

SUMOylierung – ein neuer Regulationsmechanismus des Transportes von CFTR zur Membran

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Christine Schulze

Dissertation eingereicht am: 28.05.2009

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. E. H. Weiß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schleicher

Rigorosum: 29.10.2009

Danksagung

An erster Stelle danke ich Dr. Judith Glöckner-Pagel für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu arbeiten.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß danke ich für Ihre Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät für Biologie zu vertreten. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle für die wertvollen Anregungen und die konstruktive Kritik bedanken.

Herrn Prof. Dr. Adelbert A. Roscher danke ich für die Möglichkeit, im Forschungszentrum Kubus zu arbeiten. Sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft waren für diese Arbeit von großer Bedeutung.

Ein großer Dank gilt Marta Illenyi und Jan Tausendfreund für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor. Ihr unermüdlicher Einsatz, ihre Zuverlässigkeit, ihre große Hilfsbereitschaft und Freundschaft waren für mich stets eine große Unterstützung.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meiner Familie, die mit mir zusammen Höhen und Tiefen überwunden und mich immer bedingungslos unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	CFTR-Struktur	3
2.2	ABC-Transporter	5
2.3	Proteinabbau und Qualitätskontrolle im ER	6
2.4	Das sekretorische System	8
2.4.1	Sortierungssignale vermitteln die Interaktion von Transportvesikeln und CFTR	14
2.5	CFTR-Reifung, Funktion und Fehlfunktion	14
2.6	Mukoviszidose – Molekulare Ursachen und Folgen einer unheilbaren Erbkrankheit	18
2.7	Das Ubiquitin-Proteasom-System	20
2.8	Sumoylierung, eine spezielle Form der posttranslationalen Modifikation	22
2.8.1	Molekulare Grundlagen	23
2.8.2	Die Sumoylierung von Plasmamembranproteinen	27
3.	Aufgabenstellung	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	CFTR besitzt zwei hoch konservierte SUMO-Motive	30
4.2	Konzeption und Klonierung verschiedener SUMO-Motiv tragende CFTR-Domänenkonstrukte	31
4.3	Ubc9 interagiert mit SUMO-Motiv tragenden CFTR-Domänen	33
4.3.1	Identifikation der Interaktion von SUMO-Motiv tragenden CFTR-Domänen und Ubc9 im Y2H	33
4.3.2	Analyse der Interaktion von komplettem CFTR und Ubc9 in CHO-Zellen	34
4.3.3	Analyse der Interaktion von Δ F508 mit Ubc9 in CHO-Zellen	36
4.4	Sumoylierung von CFTR <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	38
4.4.1	Analyse der Interaktion von verschiedenen CFTR- und Δ F508-	

Domänen mit SUMO 1-4 im Y2H	38
4.4.2 Analyse der Interaktion von CFTR mit SUMO 1-4 in CHO-Zellen	39
4.4.3 Analyse der Interaktion von CFTR mit den SUMO-Proteinen in T84-Zellen, die endogenes CFTR und alle vier SUMO-Isoformen exprimieren	41
4.4.4 Analyse der Interaktion von Δ F508 mit den SUMO-Proteinen in CFPAC1-Zellen, die endogenes Δ F508 exprimieren	42
4.4.5 Analyse der Interaktion verschiedener CFTR- und Δ F508-CFTR-Domänen mit den SUMO-Proteinen 1-4	43
4.5 Aufglykosylierung und Transport zur Plasmamembran sind abhängig von der Intaktheit der SUMO-Motive im CFTR	46
4.5.1 Der Transport an die Plasmamembran erfordert intakte SUMO-Motive	46
4.5.2 Biotinylierung der Zellmembranoberfläche ermöglicht den Nachweis von CFTR, nicht jedoch von im SUMO-Motiv mutiertem CFTR	48
4.5.3 Fluoreszenzmikroskopie belegt die unterschiedliche Lokalisation von CFTR und im SUMO-Motiv mutiertem CFTR	49
4.5.4 Überexpression von SENP1 führt zum Nachweis unreifem CFTR	50
4.5.5 In beiden SUMO-Motiven mutiertes CFTR lokalisiert im Trans-Golgi-Netzwerk	52
4.6. Einfluss eines mutierten Di-Leucin-Motives auf die Assoziation von CFTR mit AP-1 und AP-2	54
5. Diskussion	57
5.1 Interaktion von CFTR mit dem E2 (Ubc9)-konjugierenden Enzymkomplex	58
5.2 Direkte Interaktion von CFTR mit verschiedenen SUMO-Proteinen	59
5.3 SUMO-Bindung an CFTR ist Teil des Glykosylierungsprozesses von CFTR	61
5.4 Intakte CFTR-SUMO-Motive sind für den Transport CFTR zur Plasmamembran notwendig	62
5.5 Reifes CFTR kann in Gegenwart überexprimierter SENP1 nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden	63
5.6 Inaktivierung der CFTR-SUMO-Motive führt zur Arretierung von CFTR im Trans-Golgi-Netzwerk	64
5.7 Hinweise auf einen kombinierten Einfluss von Di-Leucin- und SUMO-Motiv auf eine Assoziation von CFTR mit AP-1 und AP-2	65
5.8 Entwurf und Diskussion eines Modells zur Funktion der Sumoylierung von CFTR	67

6.	Schlussfolgerung und Ausblick	72
7.	Material und Methoden	75
7.1	Material	75
7.1.1	Chemikalien	75
7.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	75
7.1.3	Enzyme	76
7.1.4	Antikörper	77
7.1.5	Plasmide	79
7.1.6	Escherichia Coli-Stämme	79
7.1.7	Kulturmedien für Bakterien- und Gewebekulturen	80
7.2	Molekularbiologische Methoden	81
7.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	81
7.2.2	Kits	82
7.2.3	Klonierung	83
7.2.3.1	Yeast Two-Hybrid-Konstrukten von CFTR, Ubc9 und SUMO 1-4	83
7.2.3.2	<i>Yeast-Two-Hybrid</i> -CFTR-Konstrukte	84
7.2.3.3	<i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Ubc9-Konstrukte	85
7.2.3.4	<i>Yeast-Two-Hybrid</i> -SUMO-Konstrukte	86
7.2.3.5	Eukaryotische Expressionskonstrukte	86
7.2.3.6	pcDNA/HISc-, pFLAG- und pGFP-N1-Konstrukte von SUMO 4, Ubc9, SENP1 und CFTR	87
7.2.4	Ortsspezifische Mutagenese	88
7.3	Der <i>Yeast Two-Hybrid</i> -(Y2H)Assay	90
7.4	Zellkulturmethoden	92
7.4.1	Kultivierung von adhärennten Zellen	92
7.4.2	Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen	93
7.4.3	Präparation von Gesamt-Zellysaten	94
7.4.4	Co-Immunpräzipitation von Proteinen	95
7.5	Biochemische Methoden	95
7.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gele	95
7.5.2	Western Blot-Methode	96
7.5.3	Fluoreszenzmikroskopie	98
7.5.4	Zelloberflächenbiotinylierung	98
7.5.5	Gradientenzentrifugation	98
8.	Literaturverzeichnis	100
9.	Abkürzungen	113

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, ob humanes CFTR-Protein (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) sumoyliert wird und welche funktionelle Bedeutung die Sumoylierung des CFTRs hat. In der kaukasischen Bevölkerung gilt die Cystische Fibrose (CF) oder Mukoviszidose als eine der häufigsten Erbkrankheiten. Mutationen im CFTR-Gen, die zu einer drastischen Beeinträchtigung der Funktion des CFTR-Proteins führen, bilden die molekulare Basis der Entstehung der CF. So sind häufig die Reifung und der Transport von CFTR an die Plasmamembran betroffen. Diese Prozesse und verschiedene Aktivitätszustände im CFTR werden u.a. durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) spezifischer Konsensus-Motive reguliert.

In diesem Zusammenhang führte eine genaue Betrachtung der Primärsequenz von CFTR zur Identifikation von zwei hoch konservierten Motiven, die dem publizierten SUMO-Konsensus-Motiv (ψ KxE, nachfolgend SUMO-Motiv genannt) an Position 447 und 1486, bezogen auf das zentrale Lysin, an welchem die Sumoylierung stattfindet, entsprachen. Die Sumoylierung, als eine Form der posttranslationale Modifikationen, wird durch kleine Ubiquitin-ähnliche Proteine (small ubiquitin-like modifier, SUMO) vermittelt. Diese stellen eine Klasse von regulatorischen Proteinen dar, die die Aktivität des Zielproteins, dessen Lokalisation oder die Interaktion mit anderen Proteinen steuern. Damit ergab sich ein relevanter Anknüpfungspunkt, die Rolle der bislang für die CFTR-Regulation noch nicht beschriebenen Form der posttranslationalen Kontrolle durch Sumoylierung zu untersuchen.

Als Resultat der hier beschriebenen Untersuchungen konnte die Sumoylierung als notwendiger Bestandteil der Regulation des intrazellulären Transportes von CFTR identifiziert werden. Konkret wurde mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-Verfahren gezeigt, dass CFTR-Domänen an den identifizierten SUMO-Motiven in der *Nukleotid-bindedomäne 1* (NBD-1) und am C-Terminus von CFTR sumoyliert werden.

Im Säugerzellsystem wurde die spezifische Sumoylierung kompletten CFTRs durch transiente Transfektion von CFTR- und SUMO-Expressionskonstrukten sowie in Zellen, welche CFTR und SUMO endogen exprimieren, verifiziert.

Verhindert man weiterhin auf transiente Weise in Säugerzellen die Sumoylierung, durch Mutation der beiden SUMO-Motive oder durch Überexpression der SUMO-

spezifischen Protease (SENP1), erreicht CFTR nicht die apikale Plasmamembran. Im Gegensatz zu $\Delta F508$, welches im ER verbleibt, wird CFTR, welches Mutationen in den SUMO-Motiven trägt, im Golgi-Apparat zurückgehalten. Diese Beobachtung konnte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und anschließendem Nachweis der Proteine in den entsprechenden Fraktionen über die Western-Blot-Methode gezeigt werden. Abschließend wurden am Beispiel eines zum SUMO-Motiv benachbart gelegenen Di-Leucin-Motives erste experimentelle Hinweise erhalten, wonach beide CFTR-Motive in der Interaktion mit dem für den vesikulären Transport funktionell wichtigem Adaptor-Protein (AP) Komplex zusammenwirken. Mit den vorliegenden Resultaten konnte erstmals die Hypothese formuliert werden, dass die hier beschriebene Sumoylierung eine Form der Modifikation ist, welche am Transport von CFTR an die Plasmamembran maßgeblich beteiligt ist.

2. Einleitung

Mutationen im CFTR-(*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)Gen verursachen die in der kaukasischen Bevölkerung häufige Erbkrankheit der Mukoviszidose bzw. Cystischen Fibrose (CF). Die Untersuchung der molekularen Konsequenzen vieler dieser Mutationen führte zu einem besseren Verständnis der Synthese, Reifung, des Transportes und der Kontrolle der Aktivität des CFTR-Proteins. Die Regulation der einzelnen Schritte beim intrazellulären Transport von CFTR zur Plasmamembran ist noch unverstanden. In den letzten Jahren ist für einige Membranrezeptoren und Membrankanäle ein neuer möglicher Regulationsmechanismus der posttranslationalen Modifikation, die Sumoylierung, beschrieben worden. In dieser Arbeit sind entsprechend spezifische und konservierte Aminosäurebereiche (SUMO-Konsensus-Motive, im folgenden als SUMO-Motive beschrieben) im CFTR mittels computergestützter Sequenzanalyse identifiziert und erstmals funktional charakterisiert worden. Dabei lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Verifikation der gefundenen SUMO-Motive sowie der Analyse der Bedeutung dieser SUMO-Motive und der Sumoylierung für die Reifung und den Transport von CFTR zur Plasmamembran.

2.1 CFTR-Struktur

Hochauflösende Strukturen des eukaryotischen ABC-Transporters liegen nicht vor, da nicht ausreichend homogenes und monodisperses Ausgangsmaterial für kristallographische Zwecke gewonnen werden konnte. Das CFTR-Protein ist darüber hinaus nur in geringen Mengen natürlich verfügbar und wird in heterologen Systemen nur schwach exprimiert. Daher sind bislang nur gering auflösende 3D-Informationen verfügbar, die mittels Elektronenmikroskopie erzielt wurden (Rosenberg et al., 2005). Eine hochauflösende Struktur liegt für die isolierte NBD-1 des CFTR vor (Lewis et al., 2004). Nach diesen Informationen besteht CFTR aus zwei homologen Hälften, von denen jede Hälfte 6 Transmembrandomänen und eine NBD enthält. Eine zytoplasmatisch lokalisierte regulatorische R-Domäne trennt die NBD-1 und die MSD-2. Die etwa 200 Aminosäurereste umfassende R-Domäne ist vergleichsweise unstrukturiert, enthält aber eine konservierte Anordnung von Phosphory-

lierungsstellen, über welche die Aktivität des Kanals gesteuert wird (Hegedus et al., 2006). Insbesondere enthält die R-Domäne mehrere Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A (PKA), die umfassend von PKA phosphoryliert werden müssen, bevor es zur ATP-Aktivierung des CFTR-Kanals kommt (Ostedgaard et al., 2001; Winter et al., 1997). Aktuelle Arbeiten von Serohijos et al. (2008) und He et al. (2008), haben per *molekularer Modellsimulation* eine 3D-Struktur des CFTR-Proteins entworfen und, unterlegt von biochemischen Befunden, die NBD-1 und die zytoplasmatischen *Loops* der MSD als sensible Domänen identifiziert. Eine feingesteuerte Wechselwirkung zwischen diesen Regionen ist danach entscheidend für die Ausbildung einer aktiven Gesamtstruktur.

