
Intercellular adhesion molecule 1	P05362	0,94	11	1,34	11	SP
Transmembrane protein 33	P57088	0,93	6	1,01	33	k. A.
p180/ribosome receptor	A7BI36	0,92	249	0,97	322	SAS
Extended synaptotagmin-1	Q9BSJ8-1	0,92	34	0,95	37	k. A.

 Tabelle A.5: Membranproteine, Cotransin-insensitiv (4 von 5)

Proteinname	UniProt-ID	Ratio H/L	Ratio Count	Ratio L/H rev	Ratio Count rev	Signalsequenz
24-dehydrocholesterol reductase	Q15392	0.91	19	0,98	10	SP
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	P16615-1	0,89	26	0,93	29	SAS
Biliary glycoprotein	Q13857	0,89	5	1,15	L	SP
Surfeit locus protein 4	O15260-1	0,87	25	0,87	31	SAS
Membrane-associated progesterone receptor component 2	015173	0,87	10	1,04	8	k. A.
Monocarboxylate transporter 4	015427	0,86	30	1,07	15	SAS
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	P33121-1	0,84	L	0,86	9	SAS
CDGSH iron sulfur domain-containing protein 2	Q8N5K1	0,84	8	0,94	4	SAS
Golgin B1	B2Z291	0,82	12	0,90	8	SP
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	P11166	0,81	60	1,00	47	SAS
Adipocyte plasma membrane-associated protein	О9HDC9	0,79	9	1,26	32	SAS
Protein transport protein Sec61 subunit β	P60468	0,78	б	0,64	9	SAS
Translocation protein SEC62	Q99442	0,78	5	1,00	С	SAS
α -1,3-mannosyltransferase ALG2	Q9H553-1	0,74	6	0,69	4	k. A.
Signal recognition particle receptor subunit β	Q9Y5M8	0,74	14	0,82	15	SAS
Translocation protein SEC63 homolog	Q9UGP8	0,72	13	0,75	10	SAS
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3	P11169	0,68	16	0,83	20	SAS
Protein transport protein Sec61 subunit α isoform 1	P61619-1	0,64	27	0,68	12	SAS
Minor histocompatibility antigen H13	Q8TCT9-1	0,64	39	0,82	29	SAS

 Tabelle A.6: Membranproteine, Cotransin-insensitiv (5 von 5)

Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
		ΗЛ	Count	L/H rev	Count rev
Carboxypeptidase E	P16870	103,21	34	58,58	38
Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1	Q8N4F0	75,51	14	38,08	7
α -fetoprotein	P02771	68,33	288	34,42	311
Apolipoprotein E	P02649	60,76	145	49,18	189
Apolipoprotein M	095445	50,00	4	39,31	8
cDNA, FLJ92861	B2R6A4	43,04	2	20,59	3
α -2-antiplasmin	Q8N5U7	42,84	28	35,89	45
Corticosteroid-binding globulin	P08185	41,12	12	12,81	14
Neuroserpin	Q99574	39,70	б	15,70	9
α -2-HS-glycoprotein	P02765	38,91	49	26,15	72
Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3	Q06033-1	36,38	10	18,59	6
Inter- <i>a</i> -trypsin inhibitor heavy chain H2	P19823	35,26	331	24,29	443
Gastricsin	P20142	32,05	13	16,87	18
Complement factor B	P00751-1	30,38	45	19,07	47
Complement factor I	P05156	29,84	17	18,06	18
Carboxypeptidase N subunit 2	P22792	29,71	13	19,10	12
Antithrombin-III	P01008	29,22	18	19,32	6
α -1-antichymotrypsin	P01011-2	28,20	146	17,21	175
Apolipoprotein B-100	P04114	28,10	280	15,22	160
Apolipoprotein A-I	P02647	25,83	433	16,36	352
Plasma serine protease inhibitor	P05154	25,15	83	13,00	LL
Lysozyme C	P61626	24,22	9	18,20	44
α -1-acid glycoprotein 2	P19652	23,06	14	12,35	6
Thyroxine-binding globulin	P05543	22,91	16	13,64	14
Semaphorin-3B	Q13214-1	22,90	б	12,06	4
α -1-acid glycoprotein 1	P02763	22,82	36	12,40	25
Complement C3	P01024	21,83	467	16,04	009
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	Q8NBP7-1	21,32	12	7,74	36
α -2-macroglobulin	P01023	21,08	717	16,05	<i>1</i> 96
Haptoglobin	P00738	18,88	43	10, 29	41

