

Matthias Wuttke
Dr. med.

Unkonventionelle Sekretion: Etablierung eines Photocrosslinkingsystems zur Charakterisierung der molekularen Umgebung von FGF2

Geboren am 17.01.1980 in Lahr/Baden
Staatsexamen im Sommer 2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Walter Nickel

Zelluläre Transportprozesse spielen eine entscheidende Rolle für das Überleben von Zellen und Organismen. Der größte Teil aller sekretorischen Proteine wird aufgrund einer charakteristischen Signalsequenz am N-Terminus der Peptidsequenz erkannt und auf konventionellem Wege sezerniert. Jedoch existiert eine Gruppe von Proteinen, die -- trotz Abwesenheit einer Signalsequenz -- nicht im Zytoplasma verbleiben, sondern auf nicht-klassische Weise exportiert werden.

Ein Mitglied dieser Gruppe ist der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2). Dieser Mediator hat große Bedeutung bei der tumorinduzierten Angiogenese in Primärtumoren und Metastasen.

In *in vitro*-Experimenten mit Plasmamembran-Vesikeln aus CHO-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Translokation unidirektional erfolgt sowie temperatur-, aber nicht direkt energieabhängig ist. Molekulare Details hinsichtlich der Zusammensetzung der Transportmaschinerie sind allerdings weiterhin unbekannt.

Daher wurde als erstes Ziel dieser Arbeit diese Maschinerie mit Hilfe der erwähnten *in vitro*-Experimente weitergehend funktionell charakterisiert. Während eine Membrantranslokation für die unkonventionell sezernierten Proteine FGF1 und FGF2 beobachtet werden konnte, zeigte sich diese interessanterweise trotz großer struktureller Ähnlichkeiten beim konventionell sezernierten FGF4 nicht. Bei Trypsin-Vorbehandlung der für die Experimente eingesetzten Vesikel konnte auch für FGF1 und FGF2 keine Translokation mehr beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass zur Translokation Komponenten in und/oder an der Membran erforderlich sind, und es sich weiterhin hierbei um Proteine handelt.

Das Hauptziel dieser Arbeit war folglich die Identifizierung von FGF2-Interaktionspartnern, die potentiell am FGF2-Transport, insbesondere der Membrantranslokation, beteiligt sind. Anhand verschiedener Kriterien wurden 30 Aminosäuren mit Anteil an der Oberfläche von FGF2 ausgewählt. Anstelle der Codons für die ursprünglichen Aminosäuren wurde in die FGF2-DNA jeweils ein unbenutztes Stop-Codon eingefügt. Bei bakterieller Expression unter Zuhilfenahme einer ebenfalls mutierten tRNA sowie tRNA-Synthetase konnten mit sehr hoher Ergiebigkeit Proteine mit dem an der gewünschte Stelle integrierten photoreaktiven Kreuz-Vernetzer p-Benzoylphenylalanin gewonnen werden.

Die so erhaltenen photoreaktiven FGF2-Mutanten wurden für verschiedene Crosslinking-Experimente mit Vesikeln aus CHO-Zellen sowie Lysat von CHO-, HeLa- und U87-Zellen eingesetzt, bei denen interessante Crosslinking-Produkte entdeckt, jedoch nicht aufgereinigt und isoliert werden konnten. In reproduzierbarer Weise zeigte sich für bestimmte FGF2-Mutanten eine vermehrte Bildung von FGF2-Dimeren.

Für die Suche nach Komponenten der FGF2-Translokationsmaschinerie wurde ein gleichermaßen hochempfindliches und -spezifisches Verfahren etabliert, das die effiziente Suche nach Interaktionspartnern von FGF2 erlaubt.