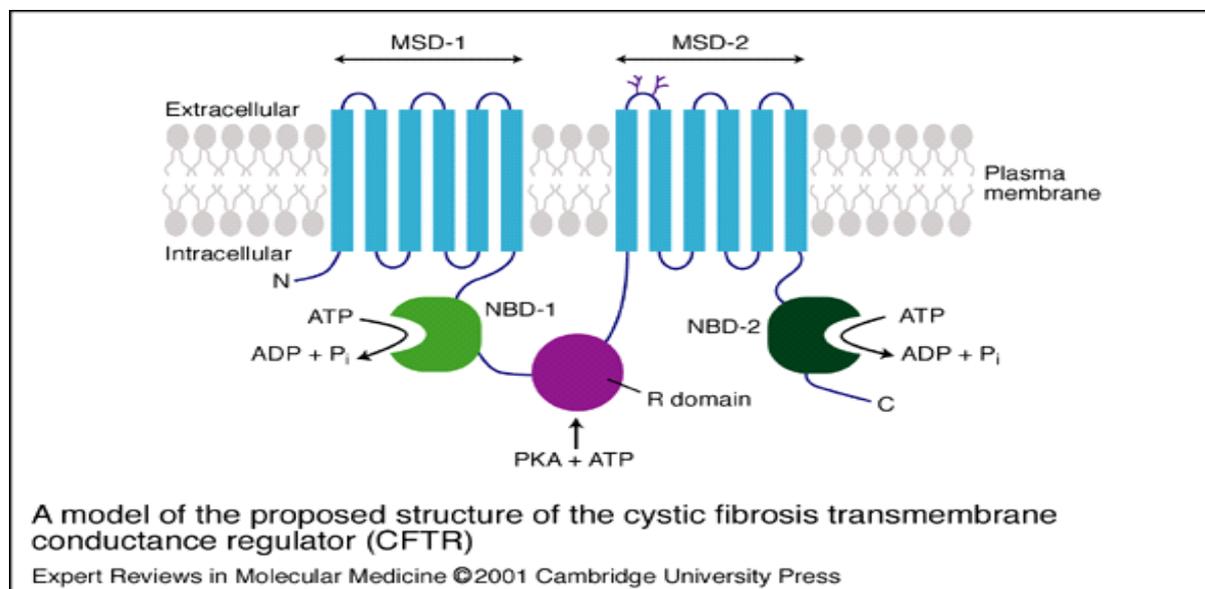


Abbildung 1: Schematische Struktur des humanen CFTR (Davidson and Dorin, 2001)

CFTR bildet je 6 Transmembrandomänen in der MSD-1 und MSD-2 aus. Dargestellt sind außerdem NBD-1 und NBD-2 sowie die für CFTR charakteristische R-Region, die bei den ABC-Transportern fehlt. Die R-Region ist von Bedeutung bei der Steuerung des Chloridtransportes. Spezifische Interaktionen zwischen der NBD-1 und MSD-2 sowie zwischen NBD-2 und MSD-1 sind etabliert. Die Deletion des Phenylalanins an Position 508 ($\Delta F508$) verhindert die Interaktion zwischen NBD-1 und MSD-2, wodurch die MSD nicht ihre normale Struktur annehmen können und die Interaktion von NBD-2 und MSD-1 nicht ausgebildet werden kann (Riordan, 2008).

2.2 ABC-Transporter

Das CFTR-Gen gehört aufgrund seiner Struktur zur Familie der sog. ABC-Transporter (*ATP-binding-cassette-transporter*) und fungiert als Chloridkanal in der Apikalmembran von epithelialen Zellen zahlreicher Gewebe, wie z.B. Lunge, Magen-Darm-Trakt und Schweißdrüsen. ABC-Proteine sind ursprünglich in Bakterien und im Zusammenhang mit Resistenzerscheinungen in Tumorzellen unter Chemotherapie beschrieben worden. Als einziges Mitglied der ABC-Protein-Familie bildet das CFTR-Glykoprotein einen Ionenkanal aus. Die Familie der ABC-Transporter besteht aus einer großen Anzahl funktional diverser Transmembranproteine, die verschiedene Substrate innerhalb der Zelle oder in die Zelle hinein sowie aus der Zelle heraus transportieren. Ein repräsentativer ABC-Transporter enthält 12 Transmembrandomänen und zwei zytoplasmatische Nukleotidbindedomänen (NBD). Die NBD vermitteln die Hydrolyse von ATP zur Energiegewinnung für den Transport der Substrate durch die Membranen (Higgins et al., 1982; Gerlach et al., 1986; Gros et al., 1986; Holland et al., 2003). Einige der Transporter arbeiten gegen einen Konzentrationsgradienten, wogegen andere, wie z.B. der CFTR-Transporter passiv sind. Jeder Transporter zeigt eine auffällige Symmetrie bestehend aus einer *Membran-durchspannenden Domäne* (MSD) und einer NBD in der N-terminalen und der C-terminalen Hälfte des Moleküls. Mittels genomischer Sequenzierung konnten weit über tausend vergleichbare Domänen und 48 komplette ABC-Proteine identifiziert werden, von denen 13 mit genetischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden (Dean, 2005; Stefkova et al., 2004). Die in diesem Zusammenhang am häufigsten beschriebene Erkrankung stellt die CF dar.

In vielen ABC-Transportern sind beide ATP-Bindungsstellen hydrolytisch aktiv. In anderen, zu denen auch CFTR zählt, ist nur eine ATP-Bindungsstelle katalytisch aktiv (Aleksandrov et al., 2002).

Nachfolgend wird ein kurzer Abriss über den Proteinabbau und die Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie das sekretorische System gegeben, um die Besonderheiten des CFTR-Syntheseprozesses sowie Funktion und Fehlfunktion von CFTR besser einordnen zu können. Einen besonderen Schwerpunkt dabei bildet ein Überblick über den Proteinabbau und eine spezielle, der Ubiquitinierung verwandte Form der posttranslationalen Modifikation: die Sumoylierung. Letztere

wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einen regulatorischen Zusammenhang mit der Funktion und Reifung von CFTR gebracht.

2.3 Proteinabbau und Qualitätskontrolle im ER

Im Wesentlichen erfolgt der Prozess der Erkennung fehlerhaft gefalteter Proteine, durch deren Zurückhaltung im ER und die nachfolgende ER-assoziierte Degradation. Bereits nach dem Transport der Proteine in das ER und der sich dann anschließenden Faltung werden Chaperone (wie z.B. Hsc70), die homologen Lektine, Calnexin und Calreticulin und Proteindisulfidisomerasen (PDI), aber auch sog. Peptidyl-Prolyl-Isomerasen aktiv. Diese Enzyme nehmen eine Doppelfunktion wahr, indem sie zum einen die Faltung der Proteine unterstützen und bewirken, dass die Proteine ihre thermodynamisch stabile Konformation annehmen können, zum anderen auch ihre Zurückhaltung im ER vermitteln. Vor allem aber verhindern Chaperone eine Aggregation der Proteine und halten diese in einem löslichen Zustand (Hartl, 1996; Ellgaard and Helenius, 2003).

Die Präsenz und Anhäufung fehlerhaft gefalteter Proteine führt zu einer verstärkten Synthese von Chaperonen und anderen die Faltung katalysierenden Enzymen. Im Zuge dieser sog. *unfolded-protein-response* (UPR) werden fehlerhaft oder nur teilweise gefaltete Proteine quasi rückwärts durch das Translokon aus dem ER in das Zytosol transportiert und dort der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse zugeführt. Dabei sind sog. Rückhaltomotive in Chaperonen beschrieben worden (Lys-Asp-Glu-Leu, KDEL), die für einen Rücktransport aus dem Golgi in das ER sorgen.

Der Abbau ist über den Glykosylierungsstatus gesteuert, so dass für den Fall, dass die Glykosylierung abgeschlossen ist, jedoch die native Struktur nicht etabliert ist bzw. noch an Chaperone bindet, das Protein auf diese Weise dem Abbau zugeführt wird (Helenius and Aebi, 2001). Weiterhin bewirkt die Exposition hydrophober Bereiche auf der Proteinoberfläche eine Erkennung unreifer Proteine, da sich die hydrophoben Bereiche bei intakt gefalteten Proteinen normalerweise von der Oberfläche weg orientieren.

In Säugerzellen wird die Faltung von Glykoproteinen durch die Proteine der Qualitätskontrolle im ER unterstützt, deren prominenteste Proteine Calnexin/Calretikulin darstellen. Beide Lektine bewirken eine bessere Faltungseffizienz und halten es im ER zurück. Nach co-translationaler N-Glykosylierung wird durch eine Oligosaccharyltransferase spezifisch eine Glucose-(Glc)3-Mannose (Man)9-N-Acetyl-Glucosamin-(GlcNAc)2-Glykanstruktur an den freien Stickstoff eines Asparaginrestes in der Erkennungssequenz (Konsensussequenz) Asn-X-Ser bzw. Asn-X-Thr gebunden. Nach Reduktion der N-Glykan-Grundstruktur durch Glucosidase I und II binden membranständiges Calnexin und lösliches Calretikulin an das monoglykosylierte Protein. Der Komplex zerfällt und setzt ein Protein mit der Struktur Man9-GlcNAc2 frei, nachdem der letzte Glukoserest am zu faltenden Protein durch Glukosidase II abgespalten wurde. Ist eine korrekte Faltung nicht erreicht, kann die bisher nur in Säugerzellen identifizierte UDP-Glukose-Glycosyltransferase (UGGT) an das Protein binden und an gleicher Stelle einen Glukoserest anknüpfen (Arnold *et al.*, 2000; Parodi, 2000). Daraufhin kann das Protein wieder von Calnexin, Calreticulin und einer Oxidoreduktase (Erp57) gebunden werden und einen weiteren Faltungszyklus durchlaufen.

Sollte das Protein abschließend nicht korrekt gefaltet werden können, reduziert die langsam agierende Mannosidase I den Man9-GlcNAc2-Zuckerrest durch Abspalten der α 1,2-gekoppelten Mannose zu einem Glykan der Struktur Man8-GlcNAc2. Nur korrekt gefaltete Proteine mit der Man9-Struktur können das ER über den sekretorischen Weg verlassen und weiter reifen. Proteine mit einer Man8-Glykan-Struktur werden von einem spezifischen Lektin gebunden (Säuger-spezifischem EDEM [*ER-degradation-enhancing-alpha-mannosidase-like-protein*] bzw. Hefe-spezifischem Htm1p), dadurch dem Calnexin-Calreticulin-Faltungs-Zyklus entzogen, im ER zurückgehalten und dem Abbau über das Proteasom zugeführt (Hosokawa *et al.*, 2001; Helenius und Aebi, 2001).

Damit ist in diesem Falle die Aktivität eines Enzyms, die Mannosidase I, entscheidend für die Zeit, die einem Protein zur korrekten Faltung zur Verfügung steht.

Die Qualitätskontrolle sortiert auch Proteine aus, die funktionell wären, obgleich sie eine oder mehrere Mutationen tragen. Hier ist die Δ F508-Mutation im CFTR erneut

ein prominentes Beispiel. Das Protein könnte in der Plasmamembran funktional sein, wird jedoch im ER zurückgehalten und mittels ERAD abgebaut (Chang et al., 1999).

Die Kultivierung von $\Delta F508$ -exprimierenden Zellen bei erniedrigter Temperatur sowie die Behandlung solcher Zellen mit Osmolyten und sog. chemischen Chaperonen führen zur teilweisen Wiederherstellung des Transportes von $\Delta F508$ zur Plasmamembran. In diesem Zusammenhang gibt es zahlreiche Bemühungen mit niedermolekularen Wirkstoffen den Transportdefekt von $\Delta F508$ zu korrigieren (Denning et al., 1992; Brown et al., 1996; Pedemonte et al., 2005).

Auch für CFTR ist bekannt, dass nur etwa 30% des neu synthetisierten CFTR das ER verlassen und zur Plasmamembran transportiert werden kann. Der Rest wird dem Proteasom zum Abbau zugeführt (Bebök et al., 1998).