 Tabelle A.7: Sekretorische Proteine, Cotransin-sensitiv (1 von 2)
Proteinname	UniProt-ID	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
		НЛ	Count	L/H rev	Count rev
Growth/differentiation factor 15	Q99988	18,85	14	13,82	42
Vitamin K-dependent protein S	P07225	18,11	L	11,88	11
Granulins	P28799-1	16,10	6	15,83	13
Tissue factor pathway inhibitor	P10646-1	14,02	L	7,25	10
Kallistatin	P29622	13,66	4	2,85	2
C3/C5 convertase	P06681	12,50	9	7,23	9
Ribonuclease T2	A6XND5	12,33	9	6,79	8
Zinc- α -2-glycoprotein	P25311	10,15	25	6,14	28
Fibulin 1	B0QY41	10,04	14	6,05	13
Protein AMBP	P02760	9,58	85	6,84	116
Retinol-binding protein 4	P02753	8,70	21	4,79	26
Plasma α -L-fucosidase	Q9BTY2	8,58	19	7,08	16
Leucine-rich α -2-glycoprotein	P02750	8,47	5	7,13	5
Phospholipid transfer protein	P55058-1	7,89	2	12,18	4
Ceruloplasmin	P00450	7,70	16	7,83	23
Insulin-like growth factor II	P01344-2	5,00	5	3,06	9
Vitronectin	P04004	4,51	11	25,94	11
α -1B-glycoprotein	A8K052	4,42	4	4,06	4
Serpin peptidase inhibitor, clade D (Heparin cofactor), member 1	Q8IVC0	3,83	17	4,32	22

Г

-

 Tabelle A.8: Sekretorische Proteine, Cotransin-sensitiv (2 von 2)

_

Proteinname	UniProt-ID	Ratio H/L	Ratio Count	Ratio L/H rev	Ratio Count rev
Calumenin	043852-1	1,5003	14	1,4336	12
Plasminogen activator inhibitor 1	P05121	1,3761	17	1,053	25
Proteinname	UniProt-ID	Ratio H/L	Ratio Count	Ratio L/H rev	Ratio Count rev





50

0,10

26

0,11

P08833

Insulin-like growth factor-binding protein 1

Literaturverzeichnis

- [1] ANGELOTTI, T; DAUNT, D; SHCHERBAKOVA, OG.; KOBILKA, B; HURT, CM.: Regulation of G-protein coupled receptor traffic by an evolutionary conserved hydrophobic signal. In: *Traffic* 11 (2010), Jan, Nr. 4, S. 560–578
- [2] ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WATSON, James D.: *Molecular Biology of the Cell*. 3. Auflage. Taylor & Francis, 1994
- [3] KORNFELD, R; KORNFELD, S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. In: *Annu Rev Biochem* 54 (1985), S. 631–664
- [4] ESKO, J D.: Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. In: *Curr* Opin Cell Biol 3 (1991), Oct, Nr. 5, S. 805–816
- [5] GETHING, M J.; SAMBROOK, J: Protein folding in the cell. In: *Nature* 355 (1992), Jan, Nr. 6355, S. 33–45
- [6] ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith;
 WATSON, James D.: *Molecular Biology of the Cell 3E*. 3. Garland Science, 1994 http://amazon.com/o/ASIN/0815316194/. – ISBN 9780815316190
- [7] JOHNSON, A E.; WAES, M A.: The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. In: Annu Rev Cell Dev Biol 15 (1999), S. 799–842
- [8] KÖCHL, R; ALKEN, M; RUTZ, C; KRAUSE, G; OKSCHE, A; ROSENTHAL, W; SCHÜLEIN, R: The signal peptide of the G protein-coupled human endothelin B receptor is necessary for translocation of the N-terminal tail across the endoplasmic reticulum membrane. In: J Biol Chem 277 (2002), May, Nr. 18, S. 16131–16138
- [9] WALLIN, E; HEIJNE, G von: Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. In: *Protein engineering* 8 (1995), Jul, Nr. 7, S. 693–8
- SCHULZ, K; RUTZ, C; WESTENDORF, C; RIDELIS, I; VOGELBEIN, S; FURKERT,
 J; SCHMIDT, A; WIESNER, B; SCHÜLEIN, R: The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents

Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity. In: *J Biol Chem* 285 (2010), Oct, Nr. 43, S. 32878 – 32887

