

Tobias Schäfer

Dr. med.

Unkonventionelle Sekretion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (FGF-2)

Geboren am 04.10.1977 in Ankum

Reifeprüfung am 05.06.1997 in Erkrath

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1998 bis WS 2004/2005

Physikum am 28.08.2000 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Bern (Schweiz), Durham (USA) und Heidelberg

Staatsexamen am 11.05.2005

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W. Nickel

Der angiogene Wachstumsfaktor FGF-2 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2) wird aus Säugetierzellen über einen nicht-klassischen Sekretionsweg exportiert, der unabhängig von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat abläuft. Die molekulare Maschinerie, die in die Freisetzung von FGF-2 involviert ist, ist gegenwärtig unbekannt. FGF-2 spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung neuer Blutgefäße, der so genannten Angiogenese, die für pathologische Prozesse wie Tumorwachstum und Metastasierung entscheidend ist. Substanzen, welche die molekulare Maschinerie der FGF-2-Freisetzung beeinflussen können, sind daher potente antiangiogene und somit tumorhemmende Substanzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues experimentelles System entwickelt, das die biochemische Analyse des Exports von FGF-2 ermöglicht. Hierzu wurde die Sekretion von rekombinantem FGF-2 an isolierten Plasmamembranvesikeln *in vitro* rekonstituiert. Diese Plasmamembranvesikel wurden aus einer Zelllinie von chinesischen Hamster-Ovarien (CHO) hergestellt, die stabil ein auf das CD8-Molekül basierendes Fusionsprotein exprimierten. Unter Verwendung einer immunomagnetischen Technik, die Antikörper gegen ein zytoplasmatisches Epitop des Fusionsprotein einsetzte, konnten solche Vesikel isoliert werden, die eine der normalen Zelle entgegengesetzte Membrantopologie aufwiesen. Die

post-translationale Membrantranslokation von FGF-2 in das Lumen dieser Vesikel entsprach damit der Sekretion von FGF-2, da das Vesikellumen topologisch dem Extrazellulärraum entspricht. Der Nachweis der erfolgreichen Translokation geschah mittels Proteaseschutzexperimenten.

Die beobachtete Translokation von FGF-2 kommt bei 4°C zum Erliegen; sie ist jedoch unabhängig von der Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP). Auch die Entfernung der peripheren Membranproteine mittels Hochsalzbehandlung verhindert den Transport, ohne die Bindung von FGF-2 an die cytoplasmatische Oberfläche der Vesikel zu unterbinden. Die Zugabe von Cytosol stellt den Translokationsprozess wieder her, was auf die Beteiligung von integralen und cytoplasmatischen Proteinen am Exportprozess hinweist. Das Fehlen des Transportes in „rightside-out“-Vesikel zeigte die Direktionalität der Membranquerung. Interessanterweise werden andere unkonventionell sezernierte Proteine unterschiedlich von den Vesikeln importiert: Während FGF-2 und Galektin-1 in die Vesikel aufgenommen werden, können MIF und FGF-1 nicht importiert werden. Diese Beobachtungen stützen die These der unterschiedlichen Sekretionswege. Auch andere Proteine wie GFP oder das konventionell sezernierte FGF-4 translozieren nicht in die Vesikel, ebenso eine konstitutive Dimerform von FGF-2. Proteinfreie Liposomen dagegen können FGF-2 nicht importieren.

Die Rekonstitution von FGF-2 *in vitro* ermöglichte nicht nur die Etablierung eines neuen experimentellen Systems, das auch zur Untersuchung von potentiellen Inhibitoren des Sekretionsweges eingesetzt wird, sondern brachte den ersten unmittelbaren Nachweis, dass FGF-2 und Galektin-1 aus Säugetierzellen durch direkte Translokation über die Plasmamembran exportiert werden können.