2.4 Das sekretorische System

Eine Säugerzelle trägt in ihrem Inneren mehrere tausend verschiedene Arten von Proteinen, die letztlich an den richtigen Ort im zellulären Geschehen transportiert werden müssen, um einen korrekten Ablauf der zellulären Funktionen zu gewährleisten. Dieser Prozess wird unter dem Terminus Proteinsortierung zusammengefasst. Für die Verteilung der beiden Proteinfractionen, die zytosolischen und die sekretorischen, gibt es zwei entsprechende Hauptwege. Der für den Transport von Transmembranproteinen relevante Weg ist der sekretorische Weg, der nachfolgend betrachtet wird.

Proteinreifung, Qualitätskontrolle (Proteinabbau) und Transport sind an zelluläre Kompartimente des sekretorischen Systems gebunden. Das sekretorische System wird in eukaryotischen Zellen von miteinander in Verbindung stehenden Kompartimenten gebildet. Der sekretorische Weg umfasst dabei das ER, den Golgi-Apparat, die Lysosomen, die Endosomen und schließlich die Plasmamembran, welche untereinander durch vesikuläre Transportprozesse den intrazellulären Transport von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden ermöglichen und dafür sorgen, dass das zu transportierende Material präzise seinem Bestimmungsort zugeführt werden kann (Palade, 1975; Alberts et al., 2004).

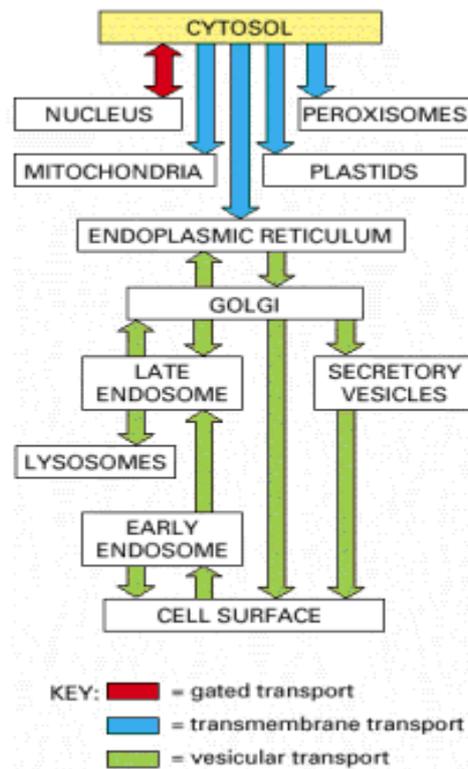


Abbildung 2: Intrazelluläre Transportwege (Alberts et al., 2004, Kapitel 12, Abb. 12-6)

Die Proteine werden im Rahmen der Proteinsortierung ihrem Bestimmungsort zugeführt. Dabei bewegen sie sich von Kompartiment zu Kompartiment auf dem Wege des Kerntransportes (rot), des Transmembrantransportes (blau) oder des vesikulären Transportes (grün). Spezifische Signale, die in der jeweiligen Aminosäuresequenz des zu transportierenden Proteins enthalten sind, bestimmen ob das Protein in einem bestimmten Kompartiment zurückgehalten oder weiter transportiert wird.

Im Gegensatz zu sekretorischen Proteinen erfolgt die Synthese von zytosolischen Proteinen oder Kernproteinen an sog. freien zytosolischen Ribosomen, die nicht mit dem ER assoziiert sind. Diese Proteine verbleiben im Zytosol, so lange sie nicht mit einer Zielsequenz, z.B. einer Kernlokalisationssequenz ausgestattet sind, die sie an ihren Zielort manövriert.

Die für den Einbau in die Plasmamembran bestimmten Proteine werden in einem ersten Schritt an zytosolische Ribosomen gebunden und in Form naszierender Polypeptidketten zum ER transportiert. Dazu tragen viele Proteine aminoterminal Zielsequenzen, die aus etwa 15-20 hydrophoben Aminosäureresten bestehen. Nach Lokalisation am ER werden die Proteine mit unterschiedlicher Zielortbestimmung,

luminal, membranständig und sekretorisch, an der ER-Membran vollständig synthetisiert.

Zytosolische Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) erkennen die beschriebenen N-terminalen Zielsequenzen im Zytosol und bewirken eine Lokalisation an den ER-membranständigen SRP-Rezeptor zusammen mit den translatierenden Ribosomen. Während des Transportes in das ER, der durch mehrere Transmembranproteine, das Translokon, vermittelt wird, werden die hydrophoben Signalpeptide später durch Signalpeptidasen entfernt (Görlich and Rapoport, 1993; Lodish et al., 2007).

Nach Dissoziation des SRP assoziiert die naszierende Polypeptidkette mit mehreren Transmembranproteinen, die als Translokon bezeichnet werden (Görlich and Rapoport, 1993). Das TRAM- (*translocating chain-associated membrane*)-Protein und Sec61p sind zwei Proteine, die mit der naszierenden Polypeptidkette assoziiert sind. TRAM scheint die Signalsequenz des Proteins zu erkennen und damit die Proteinpassage durch die ER-Membran vom SRP zum Sec61-Translokon zu vermitteln. Sec61p bildet mit zwei weiteren Proteinen (Sec61b, Sec61g) den Sec61-Komplex, der an das Ribosom (60S-Untereinheit) bindet und die Translokation durch die ER-Membran vermittelt. Der die Translokation der naszierenden sekretorischen Proteine bewirkende Komplex bildet einen Kanal aus, der aus drei oder vier Sec61-Komplexen geformt wird. Die Translokation ist energieabhängig und verbraucht GTP durch Hydrolyse an der P54-Untereinheit des SRP und der α -Untereinheit des SRP-Rezeptors (Lodish et al., 2007).

Nachdem das Protein nun die ER-Membran in ungefaltetem Zustand durchtreten hat, durchlaufen die neu synthetisierten Proteine nun grundsätzliche Modifikationen bevor sie zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Zuerst bilden sich, wenn vorgesehen, Disulfidbrücken aus. Die native Faltung wird unter Mitwirkung von Chaperonen erreicht. Es folgen spezifische Glykosylierungen am Asparaginrest (N-Glykosylierungen) bzw. am Serin- oder Threoninrest (O-Glykosylierungen), denen sich proteolytische Prozessierungen und schließlich eine Assemblierung in ggfs. multimere Proteine anschließt (Zapun et al., 1999).

Proteine werden zunächst einmal im ER in ihrem Kernbereich glykosyliert („core“-glykosyliert) bevor sie im Verlauf des Durchtretens durch den Golgi-Apparat aufglykosyliert werden. Auch für das CFTR-Protein ist eine solche Aufglykosylierung beschrieben, wobei entsprechend zwei Proteinformen mit 140 kDa (B-Form) und 170 kDa (C-Form) im experimentellen Teil beschrieben und später diskutiert werden.

Das ER ist auch der Ort der Proteinqualitätskontrolle, welche vor dem weiteren vesikulären Transport zu den anderen Organellen des sekretorischen Weges stattfindet (Chevet et al., 2001).

Durch diese im ER stattfindende Qualitätskontrolle werden nur teilweise oder fehlerhaft gefaltete Proteine im ER zurückgehalten bzw. aus dem Cis-Golgi-Komplex zum ER zurücktransportiert und mittels des Prozesses der sog. ER-assoziierten Degradation abgebaut (Meacham et al., 2001; Yang et al., 1993).

Der weitere Transport aus dem ER zum Golgi-Apparat erfolgt über sog. Transport- oder Membranvesikel, wobei die Interaktion der Vesikel mit den zu transportierenden Proteinen und die Vesikelfusion von zentraler Bedeutung sind.

Im Wesentlichen werden 3 verschiedene Vesikeltypen unterschieden, die Clathrin-umhüllten Vesikel und diejenigen Vesikel, die kein Clathrin enthalten, die COPI- und COPII-Vesikel (Coatomer-Protein-Komplexe). Diese Clathrin-umhüllten Vesikel bestehen aus einem Mantel, der aus jeweils 3 leichten und 3 schweren Clathrinketten und einem heterotetrameren Adaptor-Protein (AP) Komplex (Boehm and Bonafino, 2002) besteht. Analog zu den COPI- und COPII-Vesikeln regulieren GTPasen die Ausbildung der Mantelstrukturen der Clathrin-umhüllten Vesikel (ausgenommen davon ist AP-2). Clathrin vermittelt zusammen mit AP-2-Adaptoren den Prozess der Rezeptor-vermittelten Endozytose, wogegen der Transport vom TGN zu den Endosomen und zwischen den frühen und späten Endosomen mit AP-1-Adaptoren assoziiert ist (Rapoport et al., 1997; Lederkremer et al., 2001; Gorelick and Shugrue, 2001).

COPI- und COPII-Vesikel vermitteln primär die frühen Transportschritte, z.B. vom ER zum ER-Golgi-intermediären-Kompartiment (ERGIC) oder direkt zum Golgi-Apparat. Die COPI-Hülle besteht aus einem heptameren Proteinkomplex (α -, β -, β' -, δ -, ϵ -, γ -, ζ -coat) von etwa 700 kDa und der kleinen GTPase Arf1p, die Assemblierung und

Dissoziation der Mantelkomponenten reguliert (Rothman and Wieland, 1996; Lanoix et al., 2001; Duden, 2003; Watson et al., 2004). Der COPII-Komplex wird aus zwei Heterodimeren (dem Sec23/24- und Sec13/31-Komplex) sowie der kleinen GTPase Sar1p gebildet (Stagg et al., 2008). Während die COPI- und die COPII-Komponenten für den anterograden Transport benötigt werden, verläuft der retrograde Transport unter direkter Mitwirkung der COPI-Vesikel (Bonifacino and Glick, 2004).

An der ER-Membran schnüren sich nun zunächst sog. COPII-Vesikel an spezifischen ER-Exit-Stellen (ERES) ab, um mit der Membran des sog. *Cis*-Golgi zu verschmelzen. Die „zellauswärts“ bestimmten Proteine werden mittels COPII zum ERGIC oder direkt zum Golgi-Apparat transportiert. Diesem vorwärts gerichteten Proteintransport wirkt das rückwärts gerichtete Recycling der Transportkomponenten zurück zu den Ursprungskompartimenten entgegen. Dieser wird über COPI vermittelt. Mit der Ausnahme von CFTR, vermitteln COPI-Komplexe für die meisten Transmembranproteine den Transport in beiden Richtungen innerhalb der Golgi-Zisternen und den retrograden Transport vom ERGIC zurück zum ER (Bednarek et al., 1996; Duden, 2003; Rabouille and Klumpermann, 2005; Yu et al., 2007).

Im ERGIC erkennt die zelluläre Qualitätskontrolle nicht korrekt gefaltete Intermediate, welche durch die COPI-Maschinerie zum ER zurück transportiert werden (Barlowe, 2000). Die korrekt gefalteten Proteine passieren den Golgi-Apparat und gelangen in die zahlreichen Zisternen, in denen auf proteolytischem Wege die weitere Prozessierung erfolgt. Im TGN findet eine Sortierung statt, wonach die Proteine in Richtung Plasmamembran oder in andere zelluläre Kompartimente gelenkt werden. Die meisten zur Sekretion oder zum Einbau in die Membran bestimmten Proteine werden schließlich über Transportvesikel zur Membran befördert. Es ist gezeigt worden, dass die Transportvesikel, die vom TGN zu den Endosomen führen, AP-1/Clathrin tragen, weniger eindeutig ist die Existenz der zur Plasmamembran führenden Vesikel (Pfeffer, 2003).

Auf dem Wege des Transportes zur Plasmamembran kann es noch zu weiteren proteolytischen Reifungsschritten kommen bevor die Vesikel mittels Membranfusion ihren Inhalt entleeren.

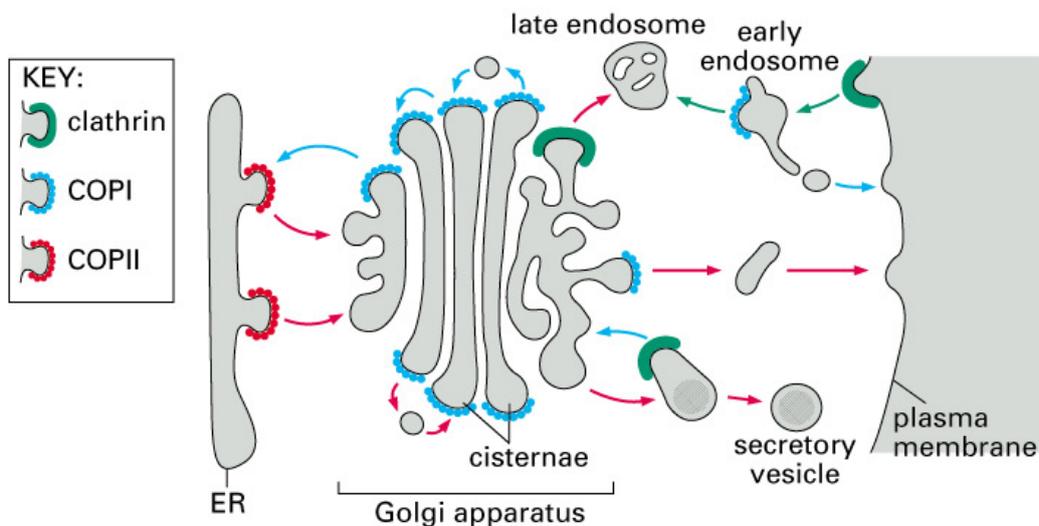


Abbildung 3: Unterschiedlich ummantelte Vesikel vermitteln den Transport zur Membran (Alberts et al., 2004, Kapitel 13, Abb. 13-5).