- [11] NIELSEN, H; ENGELBRECHT, J; BRUNAK, S; HEIJNE, G von: Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. In: *Protein Eng* 10 (1997), Jan, Nr. 1, S. 1 – 6
- [12] NIELSEN, H; BRUNAK, S; HEIJNE, G von: Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. In: *Protein Eng* 12 (1999), Jan, Nr. 1, S. 3 9
- [13] HARANT, H; WOLFF, B; SCHREINER, EP.; OBERHAUSER, B; HOFER, L; LETTNER, N; MAIER, S; VRIES, JE.; LINDLEY, IJ.: Inhibition of vascular endothelial growth factor cotranslational translocation by the cyclopeptolide CAM741. In: *Mol Pharmacol* 71 (2007), Jun, Nr. 6, S. 1657–1665
- [14] HEGDE, R S.; BERNSTEIN, H D.: The surprising complexity of signal sequences. In: *Trends Biochem Sci* 31 (2006), Oct, Nr. 10, S. 563–571
- [15] MARTOGLIO, B: Intramembrane proteolysis and post-targeting functions of signal peptides.
 In: *Biochem Soc Trans* 31 (2003), Dec, Nr. Pt 6, S. 1243–1247
- [16] GUAN, X M.; KOBILKA, T S.; KOBILKA, B K.: Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nov, Nr. 31, S. 21995–21998
- [17] ALKEN, M; RUTZ, C; KÖCHL, R; DONALIES, U; OUESLATI, M; FURKERT, J; WIETFELD, D; HERMOSILLA, R; SCHOLZ, A; BEYERMANN, M; ROSENTHAL, W; SCHÜLEIN, R: The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. In: *Biochem J* 390 (2005), Sep, Nr. Pt 2, S. 455–464
- [18] FONS, R D.; BOGERT, B A.; HEGDE, R S.: Substrate-specific function of the transloconassociated protein complex during translocation across the ER membrane. In: *J Cell Biol* 160 (2003), Feb, Nr. 4, S. 529–539
- [19] KELKAR, Anshuman: Functional Analysis of Sec61β, a Component of the Sec61 Protein Translocation Channel at the Endoplasmic Reticulum, Universität Heidelberg, Diss., 2005
- [20] RAPOPORT, TA.: Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. In: *FEBS* J 275 (2008), Sep, Nr. 18, S. 4471 – 4478

- [21] KALIES, KU.; RAPOPORT, TA.; HARTMANN, E: The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. In: *J Cell Biol* 141 (1998), May, Nr. 4, S. 887–894
- [22] ESNAULT, Y; FELDHEIM, D; BLONDEL, MO.; SCHEKMAN, R; KÉPÈS, F: SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. In: J Biol Chem 269 (1994), Nov, Nr. 44, S. 27478–27485
- [23] BECKER, T; BHUSHAN, S; JARASCH, A; ARMACHE, JP; FUNES, S; JOSSINET, F; GUMBART, J; MIELKE, T; BERNINGHAUSEN, O; SCHULTEN, K; WESTHOF, E; GILMORE, R; MANDON, EC.; BECKMANN, R: Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. In: Science 326 (2009), Dec, Nr. 5958, S. 1369–1373
- [24] RAPOPORT, TA.: Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. In: *Nature* 450 (2007), Nov, Nr. 7170, S. 663 669
- [25] BALCH, William E.; MORIMOTO, Richard I.; DILLIN, Andrew; KELLY, Jeffery W.: Adapting proteostasis for disease intervention. In: *Science* 319 (2008), Feb, Nr. 5865, S. 916–9
- [26] NICKENIG, G; STREHLOW, K; ROELING, J; ZOLK, O; KNORR, A; BÖHM, M: Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. In: *Hypertension* 31 (1998), Jun, Nr. 6, S. 1272 – 1277
- [27] KURRECK, Jens: Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications.
 In: *Eur J Biochem* 270 (2003), Apr, Nr. 8, S. 1628–44
- [28] ANDERSON, K P.; FOX, M C.; BROWN-DRIVER, V; MARTIN, M J.; AZAD, R F.: Inhibition of human cytomegalovirus immediate-early gene expression by an antisense oligonucleotide complementary to immediate-early RNA. In: Antimicrobial agents and chemotherapy 40 (1996), Sep, Nr. 9, S. 2004–11
- [29] WENG, DE.; USMAN, N: Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. In: *Current oncology reports* 3 (2001), Mar, Nr. 2, S. 141–6
- [30] BEAUDRY, A; DEFOE, J; ZINNEN, S; BURGIN, A; BEIGELMAN, L: In vitro selection of a novel nuclease-resistant RNA phosphodiesterase. In: *Chemistry & biology* 7 (2000), May, Nr. 5, S. 323–34
- [31] FOSTER, Graham R.: Past, present, and future hepatitis C treatments. In: *Seminars in liver disease* 24 (2004), S. 97–104
- [32] TIEMANN, Katrin; ROSSI, John J.: RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. In: *EMBO molecular medicine* 1 (2009), Jun, Nr. 3, S. 142–51

- [33] SULLENGER, Bruce A.; GILBOA, Eli: Emerging clinical applications of RNA. In: *Nature* 418 (2002), Jul, Nr. 6894, S. 252 258
- [34] BATSHAW, ML.; WILSON, JM.; RAPER, S; YUDKOFF, M; ROBINSON, MB.: Recombinant adenovirus gene transfer in adults with partial ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD). In: *Human gene therapy* 10 (1999), Sep, Nr. 14, S. 2419–37
- [35] KUSMAKOW, Oleg V.: Versuche zur intrazellulären Lokalisierung der Sterol-Glucosyltransferase und der Glucosylceramid-Synthase in Pflanzenzellen, Universität Hamburg, Diss., 2005
- [36] FINEGOLD, Leonard: Cholesterol in membrane models. CRC Press, Inc., 1993
- [37] YEAGLE, PL.; ALBERT, AD.; BOESZE-BATTAGLIA, K; YOUNG, J; FRYE, J: Cholesterol dynamics in membranes. In: *Biophys J* 57 (1990), Mar, Nr. 3, S. 413 – 424
- [38] MURATA, M; PERÄNEN, J; SCHREINER, R; WIELAND, F; KURZCHALIA, TV.; SIMONS, K: VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Oct, Nr. 22, S. 10339 – 10343
- [39] LISCUM, L; MUNN, NJ.: Intracellular cholesterol transport. In: *Biochim Biophys Acta* 1438 (1999), Apr, Nr. 1, S. 19–37
- [40] NILSSON, I; OHVO-REKILÄ, H; SLOTTE, J P.; JOHNSON, A E.; HEIJNE, G von: Inhibition of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by sterols. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nov, Nr. 45, S. 41748 – 41754
- [41] ERDMANN, F; JUNG, M; EYRISCH, S; LANG, S; HELMS, V; WAGNER, R; ZIM-MERMANN, R: Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity. In: *FEBS Lett* 583 (2009), Jul, Nr. 14, S. 2359–2364. http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.032. – DOI 10.1016/j.febslet.2009.06.032
- [42] FIEBIGER, E; HIRSCH, C; VYAS, JM.; GORDON, E; PLOEGH, HL.; TORTORELLA,
 D: Dissection of the dislocation pathway for type I membrane proteins with a new small molecule inhibitor, eeyarestatin. In: *Mol Biol Cell* 15 (2004), Apr, Nr. 4, S. 1635–1646. http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0506. – DOI 10.1091/mbc.E03-07-0506
- [43] WANG, Q; LI, L; YE, Y: Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin
 I. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Mar, Nr. 12, S. 7445 7454. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.
 M708347200. DOI 10.1074/jbc.M708347200
- [44] WANG, Q; MORA-JENSEN, H; WENIGER, MA.; PEREZ-GALAN, P; WOLFORD, C; HAI, T; RON, D; CHEN, W; TRENKLE, W; WIESTNER, A; YE, Y: ERAD inhibitors

integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Feb, Nr. 7, S. 2200 – 2205

- [45] CROSS, BC.; MCKIBBIN, C; CALLAN, AC.; ROBOTI, P; PIACENTI, M; RABU, C; WILSON, CM.; WHITEHEAD, R; FLITSCH, SL.; POOL, MR.; HIGH, S; SWANTON, E: Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. In: *J Cell Sci* 122 (2009), Dec, Nr. Pt 23, S. 4393–4400. http://dx.doi.org/10.1242/jcs.054494. DOI 10.1242/jcs.054494
- [46] GARRISON, JL.; KUNKEL, EJ.; HEGDE, RS.; TAUNTON, J: A substrate-specific inhibitor of protein translocation into the endoplasmic reticulum. In: *Nature* 436 (2005), Jul, Nr. 7048, S. 285–289. http://dx.doi.org/10.1038/nature03821. – DOI 10.1038/nature03821
- [47] ANDAVAN, Gowri Shankar B.; LEMMENS-GRUBER, Rosa: Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research. In: *Marine drugs* 8 (2010), Nr. 3, S. 810–34
- [48] KIM, B J.; MIN, S U.; PARK, K Y.; CHOI, J W.; PARK, S W.; YOUN, S W.; PARK, K C.; HUH, C H.: Combination therapy of cyclosporine and methylprednisolone on severe alopecia areata. In: *J Dermatolog Treat* 19 (2008), Nr. 4, S. 216–220
- [49] BRYAN, Margarette; PULTE, ED.; TOOMEY, Kathleen C.; PLINER, Lillian; PAVLICK, Anna C.; SAUNDERS, Tracie; WIEDER, Robert: A pilot phase II trial of all-trans retinoic acid (Vesanoid) and paclitaxel (Taxol) in patients with recurrent or metastatic breast cancer. In: *Invest New Drugs* (2010), Jul
- [50] STAWIKOWSKI, M; CUDIC, P: Depsipeptide synthesis. In: *Methods Mol Biol* 386 (2007),
 S. 321 339
- [51] CRUZ, Luis J.; LUQUE-ORTEGA, Juan R.; RIVAS, Luis; ALBERICIO, Fernando: Kahalalide F, an antitumor depsipeptide in clinical trials, and its analogues as effective antileishmanial agents. In: *Molecular pharmaceutics* 6 (2009 May-Jun), Nr. 3, S. 813–24
- [52] CHEN, Yan; BILBAN, Melitta; FOSTER, Carolyn A.; BOGER, Dale L.: Solution-phase parallel synthesis of a pharmacophore library of HUN-7293 analogues: a general chemical mutagenesis approach to defining structure-function properties of naturally occurring cyclic (depsi)peptides. In: *J Am Chem Soc* 124 (2002), May, Nr. 19, S. 5431–40
- [53] BESEMER, Jürgen; HARANT, Hanna; WANG, Shirley; OBERHAUSER, Berndt; MAR-QUARDT, Katharina; FOSTER, Carolyn A.; SCHREINER, Erwin P.; VRIES, Jan E.; DASCHER-NADEL, Christiane; LINDLEY, Ivan J D.: Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. In: *Nature* 436 (2005), Jul, Nr. 7048, S. 290–3