Spezifische Vesikelmantelproteine erkennen die zum Transport bestimmten Proteine. Die Transportvesikel folgen im Wesentlichen dem biosynthetisch-sekretorischen (vom ER zur Plasmamembran) und dem endozytotischen Weg (beginnend mit Vesikeln, die sich von der Plasmamembran abschnüren). Es schnüren sich aber auch Vesikel von den frühen Endosomen ab und zirkulieren zurück zur Plasmamembran, wo sie wieder verwendet werden. Abhängig vom Zelltyp werden auch weitere Transportwege genutzt, wie z.B. der für CFTR beschriebene unkonventionelle Transportweg vom ER zum TGN (s.u. 2.6 in der Einleitung und bei Yoo et al., 2002).

Die Fusion der Vesikel wird über sog. vSNARE und tSNARE (*soluble NSF attachment proteins*) vermittelt, wonach jedes Vesikel ein v(*vesicle*)-SNARE trägt, und das Zielkompartiment ein t(*target*)-SNARE. SNARE Proteine fallen in zwei Klassen, die sog. Typ-II-Transmembranproteine (Synaptobrevine bzw. Syntaxine) und die SNAP-25-Familie, die über Acylreste in der Membran verankert sind (Weimbs et al., 1998). Alle SNARE bilden alpha-helikale Strukturen aus, die dem *coiled-coil*-Modell folgend assoziieren und stabile fusionsvermittelnde Strukturen formen (Bonifacino and Glick, 2004).

2.4.1 Sortierungssignale vermitteln die Interaktion von Transportvesikeln und CFTR

Die Assoziation der COP-Komplexe mit den zu transportierenden Proteinen wird über spezifische Sortierungssignale gesteuert. Konkret für COPI beschrieben sind ein di-basisches ER-Rückführungssignal und Tyrosinreste, die für den retrograden Transport genutzt werden (Cosson and Letourneur, 1994; Bednarek et al., 1996; Cosson and Letourneur, 1997; Barlowe, 2000). Außerdem ist ein di-basisches Arginin-Signal, welches als ER-Lokalisationssignal in verschiedenen Oberflächenrezeptoren und Kanälen wirkt, beschrieben worden (Yuan et al., 2003). Alle Signale sind an der Interaktion mit COPI beteiligt.

Für die Interaktion mit COPII sind mehrere ER-Exportsignale beschrieben worden, z.B. die zwei saure Aminosäurereste tragende (*di-acidic*) Motive und di-hydrophobe Motive, welche, auch für CFTR beschrieben, spezifisch über die Sec24-Proteine an COPII binden (Wang et al., 2004; Bonifacino and Glick, 2004).

Weixel und Bradbury (2001) beschrieben, dass Tyrosin- und Di-Leucin-Motive im C-Terminus von CFTR mit der μ 2-Untereinheit des AP-2-Clathrin-Adaptorkomplexes interagieren und somit die Clathrin-vermittelte Endocytose initiieren können.

2.5 CFTR-Reifung, Funktion und Fehlfunktion

Obgleich strukturell zur Familie der ABC-Transporter gehörend, finden sich nennenswerte Unterschiede im CFTR-Protein, insbesondere im Hinblick auf seine Funktionsweise als Anionenkanal. Ein Überblick zu der Funktionsweise und der Regulation des Chloridkanals findet sich bei Riordan (2008) und bei Serohijos et al. (2008) sowie He et al. (2008). Darin wird beschrieben, auf welche Weise konformationelle Veränderungen innerhalb von NBD und MSD sowie zwischen diesen Domänen und dem Phosphorylierungsstatus (der R-Domäne) sich die Kanaleigenschaften quantitativ steuern lassen.

Reifes CFTR gelangt in Säugerzellen, wie oben beschrieben, über den sekretorischen Weg an seinen Bestimmungsort, die apikale Plasmamembran sekretorischer Epithelien. Metabolische Markierungs- und sog. *pulse-chase*-Experimente heterolog exprimierten CFTR konnten zeigen, dass nach etwa 5 – 10

Min. das komplette im Kernbereich glykosylierte CFTR gebildet werden konnte. Bis zu 2 Stunden sind notwendig, um auch höhermolekulares reifes CFTR zu bilden, von dem aber maximal auch nur etwa ein Drittel die Plasmamembran erreicht. Dasjenige reife CFTR, welches dann das Golgi- und post-Golgi-Kompartiment erreicht, ist vergleichsweise stabil mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von etwa 16 Stunden (Ward and Kopito, 1994; Lukacs et al., 1994; Gelman and Kopito, 2003; Ward et al., 1995; Jensen et al., 1995; Sato et al., 1998).

Die komplette und funktionale Synthese von CFTR ist damit recht komplex, so dass in Säugerzellen schließlich nur etwa 30% des synthetisierten Proteins in den sekretorischen Weg entlassen werden (Gelman and Kopito, 2003). Ca. 70% des CFTR werden bereits im ER zurückgehalten und schließlich dem Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt (Ward et al., 1995; Jensen et al., 1995; Loo et al., 1998).

Die $\Delta F508$ -Mutation sitzt in der NBD-1 und zeigt den beschriebenen Reifungsdefekt im ER und wird infolgedessen dort zurückgehalten und dem Proteinabbau zugeführt. Die Deletion des in analoger Position befindlichen Phenylalanins in anderen ABC-Transportern führt interessanterweise auch zu einer kompletten Arretierung im ER (Loo et al., 2004). Erreicht es die Apikalmembran und kommt es zu einer funktionalen Integration in die Membran, erzielt der mutierte Kanal etwa 30% der Aktivität des CFTR (Dalemans et al., 1991; Sheppard et al., 1993).

Von den CFTR-Molekülen, die die Zellmembran erreichen, werden ca. 10% pro Minute wieder internalisiert. Diese hohe Internalisierungsrate liegt deutlich über der beschriebenen Syntheserate für CFTR. Daraus lässt sich folgern, dass ein substantieller Anteil des internalisierten CFTR wieder zurück zur Plasmamembran transportiert werden muss (Prince et al., 1994; Picciano et al., 2003; Sharma et al., 2004).

Die in die Zelle führende Route ist recht gut verstanden und folgt im Wesentlichen dem durch Clathrinvesikel (*clathrin coated vesicles*, CCV) vermitteltem Weg (Lukacs et al., 1997). Diese Clathrin-umhüllten Vesikel assoziieren mit Membranproteinen unter Vermittlung von sog. Clathrin-Adaptor-Komplexen, die vom Golgi (AP-1) oder von der Plasmamembran (AP-2) abgeleitet sein können. Die Interaktion der Clathrin-

umhüllten Vesikel mit den Membranproteinen wird ebenso wie die Interaktion mit den COP-Komplexen über sog. Sortierungsmotive vermittelt, die z.B. Tyrosin- oder Leucin-basiert und in den Membranproteinen lokalisiert sind. So ist z.B. ein im C-terminalen Bereich des CFTR gelegenes Tyrosin-Motiv für die durch AP-2 vermittelte Assoziation und den Eintritt in Clathrin-umhüllte Vesikel verantwortlich beschrieben worden (Weixel et al., 2000).

Weniger gut verstanden ist die Exitroute. Frühere Studien konnten zeigen, dass der Transport von CFTR, Zelltyp-abhängig, einem nicht-konventionellem Weg folgen kann, wonach CFTR vom ER direkt zu einem späten Golgi/endosomalem und nicht zum frühen Cis-Golgi-Kompartiment transportiert wird. Anschließend ist ein Transport zurück zum frühen Golgi zwecks weiterer Prozessierung beschrieben (Yoo et al., 2002). Zuvor war durch *in situ*-Untersuchungen bekannt, dass CFTR weitgehend abwesend vom Golgi ist (Bannykh et al., 2000).

Trotz noch vieler offener Fragen zur Regulation des Transportes von CFTR wurde der Export von CFTR aus dem ER als COPII-vermittelt beschrieben. Der vesikuläre C-Mantelprotein-sec23/24-Transportkomplex erkennt danach ein durch zwei saure Aminosäurereste charakterisiertes Exitsignal (*diacidic exit code*, DAD) im zu transportierenden Protein, bestehend aus drei Aminosäuren in der NBD-1 des CFTR. Der Export aus dem ER ist blockiert, wenn dieses Motiv mutiert wird (Wang et al., 2004).

Arbeiten jüngerer Datums implizieren jetzt auch eine wichtige Rolle für den COPI-Komplex, welcher in den sekretorischen Transport involviert ist, im Reifungsprozess von CFTR. Yoo et al. (2002) zeigten bereits, dass CFTR-Transport COPI-abhängig (HeLa und HEK293) und COPI-unabhängig verlaufen kann und damit Zelltyp-abhängig ist. COPI vermittelt den anterograden und retrograden Transport zwischen ER und Golgi. Nach der aktuellen Datenlage geht man davon aus, dass COPI basische Aminosäurereste oder Tyrosinreste erkennt, die im ungefalteten oder nicht-assemblierten Zustand der Proteine gegenüber dem wässrigen Milieu exponiert sind. Dieser Annahme folgend bindet COPI diese Signalsequenzen und vermittelt den Transport der ungefalteten Proteine zurück zum ER (Letourneur et al., 1994, Bednarek et al., 1996; Cosson and Letourneur, 1997; Harter and Wieland, 1998).

Transmembranproteine mögen mehrere Zyklen der Faltung, des Exits aus dem ER, der Zurückhaltung, Arretierung, dem Recycling und der erneuten Faltung durchlaufen, bis sie schließlich die fertige Konformation erhalten. Basische Aminosäuren (Leucin-Motive) und Tyrosinsignale, in der Diskussion beschrieben, kann man sich dann in der fertigen Konformation versteckt vorstellen (Yu et al., 2007). Damit unterbliebe nachfolgend eine Interaktion mit Komponenten des COPI- oder COPII-Komplexes (s.a. Diskussion).

Für CFTR konnte nun gezeigt werden, dass COPI notwendig ist, damit das CFTR-Protein transportiert und funktional in der Membran exprimiert werden kann (Rennolds et al., 2007; Yu et al., 2007). Der Nachweis wurde auf zwei Wegen geführt. Die Transfektion dominant-negativer GEF-(*guanine nucleotide exchange factor*; aktivieren ARF) und ARF-(*ADP-ribosylation factor, small GTPase*)Mutanten verhindern, dass CFTR die Plasmamembran in der endogenes CFTR exprimierenden Zell-Linie 29Cl.19A erreicht. Die COPI-Vesikelformation benötigt aktives ARF und ist daher auch abhängig von der Aktivität der GEF. Infolgedessen interferiert die Expression dieser dominant-negativ wirkenden Mutanten mit dem konventionellen Transportweg der Proteine vom ER zum Golgi. Parallel dazu wurde mittels siRNA die β -Untereinheit von COPI ausgeschaltet und auf diese Weise auch der Membrantransport von CFTR gestört sowie die messbaren cAMP-aktivierten Chloridströme reduziert (Rennolds et al., 2008). Yu et al. (2007) inaktivierten COPI mittels Gentransfer von CFTR in sog. ε -COP Temperatur-sensitive IdIF-Zellen, in denen die ε -COP Komponente und dadurch COPI durch Temperaturanstieg auf 39°C inaktiviert wird. Inaktivierung von COPI und Wiederherstellung der Aktivität durch Wiedereinführung eines Wildtyp ε -COP-Genes führte zu Verlust bzw. Wiederausbildung eines voll funktionsfähigen cAMP-abhängigen CFTR-Chloridkanals (Yu et al., 2007). Damit etablierten beide Publikationen eine wichtige Funktion für die Rolle von COPI in der Ausbildung eines nativen Chloridkanals. Bezüglich der spezifischen Funktion von COPI für die CFTR-Reifung unterscheiden sich die Schlussfolgerungen beider Arbeiten insofern, als dass Yu et al. (2007) zeigen können, dass CFTR auch in Abwesenheit von funktionalem COPI die Plasmamembran erreicht, aber dann nicht funktionsfähig ist. Wogegen Rennolds et al. (2008) keine Plasmamembranlokalisation in Abwesenheit funktionalen COPI

nachweisen können. Die beobachteten Unterschiede können Zelltyp-abhängig sein und damit konsistent mit den Daten von Yoo et al. (2002).

Damit würde nach Yu et al. (2007) COPI im Falle von CFTR, anders als bei den meisten beschriebenen Transmembranproteinen, nicht primär oder alleine den retrograden Transport vermitteln sondern eher als zellulärer Faktor faltungs- und reifungsunterstützend wirken.