- [54] HARANT, H; LETTNER, N; HOFER, L; OBERHAUSER, B; VRIES, JE.; LINDLEY, I J.: The translocation inhibitor CAM741 interferes with vascular cell adhesion molecule 1 signal peptide insertion at the translocon. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Oct, Nr. 41, S. 30492–30502. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607243200. DOI 10.1074/jbc.M607243200
- [55] LUESCH, H; YOSHIDA, W Y.; MOORE, R E.; PAUL, V J.; CORBETT, T H.: Total structure determination of apratoxin A, a potent novel cytotoxin from the marine cyanobacterium Lyngbya majuscula. In: *J Am Chem Soc* 123 (2001), Jun, Nr. 23, S. 5418–5423
- [56] LUESCH, H; CHANDA, SK.; RAYA, RM.; DEJESUS, PD.; ORTH, AP.; WALKER, JR.; IZPISÚA BELMONTE, JC.; SCHULTZ, PG.: A functional genomics approach to the mode of action of apratoxin A. In: *Nat Chem Biol* 2 (2006), Mar, Nr. 3, S. 158–167
- [57] LIU, Y; LAW, B K.; LUESCH, H: Apratoxin a reversibly inhibits the secretory pathway by preventing cotranslational translocation. In: *Mol Pharmacol* 76 (2009), Jul, Nr. 1, S. 91–104
- [58] WINISKI, A P.; FOSTER, C A.: ICAM-1 expression in a spontaneously transformed human keratinocyte cell line: characterization by a simple cell-ELISA assay. In: *J Invest Dermatol* 99 (1992), Jul, Nr. 1, S. 48 – 52
- [59] FOSTER, CA.; DREYFUSS, M; MANDAK, B; MEINGASSNER, JG.; NAEGELI, HU.; NUSSBAUMER, A; OBERER, L; SCHEEL, G; SWOBODA, EM.: Pharmacological modulation of endothelial cell-associated adhesion molecule expression: implications for future treatment of dermatological diseases. In: J Dermatol 21 (1994), Nov, Nr. 11, S. 847–54
- [60] BOGER, D.L.; KEIM, H.; OBERHAUSER, B.; E.P., Schreiner; FOSTER, C.A.: Total Synthesis of HUN-7293. In: *C.A.J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999), S. 6197–6205
- [61] COIN, I; BEERBAUM, M; SCHMIEDER, P; BIENERT, M; BEYERMANN, M: Solidphase synthesis of a cyclodepsipeptide: cotransin. In: Org Lett 10 (2008), Sep, Nr. 17, S. 3857–3860
- [62] CAVIĆ, Milena; LLUÍS, Carme; MORENO, Estefanía; BAKEŠÁ, Jana; CANELA, Enric I.; NAVARRO, Gemma: Production of functional recombinant G-protein coupled receptors for heteromerization studies. In: *Journal of neuroscience methods* 199 (2011), Aug, Nr. 2, S. 258–64
- [63] BOCKAERT, J; PIN, J P.: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. In: *EMBO J* 18 (1999), Apr, Nr. 7, S. 1723–1729
- [64] ROSENBAUM, D.M.; RASMUSSEN, S.G.; KOBILKA, B.K.: The structure and function of G-protein-coupled receptors. In: *Nature* 459 (2009), May, Nr. 7245, S. 356 – 363

- [65] WU, W; SUTTIE, J W.: N-glycosylation contributes to the intracellular stability of prothrombin precursors in the endoplasmic reticulum. In: *Thromb Res* 96 (1999), Oct, Nr. 2, S. 91–98
- [66] MURAKAMI, M; KOUYAMA, T: Crystal structure of squid rhodopsin. In: *Nature* 453 (2008), May, Nr. 7193, S. 363–367
- [67] WARNE, T; SERRANO-VEGA, M J.; BAKER, J G.; MOUKHAMETZIANOV, R; EDWARDS, P C.; HENDERSON, R; LESLIE, A G.; TATE, C G.; SCHERTLER, G F.: Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. In: *Nature* 454 (2008), Jul, Nr. 7203, S. 486 – 491
- [68] RASMUSSEN, SG.; CHOI, HJ.; ROSENBAUM, DM.; KOBILKA, TS.; THIAN, FS.; EDWARDS, PC.; BURGHAMMER, M; RATNALA, VR.; SANISHVILI, R; FISCHETTI, R F.; SCHERTLER, G F.; WEIS, WI.; KOBILKA, BK.: Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. In: *Nature* 450 (2007), Nov, Nr. 7168, S. 383 – 387
- [69] JAAKOLA, V P.; GRIFFITH, M T.; HANSON, M A.; CHEREZOV, V; CHIEN, E Y.; LANE, J R.; IJZERMAN, A P.; STEVENS, R C.: The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. In: Science 322 (2008), Nov, Nr. 5905, S. 1211–1217
- [70] PARK, J H.; SCHEERER, P; HOFMANN, K P.; CHOE, H W.; ERNST, O P.: Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. In: *Nature* 454 (2008), Jul, Nr. 7201, S. 183 – 187
- [71] SCHEERER, P; PARK, JH.; HILDEBRAND, PW.; KIM, YJ.; KRAUSS, N; CHOE, HW.; HOFMANN, KP.; ERNST, OP.: Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. In: *Nature* 455 (2008), Sep, Nr. 7212, S. 497 502
- [72] WU, B; CHIEN, EY.; MOL, CD.; FENALTI, G; LIU, W; KATRITCH, V; ABAGYAN,
 R; BROOUN, A; WELLS, P; BI, FC.; HAMEL, DJ.; KUHN, P; HANDEL, TM.;
 CHEREZOV, V; STEVENS, RC.: Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. In: Science 330 (2010), Nov, Nr. 6007, S. 1066 1071
- [73] HAMM, HE.: The many faces of G protein signaling. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Jan, Nr. 2, S. 669–672
- [74] NEER, EJ.; CLAPHAM, DE.: Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. In: Nature 333 (1988), May, Nr. 6169, S. 129 – 134

- [75] MORRIS, A J.; MALBON, C C.: Physiological regulation of G protein-linked signaling. In: *Physiol Rev* 79 (1999), Oct, Nr. 4, S. 1373–1430
- [76] HEPLER, J R.; GILMAN, A G.: G proteins. In: *Trends Biochem Sci* 17 (1992), Oct, Nr. 10,
 S. 383–387
- [77] THOMAS D. POLLARD, Jennifer Lippincott-Schwartz William C. E. William C. Earnshaw: *Cell Biology*. Saunders USA, 2002
- [78] BOKOCH, G M.: The presence of free G protein beta/gamma subunits in human neutrophils results in suppression of adenylate cyclase activity. In: *J Biol Chem* 262 (1987), Jan, Nr. 2, S. 589–594
- [79] BLAYNEY, LM.; GAPPER, PW.; NEWBY, AC.: Phospholipase C isoforms in vascular smooth muscle and their regulation by G-proteins. In: *Br J Pharmacol* 118 (1996), Jun, Nr. 4, S. 1003 1011
- [80] FERGUSON, S S.: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. In: *Pharmacol Rev* 53 (2001), Mar, Nr. 1, S. 1–24
- [81] WATLING, K.: Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and Signal Transduction, 5th Edition. Aldrich Pub, 2006
- [82] SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), Dec, Nr. 12, 5463-5467. http://www. hubmed.org/display.cgi?uids=271968
- [83] AIGNER, Achim; BANGSOW, Thorsten; CZUBAYKO, Frank; DECHERT, Ute: Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.
 4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, 2006 http://amazon.de/o/ASIN/3827415373/. ISBN 9783827415370
- [84] Invitrogen: alamarBlue® Cell Viability Reagent. 2008
- [85] PATTER, Dr. R.: *Protocol for subcellular fractionation*. http://www.abcam.com/ps/pdf/ protocols/subcellular_fractionation.pdf
- [86] http://www.wissenschaft-online.de/abo/lexikon/physik/141
- [87] SCHMIDT, Antje: Untersuchung des Recyclings des Corticotropin-Releasing Factor-Rezeptors Typ 1 mit Hilfe von Kaede-Fusionsproteinen, Universität Potsdam, Diss., 2009
- [88] Thermo Scientific: Datasheet SILAC. 2009