2.6. Mukoviszidose – Molekulare Ursachen und Folgen einer unheilbaren Erbkrankheit

Cystische Fibrose (CF) wird durch Defekte im CFTR-Protein verursacht. Die molekulare Ursache der Erkrankung liegt in Mutationen im CFTR-Gen, welches für das 1440 Aminosäuren umfassende integrale Membranprotein codiert. Mehr als 1500 Mutationen wurden beschrieben (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/). Im Wesentlichen können diese Mutationen entsprechend ihren Effekten in vier Gruppen gegliedert werden, je nachdem auf welchen Prozess sie sich auswirken, (a) die Proteinsynthese, (b) die Proteinreifung, (c) den Ionentransport und (d) das Kanalschaltverhalten (*channel gating*).

Letztlich tragen alle Patienten, die klinisch positiv für CF diagnostiziert werden, eine Mutation in den beiden CFTR-Allelen. Etwa zwei Drittel aller CF-Patienten tragen Mutationen im CFTR-Gen, welche die Reifung von CFTR beeinträchtigen. Obgleich dabei ausreichende Mengen an CFTR synthetisiert werden, wird das defekte CFTR vor Erreichen der Plasmamembran degradiert. So bewirkt auch die am häufigsten beschriebene $\Delta F508$ -Mutation, dass CFTR nicht zur Plasmamembran transportiert werden kann. Auch intaktes CFTR wird nur in 20%-30% der Fälle in funktionsfähiger Form zur Membran transportiert. D.h. ca. 70% werden nach Synthese schnell degradiert.

Die CF ist eine in der kaukasischen Bevölkerung häufige Erbkrankheit. Der durch die CFTR-Mutationen bedingte Aktivitätsverlust führt dazu, dass der Ionen- und Wasserhaushalt der Zelle nachhaltig gestört wird, was zähen und hoch viskosen Schleim verursacht. Am dramatischsten wirkt sich das auf die Atemwege aus, in

denen sich chronische Entzündungen und Infektionen ausbilden, die zu einer drastischen Funktionseinschränkung der Lunge und auf diesem Wege zu hoher Morbidität und Mortalität führen (Quinton, 2007; Accurso, 2007). Der zähe Mucus wird vom trachealen Flimmerepithel nicht abtransportiert und begünstigt dadurch die Besiedlung mit zumeist gramnegativer Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* und auch *Staphylococcus aureus*. Die anhaltenden Atemwegsinfektionen führen zu einer schweren Lungeninsuffizienz, die sich in Form von Sauerstoffmangel und Atemnot bemerkbar macht.

Im Weiteren sind zahlreiche Organe, wie der Darm, die Bauchspeicheldrüse, Leber und Gallenwege sowie die Geschlechtsorgane von CF-Erkrankten betroffen. Die Symptome sind durchweg schwerwiegend. So haben ca. 2% der Kinder und etwa 50% der Erwachsenen einen Diabetes mellitus, Entsprechend den betroffenen Organen werden schwere Obstruktionen im Darm, Verdauungsstörungen, Untergewicht, Leberzirrhosen, Gallensteine und Unfruchtbarkeit diagnostiziert.

Weniger dramatische Mutationen im CFTR-Gen führen bei Erwachsenen zu Bauchspeicheldrüsenproblemen, wogegen Patienten mit schwerwiegenden Mutationen im CFTR-Gen das gesamte Erscheinungsbild der Mukoviszidose zeigen.

Die molekulare Aufklärung derjenigen Mechanismen, die die Faltung, die Reifung und den Transport von CFTR zur Membran bzw. den Abbau von CFTR kontrollieren, ist von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapeutika zur Behandlung von CF. Die überwiegende Anzahl der CF-relevanten Mutationen führt zu inkorrekt gefaltetem CFTR, welches mittels ERAD abgebaut wird.

Unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. niedriger Temperatur (28°C) oder dem Einsatz von Inhibitoren, kann die Expressions- und Transportrate von CFTR deutlich gesteigert und dem Abbau von CFTR durch das Ubiquitin-Proteasom-System entgegengewirkt werden.

2.7 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Halbwertszeit intrazellulärer Proteine variiert stark, ist aber letztlich begrenzt. Ein wesentlicher intrazellulärer Degradationsweg verläuft über einen enzymatischen Abbau in Lysosomen. Der aber am besten verstandene Weg wird über das Ubiquitin-Proteasom-System dargestellt. Dabei wird in einem ersten Schritt, eine Kette von Ubiquitin-Molekülen an ein internes Lysin im Protein gekoppelt und dieses damit zum Abbau markiert. In einem zweiten Schritt wird das mit Ubiquitin markierte Protein dem Proteasom zugeführt, welches die markierten Proteine abbaut. In Folge dieses ATP-abhängigen Prozesses entstehen Peptide und wiederum freies Ubiquitin (Liakopoulos et al., 1998).

Das Ubiquitin umfasst 76 Aminosäuren. Der Name „Ubiquitin“ steht für sein ubiquitäres Vorkommen in allen bislang untersuchten eukaryotischen Spezies (Ozkaynak et al., 1984). Die reife Form des Ubiquitin wird nach C-terminaler Prozessierung aus einem Vorläuferprotein gewonnen, wodurch ein für die Konjugation benötigtes C-terminales Doppelglyzin-Motiv gebildet wird (Müller et al., 2001).

Die Übertragung des Ubiquitins auf ein anderes Protein erfolgt auf katalytischem Wege im Rahmen einer Kaskade an welcher drei Enzymfamilien beteiligt sind, die auf der dem Zytosol zugewandten Seite des ER sitzen. In einem ATP-abhängigen Prozess wird das etwa 8 kDa große und lösliche Protein an seinem C-Terminus durch das Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 (Uba) unter Bildung eines Ubiquitinadenylates aktiviert. Unter Freisetzung von AMP wird das Adenylat auf die Thiolgruppe des katalytischen Cysteins im katalytischen Zentrum des E1-Enzyms übertragen wodurch eine energiereiche Thioesterbindung entsteht. Durch Transesterifizierung wird das aktivierte Ubiquitin auf Ubiquitin-konjugierende E2-Enzyme (Ubc) übertragen. Erneut dient ein Cystein im aktiven Zentrum von Ubc als Akzeptor für das Ubiquitin. Ubiquitin-E3-Ligasen vermitteln als Spezifitätsfaktoren die Übertragung des Ubiquitins auf das für den Abbau bestimmten Protein, wobei dieser Schritt auch direkt von Ubc realisiert werden kann (Jentsch, 1992; Jentsch and Pyrowolakis, 2000).

Die E3-Ligasen gliedern sich in die RING- und HECT-Ligasen. Die RING-Typ-Ligasen bringen die Ubc's und die Proteinsubstrate in räumliche Nachbarschaft und können als Adaptormoleküle betrachtet werden, während die HECT-Typ-Ligasen die Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin und einem Cysteinrest in der HECT-Domäne bewirken (Tanaka et al., 2001).

Ein wiederholtes Durchlaufen dieser Enzymkaskade ermöglicht die Ausbildung von Polyubiquitinketten. Dabei dient vor allem das Lysin an Position 48 im Ubiquitinmolekül als Akzeptor für weitere Ubiquitinmoleküle. Umfasst die Ubiquitinkette mindestens vier Ubiquitinmoleküle wird das polyubiquitinierte Protein einem hochmolekularen Komplex, dem Proteasom, zum Abbau zugeführt (Thrower et al., 2000).

Das Proteasom ist als 26S großer Multiproteinkomplex mit katalytischen Eigenschaften im Zytosol und im Kern eukaryotischer Zellen charakterisiert worden. In der molekularen Gesamtstruktur stellt sich dieser Komplex als aus einem 20S-Kernzylinder und zwei benachbart gelegenen regulatorischen 19S-großen kappenartigen Einheiten zusammengesetzt dar. Vier übereinander angeordnete Ringe, die aus sieben verschiedenen α - oder β -Untereinheiten bestehen, bilden den molekularen Zylinder. Im Inneren dieser Zylinderstruktur bilden die β -Untereinheiten das proteolytisch aktive Zentrum. Die 19S-Einheiten erkennen, binden, entfalten das abzubauen Protein und führen dieses dem 20S-Komplex zu. Die 19S-Einheiten setzen sich aus einem Basis und einem Deckelmodul zusammen. Sechs ATPasen (Rpt 1-6) der AAA-Familie (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) und drei Nicht-ATPasen (Rpn 1, 2 und 10) bilden die Basis. Die ATPasen haben Chaperon-ähnliche Eigenschaften und vermitteln Bindung und Entfaltung. Der Deckel besteht aus acht Nicht-ATPase-Untereinheiten, (Rpn 3-9, Rpn 12, 13), die die Abspaltung der Polyubiquitinketten bewirken, woraufhin das entfaltete Protein in das Innere des 20S Zylinders zum Abbau transportiert wird (Pickart, 2000).

Wie weiter oben beschrieben bewirkt die $\Delta F508$ -Mutation eine strukturelle Veränderung der nativen Faltung dieses Kanalproteins und einen beschleunigten Proteinabbau (Riordan, 2008; Zhang et al., 1998; Younger et al., 2006; Cui et al., 2007; Serohijos et al., 2008; He et al., 2008; Cheng et al., 1990). Später konnte gezeigt werden, dass die $\Delta F508$ Mutation zu einem beschleunigten Abbau von CFTR

bereits in einem frühen Reifungsstadium im endoplasmatischen Retikulum (ER) und damit zu einem Funktionsausfall führt (Sharma et al., 2004; Gentsch et al., 2004). Bekanntermaßen können z.B. Phenylbutyrat und die SERC-Inhibitoren dem Proteinabbau von $\Delta F508$ reduzieren. Neben der Rolle des Ubiquitins beim Abbau von Proteinen, einschließlich von CFTR, ist allerdings nur wenig darüber bekannt, welche molekularen Mechanismen den Transport von CFTR zur Plasmamembran steuern. Im Zusammenhang mit der Funktion des Ubiquitins wurde in den letzten Jahren ein weiterer posttranslationaler Modifikationsmechanismus, die Sumoylierung, beschrieben. Die Sumoylierung wurde zunächst für kernlokalisierte Transkriptionsfaktoren und DNA-modifizierende Enzyme gezeigt, bevor in den letzten Jahren auch eine Funktion der Sumoylierung für die Regulation von Plasmamembrankanälen und Rezeptoren beschrieben wurde (s.u.).

2.8 Sumoylierung, eine spezielle Form der posttranslationalen Modifikation

Wird ein Protein mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO modifiziert, so spricht man von Sumoylierung. Der Name SUMO steht dabei stellvertretend für *small Ubiquitin related modifier*. Die Sumoylierung ist eine Form der Modifikation, die zahlreiche Prozesse in der Zelle reguliert, wie z.B. die Lokalisation eines Proteins, dessen Aktivität, Stabilität oder Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Melchior, 2000; Melchior et al., 2003). Der Prozess der Modifikation wird auf katalytischem Weg in einer Reihe subsequenter Schritte mittels der sog. E1-, E2- und E3-Enzyme vermittelt. Die Sumoylierung von Proteinen ist reversibel und wird durch die SUMO-Proteasen bewerkstelligt (Müller et al., 2001).

Die 3D-Strukturen von Ubiquitin und SUMO zeigen ein hohes Maß an Ähnlichkeit, obgleich beide Proteine auf der Ebene der Primärsequenz nur zu 18% Sequenzähnlichkeit aufweisen.

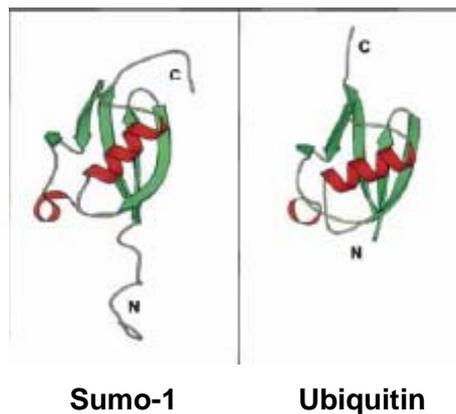


Abbildung 4: Struktur von SUMO-1 (links) und Ubiquitin (rechts).

SUMO-1 (101 Aminosäuren) und Ubiquitin (76 Aminosäuren) zeigen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit in der 3-D-Struktur in Gegenwart nur geringer Übereinstimmung auf der Ebene der Primärsequenz (Bayer et al., 1998).

Wie oben dargestellt, gehen beide Proteine kovalente Bindungen mit anderen Proteinen ein (Konjugationen). Dabei dient die sog. Ubiquitinierung im Wesentlichen der Markierung von Proteinen zum Abbau und die Sumoylierung wird im Zusammenhang mit der Stabilisierung von Proteinen, deren Aktivitätskontrolle, Lokalisation, aber auch mit der Kontrolle der genomischen Stabilität in Verbindung gebracht (Klenk et al., 2006; Prudden et al., 2007; Guo et al., 2007).

Sumoylierung und Ubiquitinierung nehmen damit beide die posttranslationale Kontrolle zahlreicher Proteinfunktionen wahr und sind damit integraler Bestandteil adaptiver zellulärer Regulationsnetzwerke.

2.8.1 Molekulare Grundlagen

In Säugern sind vier SUMO-Proteine bzw. Isoformen (SUMO-1, -2, -3 und -4) beschrieben worden (Matunis et al., 1996; Bohren and Nadkarni, 2004). SUMO-2 und -3 sind nahezu identisch und zeigen beide eine etwa 50%ige Ähnlichkeit auf Sequenzebene zu SUMO-1, welches 101 Aminosäuren aufweist. SUMO-IV ist bislang nicht umfassend charakterisiert.

Analog zur Ubiquitinierung findet die Modifikation mit SUMO über eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und einer ϵ -Aminogruppe eines Akzeptorlysins im Zielprotein statt. Auch die einzelnen Schritte der sog. Sumoylierung sind in der Abfolge der Ubiquitinierung ähnlich.

SUMO wird als Vorläuferprotein C-terminal von Cystein-Proteasen (SENP, SUMO/*sentrin-specific protease*) prozessiert (Kamitani et al., 1997, 1998). Die aktive und zur Konjugation befähigte Form trägt C-terminal ein Doppelglyzin-Motiv. Das zur Ausbildung der Isopeptidbindung benötigte Lysin befindet sich häufig eingebettet in ein sog. SUMO-Motiv, welches als spezifische Sumolyierungsstelle dient. Das Konsensusmotiv ist charakterisiert durch die Abfolge von vier Aminosäuren ΨKxE , wonach Ψ für eine aliphatisch verzweigte Aminosäure und x für jede beliebige Aminosäure steht.

Zwei weitere SUMO-Motive (SUMO-*acceptor sites*) sind in Erweiterung des klassischen SUMO-Motives kürzlich beschrieben worden. Zum einen wurde ein Phosphorylierungs-abhängiges SUMO-Motiv (PDSM) im Hitzeschockfaktor 1 und anderen Proteinen identifiziert. Es besteht aus der klassischen Sequenz gefolgt von einem phosphorylierten Serin und einem Prolinrest $\Psi KxE\text{ExpSP}$ (Hietakangas et al., 2006). Zum Anderen ist ein SUMO-Motiv beschrieben worden, welches negative Aminosäurereste C-terminal vom Lysin trägt und als NDSM (*negatively-charged amino-acid-dependent sumoylation motif*) bezeichnet wird.

Darüberhinaus sind auch Akzeptorstellen für eine SUMO-Bindung in Proteinen identifiziert worden, die nicht das klassische SUMO-Motiv enthalten, deren Rolle aber noch unklar ist. Schließlich ließen sich auch kleine Motive identifizieren, die eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO-Proteinen vermitteln und als SIM/SBM (SUMO-Interaktions-Motiv/SUMO-Bindungs-Motiv) bezeichnet werden (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Dieses Motiv trägt eine hydrophobe Kernsequenz und ist N- oder C-terminal flankiert von sauren und/oder Serinresten (Song et al., 2004). Eine mögliche Funktion des Serins besteht danach womöglich in der Regulation der SUMO-Bindung durch Phosphorylierung, da zusätzlich negative Ladungen die SUMO-Bindung unterstützen.

Die Konjugation von SUMO an ein Zielprotein beginnt mit einem ATP-abhängigen Schritt, in welchem das SUMO-aktivierende Enzym E1 (AOS1/UBA2) das SUMO-Molekül bindet (Desterro et al., 1999). Das SUMO-Adenylat geht intermediär über seine C-terminale Carboxygruppe eine Thioesterbindung mit dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms ein. Daraufhin bildet das konjugierende Enzym E2 (Ubc9) einen Thioester mit SUMO aus, erneut mittels des Cystein im aktiven Zentrum des E2-Enzyms (Gong et al., 1997). Im letzten Schritt kommt es zur Übertragung von

SUMO auf das finale Proteinsubstrat (Hochstrasser, 2000). Dabei ist gezeigt worden, dass dieser Schritt auch in Abwesenheit sog. E3-Enzyme ablaufen kann (z.B. RanGAP1). Wie für das Ubiquitinsystem sind jedoch E3-ähnliche Faktoren beschrieben worden, die auch hier als eine Art Adaptor bzw. Substraterkennungsproteine fungieren und zu einer effizienteren Sumoylierung führen (Matunis et al., 1996; Matunis et al., 1998; Mahajan et al., 1997; Mahajan et al., 1998).

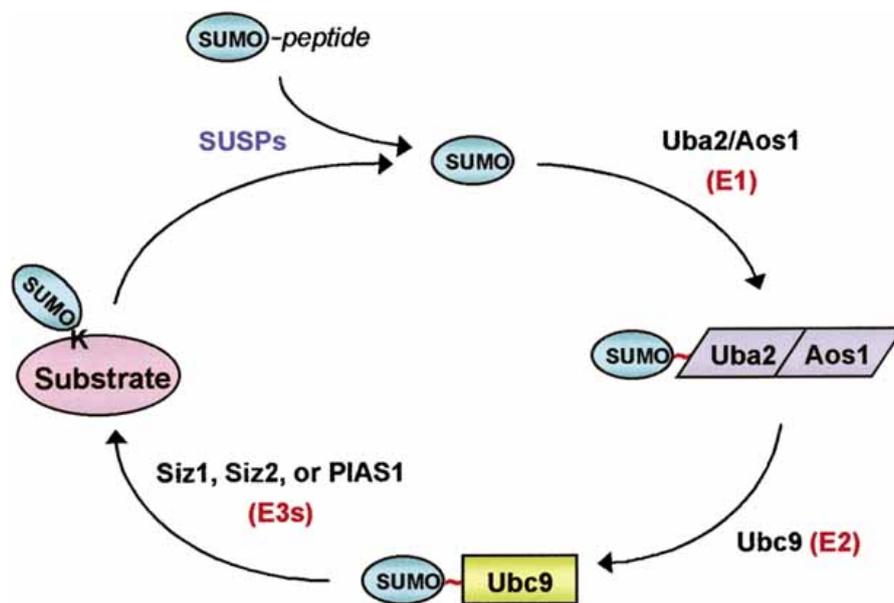


Abbildung 5: Zyklus der Sumoylierung und Desumoylierung (Kim et al., 1999)
 Alle Sumo-Proteine werden als Vorläuferproteine synthetisiert, die direkt hinter einem konservierten Gly-Gly-Motiv C-terminal prozessiert werden. Das reife Sumo-Protein wird dann durch das E1-Heterodimer AOS1-UBA2 aktiviert, wodurch ein Thioester zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Sumo-Proteins und UBA2 ausgebildet wird. SUMO wird dann auf den katalytisch aktiven Cysteinrest von UBA2 übertragen. Im nächsten Schritt wird SUMO auf das E2-Enzym Ubc9 unter erneuter Bildung eines Thioesters transferiert. Schließlich vermittelt Ubc9 den Transfer von Sumo bzw. dessen C-terminalen Glycinrestes auf ein Lysin im Zielprotein. In den meisten Fällen ist dieser Schritt durch die E3-Ligase vermittelt. Letztlich wird der Zyklus durch Desumoylierung des Zielproteins mittels SUMO-spezifischer Proteasen abgeschlossen (SENP).

Die Sumoylierung ist reversibel und Desumoylierung erfolgt durch SENP, die auch für die Prozessierung der Vorläuferproteine beschrieben sind (Gong et al., 2000). Die SENP-Familie der Säuger umfasst acht Proteine, von denen für vier Vertreter eine entsprechende Prozessierungs- und SUMO-Isopeptidase-Aktivität experimentell gezeigt werden konnte (SENP1, 2, 3 und 6). Die Lokalisation von SENP hat möglicherweise auch einen Einfluss auf ihre vermeintliche Selektivität gegenüber den Substraten.

Zahlreiche Zielproteine der Sumoylierung sind beschrieben worden. Diese befinden sich in der Plasmamembran, dem Zytoplasma, dem Zellkern, dem ER u.a. und sind involviert in unterschiedliche Prozesse, wie z.B. die Regulation der Chromatinstruktur, der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur, die Steuerung der Aktivität von Plasmamembrankanälen oder die subzelluläre Lokalisation (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Abbildung 6). In einigen Fällen finden Ubiquitinierung und Sumoylierung am gleichen Lysinrest statt (I κ B α , Desterro et al., 1998; PCNA, Hoege et al., 2002). Konkrete Beispiele dafür, dass die Sumoylierung Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation, die Kontrolle des Kern-zytoplasmatischen Transports (RanGAP1) sowie die DNA-Replikation (PCNA, Rad52, Topoisomerasen) und die Steuerung transkriptionaler Prozesse hat, finden sich bei (Görlich and Kutay, 1999; Saitoh et al., 1998; Goodson et al. 2001; Rogers et al., 2003). Eine zunehmend größer werdende Anzahl von Berichten unterstreicht, dass verschiedene posttranslationale Modifikationen und die durch SUMO vermittelten Modifikationen einander regulieren können (zusammengefasst in Guo et al., 2007).

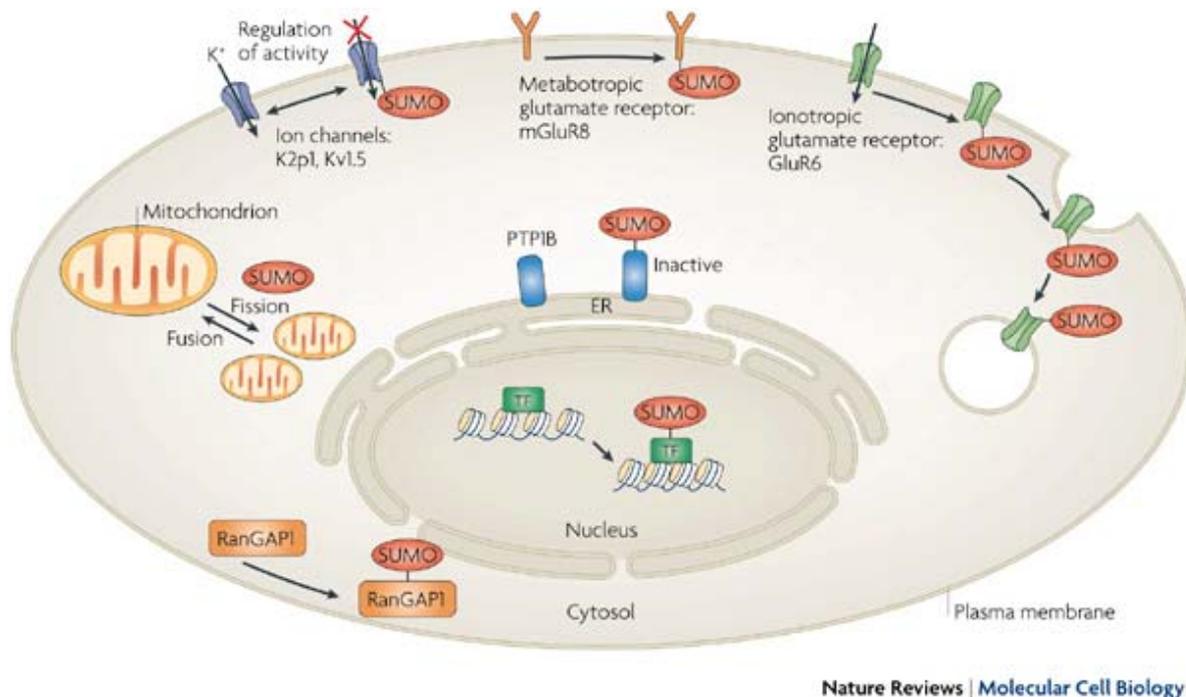


Abbildung 6: Zielproteine der Sumoylierung (aus Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Zahlreiche zelluläre Proteine in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten, wie dem Zellkern, der Plasmamembran, dem ER und dem Zytoplasma, fungieren als Zielproteine der Sumoylierung. In Anlehnung an die im Titel zur Abbildung 6 zitierten Publikation sollen im Zusammenhang mit der hier vorgelegten Arbeit die in der Plasmamembran lokalisierten Ionenkanäle, K2P1 und Kv1.5, genannte sein. Deren Aktivität scheint nach Sumoylierung abzunehmen. Im Falle des Glutamaterezeptors GluR6 bewirkt die Sumoylierung die Internalisierung des Rezeptors, die mechanistisch unverstanden ist. Bislang völlig unbekannt ist der Effekt auf den metabotropen Glutamaterezeptor mGluR8.

2.8.2 Die Sumoylierung von Plasmamembranproteinen

Als erster Kandidat für die Sumoylierung eines Membranproteins wurde der Kaliumkanal K2P1 beschrieben (Rajan et al., 2005). Nach den dort vorgelegten Daten führt quantitative Sumoylierung zu einem inaktiven Zustand des Kanals. Feliciangeli et al. (2007) konnten dagegen weder die quantitative Sumoylierung von K2P1 zeigen, noch das bei Rajan et al. (2005) identifizierte SUMO-Motiv verifizieren. Im Gegenteil behaupten die Autoren, dass eher die negative Ladung des anstelle des Lysins eingeführten Glutamates die beobachteten Effekte in einem nicht-typischen SUMO-Motiv verursachte (s.a. Diskussion).