- [89] LANGE, Sabine: Proteomische Methoden zur Charakterisierung von phosphorylierungsvermittelten Wechselwirkungen des Adapterproteins ADAP, Technische Universität Berlin, Diss., 2010
- [90] BioRad: Datasheet Bioplex-Assay. 2011
- [91] BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H; HEIJNE, G von; BRUNAK, S: Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. In: *J Mol Biol* 340 (2004), Jul, Nr. 4, S. 783–795
- [92] JAIN, E; BAIROCH, A; DUVAUD, S; PHAN, I; REDASCHI, N; SUZEK, BE.; MARTIN, M J.; MCGARVEY, P; GASTEIGER, E: Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. In: *BMC Bioinformatics* 10 (2009), S. 136–136
- [93] RUTZ, C; RENNER, A; ALKEN, M; SCHULZ, K; BEYERMANN, M; WIESNER, B; ROSENTHAL, W; SCHÜLEIN, R: The corticotropin-releasing factor receptor type 2a contains an N-terminal pseudo signal peptide. In: J Biol Chem 281 (2006), Aug, Nr. 34, S. 24910 – 24921
- [94] MÜHLENFELD, Katrin I.: Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzellinie Hep G2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistarratte, Humboldt-Universität, Diss., 1999
- [95] GRANTCHAROVA, E; FURKERT, J; REUSCH, H P.; KRELL, H W.; PAPSDORF, G; BEYERMANN, M; SCHÜLEIN, R; ROSENTHAL, W; OKSCHE, A: The extracellular N terminus of the endothelin B (ETB) receptor is cleaved by a metalloprotease in an agonist-dependent process. In: J Biol Chem 277 (2002), Nov, Nr. 46, S. 43933–43941
- [96] ALKEN, M; SCHMIDT, A; RUTZ, C; FURKERT, J; KLEINAU, G; ROSENTHAL, W; SCHÜLEIN, R: The sequence after the signal peptide of the G protein-coupled endothelin B receptor is required for efficient translocon gating at the endoplasmic reticulum membrane. In: *Mol Pharmacol* 75 (2009), Apr, Nr. 4, S. 801–811
- [97] SCHMIDT, Antje; WIESNER, Burkhard; WEISSHART, Klaus; SCHULZ, Katharina; FURKERT, Jens; LAMPRECHT, Björn; ROSENTHAL, Walter; SCHÜLEIN, Ralf: Use of Kaede fusions to visualize recycling of G protein-coupled receptors. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (2009), Jan, Nr. 1, S. 2 – 15
- [98] ANDO, Ryoko; HAMA, Hiroshi; YAMAMOTO-HINO, Miki; MIZUNO, Hideaki; MIYA-WAKI, Atsushi: An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002), Oct, Nr. 20, S. 12651–6
- [99] LOPPNOW, H: [Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]. In: Internist (Berl) 42 (2001), Jan, Nr. 1, S. 13–14

- [100] KLEBE, Gerhard: Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, 2009. – ISBN 9783827420466
- [101] OHZONO, C; ETOH, S; MATSUMOTO, M; NAKAYAMA, K I.; HIROTA, Y; TANAKA, Y; FUJITA, H: Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43. In: *Biol Pharm Bull* 33 (2010), Nr. 6, 951-957. http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=20522958
- [102] HOWDEN, Sara: Patient's Own Cells May Hold Therapeutic Promise After Reprogramming, Gene Correction. http://www.innovations-report.de/specials/printa.php?id=173211
- [103] FINKE, Kerstin: Untersuchung paraloger SEC61-Gene und -Proteine in Eukaryoten, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, Diss., 1999
- [104] LAIRD, V; HIGH, S: Discrete cross-linking products identified during membrane protein biosynthesis. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Jan, Nr. 3, S. 1983–1989
- [105] BAUER, Kurt H.; FRÖMMING, Karl-Heinz; FÜHRER, Claus: Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie: Mit einer Einführung in die Biopharmazie. 8., durchgesehene und aktualisierte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsges., 2006. – ISBN 9783804722224
- [106] GRUBER, Friedrich: Untersuchungen zur Enkapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen, Ludwig-Maximilians-Universität München, Diss., 2004
- [107] HÄNSEL, Rudolf (Hrsg.); STICHER, Otto (Hrsg.): *Pharmakognosie Phytopharmazie* (*Springer-Lehrbuch*). 9., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, Berlin, 2009
- [108] TRÉHIN, Rachel; MERKLE, Hans P.: Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery. In: *Eur J Pharm Biopharm* 58 (2004), Sep, Nr. 2, S. 209–23
- [109] BERG, Bert Van d.; CLEMONS, William M (.; COLLINSON, Ian; MODIS, Yorgo; HARTMANN, Enno; HARRISON, Stephen C.; RAPOPORT, Tom A.: X-ray structure of a protein-conducting channel. In: *Nature* 427 (2004), Jan, Nr. 6969, S. 36–44
- [110] HOMMEL, U; WEBER, H P.; OBERER, L; NAEGELI, H U.; OBERHAUSER, B;
 FOSTER, C A.: The 3D-structure of a natural inhibitor of cell adhesion molecule expression.
 In: FEBS Lett 379 (1996), Jan, Nr. 1, S. 69–73
- [111] HEIJNE, G von: Signal sequences. The limits of variation. In: *J Mol Biol* 184 (1985), Jul, Nr. 1, S. 99–105
- [112] WEISS, Johanna; HERZOG, Melanie; HAEFELI, Walter E.: Differential modulation of the expression of important drug metabolising enzymes and transporters by endothelin-1 receptor