Allerdings wurde auch für den spannungsabhängig regulierten Kaliumkanal Kv1.5 eine reversible Sumoylierung beschrieben (Benson et al., 2007). Darin sind zwei

konservierte zytoplasmatisch lokalisierte SUMO-Motive im Membran-proximalen Abschnitt von Kv1.5 identifiziert worden. Deren Funktionalität wurde durch verschiedene biochemische Analysen erhärtet. So konnte Bindung von Ubc9 und SUMO 1, 2 und 3 an die SUMO-Motive demonstriert werden. Die SUMO-spezifische Protease SENP2 bewirkte die Dekonjugation von SUMO *in vivo* und *in vitro*. Mutation der SUMO-Motive oder Expression von SENP2 führten zu einer selektiven Hyperpolarisation. Des Weiteren tragen weitere α -Untereinheiten des Kv-Kanals, wie z.B. Kv1.1 und Kv1.2 die für Kv1.5 beschriebenen SUMO-Motive an analoger Stelle. Die Sumoylierung der Kainatrezeptoruntereinheit GluR6 erfolgt als Antwort auf die Anwesenheit von Kainat und scheint eine Voraussetzung für die nachfolgend eintretende Rezeptor-vermittelte Endozytose zu sein (Martin et al., 2007). Dieser Befund ist insofern interessant, als dass hier ein Zusammenhang zwischen der Sumoylierung und der Rezeptor-vermittelte Endozytose hergestellt wird.

Für den metabotropen Glutamatrezeptor 8 (mGluR8) wurde auch ein konserviertes SUMO-Motiv identifiziert und mittels spezifischer Mutagenese des Lysins und *in-vivo*-Rekonstitution in HEK293-Zellen verifiziert (Tang et al., 2005). Die Funktion der Sumoylierung für mGluR8 ist hier nicht bekannt. In diesem Fall und für das Membranprotein Phosphoducin konnten die sumoylierten Formen nur in transfizierten HEK293- und COS-7-Zellen in Gegenwart überexprimierten Ubc9 und SUMO 1 nachgewiesen werden (Klenk et al., 2006).

Letztlich ist gezeigt worden, dass Ubc9 mit den Glukosetransportern 1 und 4 interagieren kann, wobei dieser Nachweis im Yeast-2-Hybridsystem geführt wurde (Giorgino et al., 2000). Für GLUT 4 ist mittlerweile die physiologische Rolle von Ubc9 bestätigt worden, ohne dass aber eine direkte Sumoylierung der Glukosetransporter demonstriert worden ist.

Eine verallgemeinerbare Schlussfolgerung bezüglich der Funktion der Sumoylierung für die Regulation von Plasmamembranproteinen ist derzeit nicht möglich. Um so interessanter war es der Frage nachzugehen, ob und wenn, welche Rolle die beiden im CFTR-Protein identifizierten konservierten SUMO-Motive wahrnehmen. Insbesondere stellt sich natürlich die Frage nach deren Funktionalität im Zusammenhang mit der Synthese, dem Transport und der Reifung von CFTR. Diesen Fragen wurde im Rahmen der Arbeit im Einzelnen nachgegangen.

3. Aufgabenstellung

Grundlage der Arbeit waren Publikationen, die SUMO-Motive in Transmembranproteinen, wie den Kaliumkanälen K2P1 (*potassium leak channel*) oder Kv1.5 (*voltage-gated potassium (Kv) channel*), nachwiesen. Die Aktivität dieser Kanäle war nach Sumoylierung reduziert. So konnte für K2P1 gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Sumo-Motivs einen Kaliumstrom bewirkt, d.h. Sumoylierung des K2P1-Kanals den Kaliumtransport negativ reguliert (Rajan et al., 2005). Die Sumoylierung des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.5 stellt womöglich einen Regulationsmechanismus dar, der die elektrische Erregbarkeit von z.B. Herzmuskelzellen steuern kann (Benson et al., 2007). Entsprechend dieser Beobachtungen war es interessant, einer möglichen Funktion der Sumoylierung in der Regulation der CFTR-Aktivität nachzugehen.

Dazu sollten mögliche SUMO-Motive in der CFTR-Proteinsequenz identifiziert werden und der Nachweis der Sumoylierung des CFTR-Proteins *in vitro* und *in vivo* erbracht werden. Zunächst sollte die Verifikation der mittels Sequenzvergleich gefundenen SUMO-Motive mit einem gerichteten *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz erfolgen und bei positivem Ergebnis mittels Immunpräzipitation im Säugerzellsystem bestätigt werden. Es war dann geplant, die SUMO-Motive zu inaktivieren, um zu demonstrieren, dass die Sumoylierung spezifisch an dem beschriebenen Motiv erfolgt.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob und wie sich die Sumoylierung von CFTR auf einzelne Schritte bei der Synthese, der Reifung und beim Transport auswirkt.

4. Ergebnisse

4.1 CFTR besitzt zwei hoch konservierte SUMO-Motive

Proteine, die sumoyliert werden, tragen eine spezifische Erkennungssequenz, ein SUMO-Motiv. Daher wurde zunächst nach entsprechenden SUMO-Motiven in der CFTR-Aminosäuresequenz gesucht. Mittels einer Motivsuche konnten zwei SUMO-Motive im intrazellulären Bereich von CFTR identifiziert werden, von denen eines in der NBD-1 an Position 447 (bezogen auf das Lysin) und das andere Motiv am C-terminalen Ende an Position 1468 lokalisiert werden konnte (Abbildung 7). Das in der Literatur am häufigsten beschriebene SUMO-Motiv entspricht dem ΨKxE -Typ und wird in zahlreichen Proteinen gefunden (Sampson et al., 2001; Song et al., 2004; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Mit vier Aminosäuren kommt das SUMO-Motiv statistisch gesehen zufällig alle 1200 AS vor. Daher war es interessant zu untersuchen, ob die beiden Sumo-Motive im CFTR-Protein auch in der CFTR-Sequenz anderer Spezies enthalten und konserviert sind.

Es konnte mittels Sequenzvergleichen gezeigt werden, dass die bislang beschriebenen SUMO-Motive in hoch konservierten Proteindomänen liegen und über viele taxonomische Klassen hinweg gut konserviert sind (Abbildung 7). Interessanterweise lässt sich das in der NBD-1 liegende SUMO-Motiv im CFTR der Maus nicht finden. Dagegen ist es im CFTR des Hundshai, der phylogenetisch weiter vom Mensch entfernt ist, präsent.

Das am C-terminalen Ende lokalisierte SUMO-Motiv zeigt eine geringere Konservierung im Vergleich zu dem in der NBD-1-Domäne gelegenen Motiv. So besitzen z.B. weder *Xenopus* noch Hundshai dieses SUMO-Motiv an entsprechender Position.

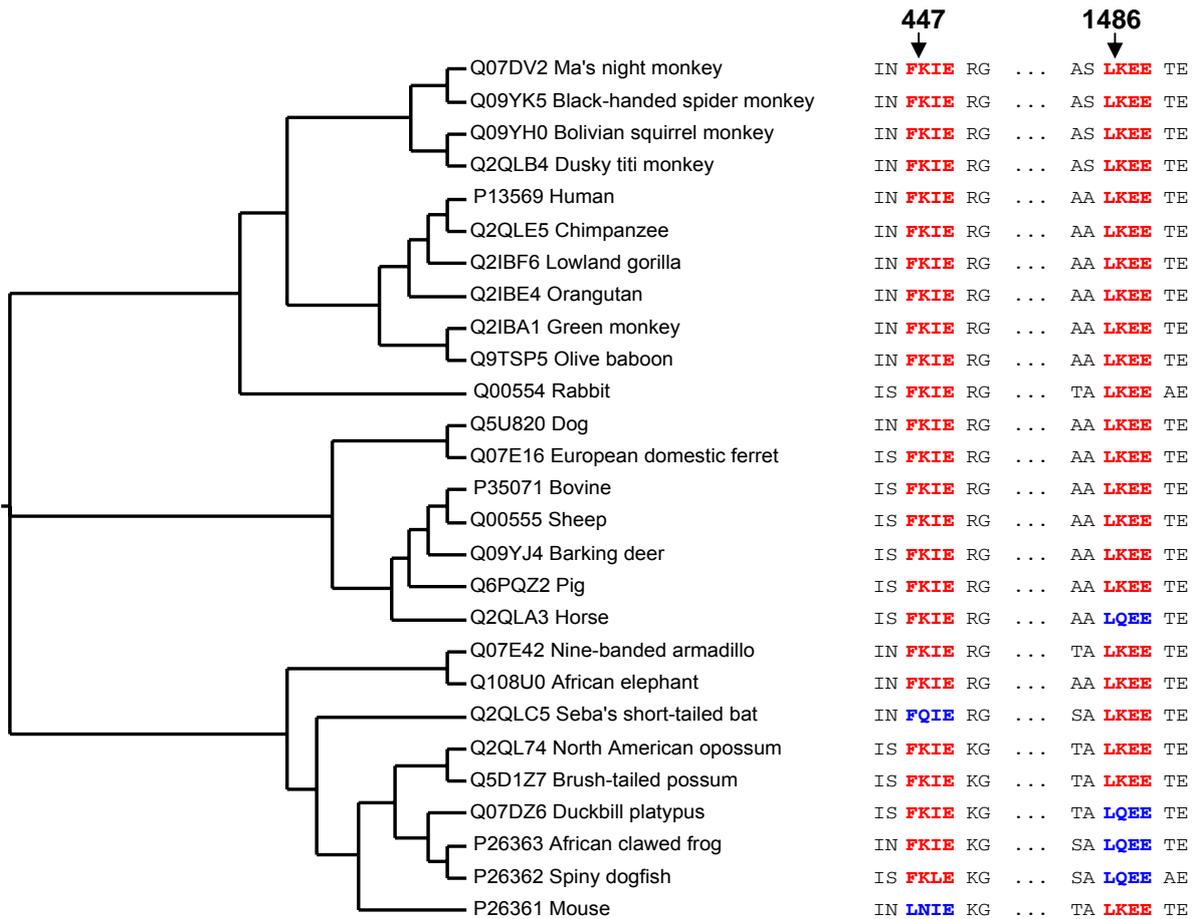


Abbildung 7: Vergleich der Aminosäureabfolge der beiden im CFTR identifizierten SUMO-Motive in 27 unterschiedlichen Spezies.

Der Vergleich der Aminosäureabfolge in den verschiedenen SUMO-Motiven belegt die Existenz zweier SUMO-Motive im CFTR, die zwischen den verschiedenen taxonomischen Gruppen hoch konserviert erscheinen. Das zentrale Lysin, welches als Akzeptorstelle für die Bindung an die SUMO-Proteine fungiert, ist an der entsprechenden Position im jeweiligen Sumo-Motiv mit einem Pfeil markiert. Die konservierten Aminosäuren sind rot markiert, die nicht konservierten Aminosäuren sind in blau dargestellt.

4.2 Konzeption und Klonierung verschiedener SUMO-Motiv tragende CFTR Domänenkonstrukte

Zur funktionalen Charakterisierung der SUMO-Motive wurden die für das SUMO-Motiv kodierenden Abschnitte kloniert, exprimiert und auf Assoziation mit Ubc9 untersucht. Die Untersuchungen fanden im sog. *Yeast-Two-Hybrid-System* (Y2H) statt, welcher zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion dient. Dafür wurden CFTR-Konstrukte eingesetzt, die in diesem experimentellen Ansatz als *bait* („Köder“)

Weiterhin wurde in CFTR-IC, Δ F508-IC und CFTR-NBD2 das jeweilige SUMO-Motiv mutiert, welches zu den Konstrukten CFTR-IC[K447D], Δ F508-IC[K447D] und CFTR-NBD2[K1486] führte. Dabei wurde das zentrale Lysin durch eine Asparaginsäure ausgetauscht. Wie in der Einleitung beschrieben, folgt der durch den E1-Komplex (Aos1/Uba2) katalysierten Aktivierung von SUMO die Konjugation an E2 (Ubc9) und schließlich die direkte Bindung von Ubc9 an das Zielprotein mit Transfer von SUMO auf den Lysinrest im SUMO-Motiv (unter möglicher Mitwirkung der E3-Ligase). Danach sollte eine durch Mutation herbeigeführte Inaktivierung des SUMO-Motivs zu einem Verlust der Bindung von Ubc9 führen.