antagonists ambrisentan and bosentan in vitro. In: *European journal of pharmacology* 660 (2011), Apr, S. 298–304

[113] EICHLER, R; LENZ, O; STRECKER, T; EICKMANN, M; KLENK, HD.; GARTEN, W: Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. In: *EMBO Rep* 4 (2003), Nov, Nr. 11, S. 1084–1088

Eigene Publikationen

Publikationen

WESTENDORF, C; SCHMIDT, A; COIN, I; FURKERT, J; RIDELIS, I; ZAMPATIS, D; RUTZ, C; WIESNER, B; ROSENTHAL, W; BEYERMANN, M; SCHÜLEIN, R: Inhibition of the biosynthesis of the human endothelin b receptor by the cyclodepsipeptide cotransin. In: *The Journal of biological chemistry* (2011), Jul

SCHÜLEIN, R; WESTENDORF, C; KRAUSE, G.; ROSENTHAL, W: Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. In: *European journal of cell biology* (2011), May

SCHULZ, K; RUTZ, C; WESTENDORF, C; RIDELIS, I; VOGELBEIN, S; FUR-KERT, J; SCHMIDT, A; WIESNER, B; SCHÜLEIN, R: The pseudo signal peptide of the corticotropin-releasing factor receptor type 2a decreases receptor expression and prevents Gimediated inhibition of adenylyl cyclase activity. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), Oct, Nr. 43, S. 32878–32887

Posterbeiträge

WESTENDORF, C; SCHMIDT, A; WIESNER, B; BEYERMANN, M; ROSEN-THAL, W; SCHÜLEIN, R: Inhibition of the biosynthesis of the human endothelin b receptor by the cyclodepsipeptide cotransin. *Molecular Pharmacology of G Protein coupled receptors*, Melbourne (Aus), 02. – 04. Dezember 2010

SCHMIDT, A; WESTENDORF, C; BEYERMANN, M; ROSENTHAL, W; SCHÜ-LEIN, R: Use of Kaede fusions to visualize trafficking and biosynthesis of G protein coupled receptors. *Molecular Pharmacology of G Protein coupled receptors, International Symposium Membranes and Modules*, Berlin (D), 10. – 13. Dezember 2009

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Rosenthal für die Bereitstellung des Themas. Auch bei Herrn PD Dr. Ralf Schülein möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung während der gesamten Zeit im Labor und während des Schreibens bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. Michael Krauß möchte ich mich herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Das nächste große Dankeschön richtet sich an Frau Dr. Antje Schmidt für die Unterstützung meiner Arbeit und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Für die Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten bedanke ich mich herzlich bei Jens Furkert, Burkhard Wiesner, Jenny Eichhorst, Erhard Klauschenz und Heike Nikolenko. Bei Bettina Kahlich und Gisela Papsdorf möchte ich mich für die Arbeit in der Zellkultur bedanken.

Für die Hilfe bei chemischen Fragen bedanke ich mich bei Dr. Michael Beyermann und Angelika Ehrlich. Für die Hilfe bei den massenspektrometrischen Analysen und Auswertungen bei der AG E. Krause, insbsondere bei Diana Lang.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Schülein und AG Klussmann für die Flurgespräche, Hilfen und Anregungen bedanken. Insbesondere Wilfred Poppinga, Philipp Skroblin, Anke Teichmann, Ann-Karin Haas, Ingrid Ridelis, Katharina Schulz, Inna Hoyer und Claudia Rutz. Und bei Björn Lamprecht (MDC) und Annika Kreuchwig.

Für hilfreiche Anmerkungen, das Korrekturlesen und Hilfe bei LAT_EX möchte ich mich bei Nadin Jahnke, Jan Wolkenhauer und Florian Lindner bedanken!

Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 21.09.2011

Carolin Westendorf