4.3 Ubc9 interagiert mit SUMO-Motiv tragenden CFTR-Domänen

4.3.1 Identifikation der Interaktion von SUMO-Motiv tragenden CFTR-Domänen und Ubc9 im Y2H

Die Blaufärbung der Hefekolonie in Abbildung 9 zeigt eine Interaktion zwischen Ubc9 und der Intrazellulärdomäne des CFTR-Proteins (CFTR-IC), der Intrazellulärdomäne der Δ F508 CFTR-Variante (Δ F508-IC) und dem C-terminalen Bereich von CFTR, welcher die NBD-2 trägt (CFTR-NBD2). Ebenso interagiert Ubc9 mit dem *nuclear factor of activated T cells 1* (NFAT-1). NFAT-1 ist ein bekannter Transkriptionsfaktor und ist als SUMO-Substrat beschrieben, welches hier als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Terui et al., 2004). Sowohl das N-terminale CFTR-Konstrukt, wie auch die CFTR-Konstrukte, die SUMO-Motiv-Mutation tragen (CFTR-IC[K447D], CFTR-NBD2[K1468D]), zeigen keine Interaktion mit Ubc9. Eine schwache Blaufärbung ist für Δ F508-IC[K447D] zu erkennen und deutet damit auch eine Interaktion mit Ubc9 an.

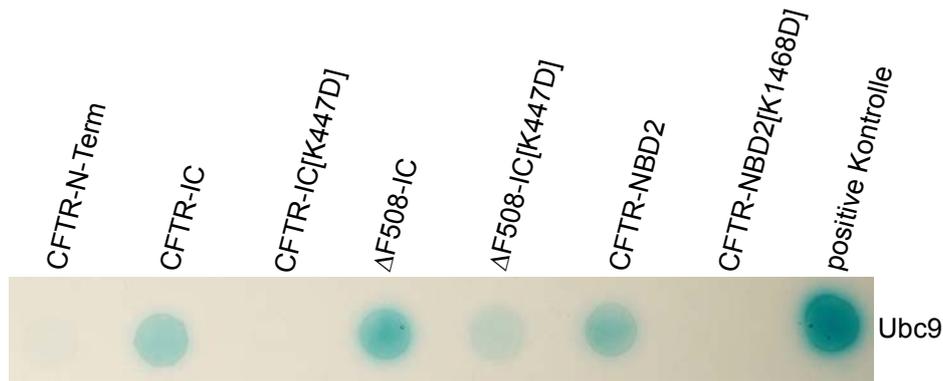


Abbildung 9: Interaktion von Ubc9 mit unterschiedlichen CFTR-Domänen.

Das Ubc9-exprimierende pGBKT7-Ubc9-Plasmid (Köder-Plasmid) und die CFTR-Domänen-exprimierenden pGADT7-Konstrukte (Beute-Plasmide) wurden jeweils in AH-109-Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) parallel transformiert, ausgesät und bis zur Koloniebildung inkubiert. Anschließend wurden mehrere Hefekolonien von der Inkubationsplatte gepickt und nachfolgend auf eine mit X- α -Gal beschichtete Agarplatte aufgestempelt.

Interagierende Proteindomänen werden im Y2H durch Blaufärbung der Hefekulturen sichtbar. Nur im Falle der Interaktion der eingesetzten Proteindomänen wird der Promotor für die α -Galaktosidase aktiviert, ein sekretorisches Enzym, das bei der Umsetzung von X- α -Gal einen Farbumschlag von weiß zu grün-blau hervorruft. Diese Methodik wird beim kolorimetrischen Nachweis für die Expression des Gens genutzt.

Abhängig von dem Vorhandensein eines intakten SUMO-Motivs zeigen die eingesetzten CFTR-Domänenkonstrukte eine Interaktion mit Ubc9. Im Gegensatz zu CFTR-IC[K447D] zeigt Δ F508-IC[K447D] einen Hinweis auf Interaktion mit Ubc9. Dabei sollte bedacht werden, dass die isolierten Domänen eine von der nativen CFTR-Struktur abweichende Konformation einnehmen können, was zu nicht konsistenten Resultaten im Vergleich mit kompletten CFTR-Konstrukten führen kann, welche die gesamte Länge des CFTR-Proteins abbilden.

4.3.2 Analyse der Interaktion von komplettem CFTR und Ubc9 in CHO-Zellen

Zur Bestätigung des im Y2H erbrachten Hinweises auf Assoziation zwischen Ubc9 und den SUMO-Motiven von CFTR wurde der experimentelle Nachweis mittels Co-Immunopräzipitation im Zelllysate von CHO-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie exprimiert endogenes Ubc9, aber kein endogenes CFTR. Damit dient sie als System zur heterologen Rekonstitution der Assoziation der SUMO-Motive im CFTR mit Komponenten des SUMO-Systems durch Transfektion mit humanen CFTR-Konstrukten. Für das Experiment sind CHO-Zellen benutzt worden, die stabil transfiziertes CFTR exprimierten. Außerdem wurde in den SUMO-Motiven mutiertes

CFTR in den Expressionsvektor pcDNA/HISc kloniert und die folgenden CFTR-Konstrukte erhalten, CFTR[K447D], CFTR [K1468D] und CFTR[K447D+K1468D]. Die auf diese Weise erhaltenen Expressionsvektoren wurden mittels des Transfektionsreagenzes FuGENE-HD transient in CHO-Zellen transfiziert.

Der an *G-Beads* gekoppelte CFTR-spezifische Antikörper immunpräzipitiert CFTR, welches anhand der korrespondierenden Banden (B- und C-Bande) im Westernblot erkennbar wird. Die mit einem Ubc9-spezifischen Antikörper nachgewiesene Immunpräzipitation zeigt das mit CFTR assoziierte Ubc9 (Abbildung 10). CFTR[K447D], CFTR[K1468D] und CFTR [K447D+K1468D] weisen keine Ubc9-Bande auf und ergeben keinen Hinweis auf eine Interaktion mit Ubc9.

Zur Kontrolle bestätigt der Westernblot der fünf Lysate, dass in allen Fällen endogenes Ubc9 vorhanden ist. Die Expressionskontrolle zeigt weiterhin bei Detektion mit CFTR-spezifischen Antikörpern die typische unreife (140 kDa) B- und die reife (170 kDa) C-Form des CFTR. Dagegen fehlt bei CFTR[K447D], CFTR [K1468D] und CFTR[K447D+K1468D] die C-Bande bzw. ist bestenfalls nur extrem schwach nachweisbar. Im Wesentlichen ist hier nur die B-Bande detektierbar. Die Mock-Kontrolle belegt, dass die verwendeten CHO-Zellen über kein nachweisbares endogenes CFTR verfügen. Die Ladekontrolle mit Nachweis von Caveolin zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden.

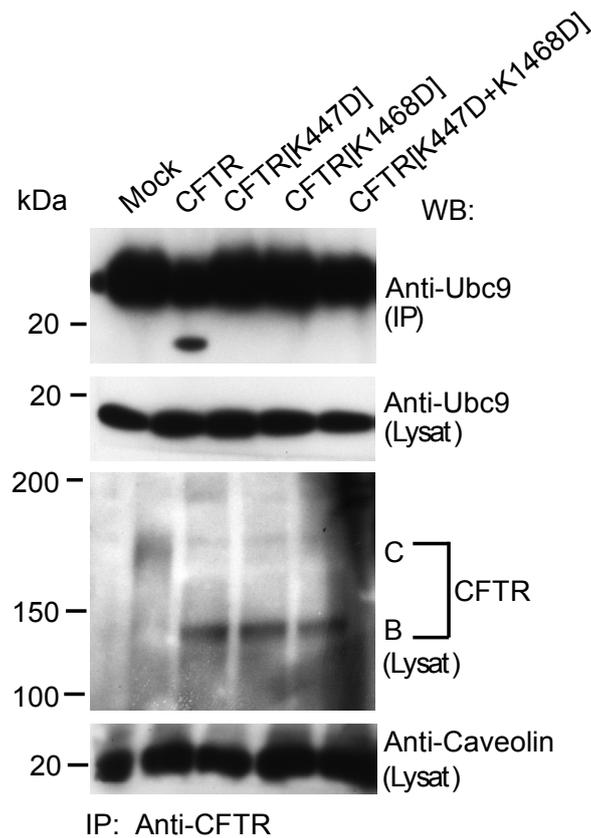


Abbildung 10: Ubc9 bindet in CHO-Zellen an CFTR.

CHO-Zellen wurden mit dem CFTR-exprimierenden pcDNA/HISc-Plasmid sowie CFTR[K447D+K1486D], CFTR[K447D], und CFTR[K1486D], transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Eismann-Puffer lysiert. Für die Immunpräzipitation wurden CFTR-spezifische Antikörper an *G-Beads* gekoppelt und die gewonnenen Immunpräzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot mittels eines Ubc9-spezifischen Antikörpers analysiert.

Die mit dem kompletten CFTR erhaltenen Resultate bestätigen damit die mittels der CFTR-Domänen im Y2H gemachten Beobachtungen einer direkten Interaktion von CFTR mit Ubc9. CFTR[K447D], CFTR[K1468D] und CFTR[K447D+K1468D], zeigen keine nachweisbare Interaktion mit Ubc9.

4.3.3 Analyse der Interaktion von $\Delta F508$ mit Ubc9 in CHO-Zellen

Analog zur Untersuchung der Interaktion von CFTR mit Ubc9 in CHO-Zellen wurde $\Delta F508$ mittels CFTR-spezifischer Antikörper immunpräzipitiert und im Westernblot mit auf co-immunopräzipitiertes Ubc9 hin analysiert. Die Co-Immunopräzipitation von $\Delta F508$ [K447D+K1468D] erbrachte keinen Hinweis auf eine Interaktion mit Ubc9 und

war damit konsistent mit den Beobachtungen, die an CFTR gemacht worden waren (Abbildung 11). $\Delta F508$ dagegen ist mit Ubc9 assoziiert in der Immunpräzipitation detektierbar. $\Delta F508$, $\Delta F508[K447D]$, $\Delta F508[K1468D]$, $\Delta F508[K447D+K1468D]$ zeigen alle die für unreifes CFTR charakteristische B-Form.

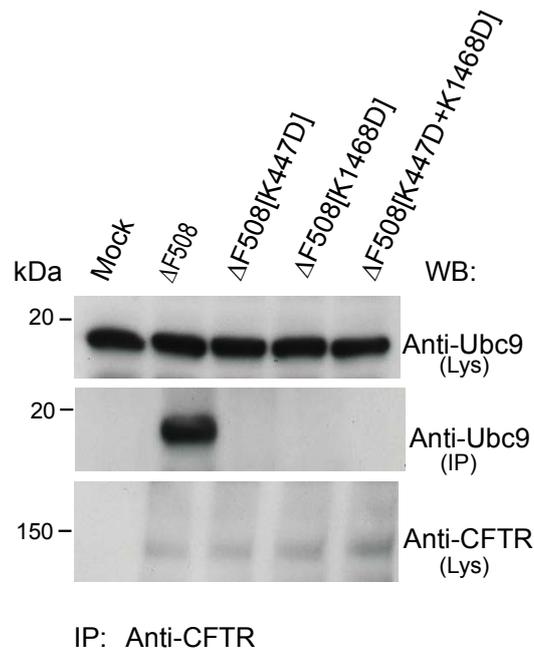


Abbildung 11: Ubc9 bindet $\Delta F508$ *in vivo*.

CHO-Zellen wurden mit dem $\Delta F508$ -exprimierenden pcDNA/HISc-Plasmid sowie $\Delta F508[K447D+K1486D]$, $\Delta F508[K447D]$, und $\Delta F508[K1486D]$, transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit TNT-Lysis-Puffer lysiert. Jeweils 30 μ l der gewonnenen Lysate wurde für die Expressionskontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression im Westernblot mittels spezifischer CFTR- oder Ubc9-Antikörpern nachgewiesen (oberer und unterer Westernblot). Die Immunpräzipitation der Zelllysate mit CFTR-spezifischen Antikörpern erfolgte bei 4°C ÜN und wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot mittels spezifischer Ubc9-Antikörpern das gebundene Ubc9 detektiert.

Die Resultate bestätigen damit, dass die $\Delta F508$ -Deletion im CFTR-Gen keinen messbaren Einfluss auf die zu beobachtende Interaktion mit Ubc9 im Vergleich zum intakten CFTR hat. Die Mutationen im SUMO-Motiv von CFTR und $\Delta F508$ zeigen keine nachweisbare Assoziation mit Ubc9.

4.4 Sumoylierung von CFTR *in vitro* und *in vivo*

Die bisherigen Experimente legen nahe, dass SUMO an CFTR bindet, indem eine Assoziation mit einer essentiellen Komponente der Sumoylierungskaskade (Ubc9) demonstriert werden konnte. Durch den Nachweis einer Interaktion zwischen CFTR und SUMO-spezifischem Bindungspartner ist allerdings nur ein indirekter Hinweis auf eine Bindung eines der beschriebenen SUMO-Proteine an eines der beiden SUMO-Motive im CFTR gegeben.

Der Y2H wurde daher erneut eingesetzt, um den Nachweis einer Bindung zwischen einer das SUMO-Motiv tragenden CFTR-Domäne und einer der vier SUMO-Isoformen 1-4 zu detektieren. Es wurden die unter 4.3.1. (Abbildung 8) beschriebenen CFTR-Konstrukte erneut als *bait* eingesetzt, d.h. CFTR-N-Term, CFTR-IC, Δ F508-IC und CFTR-NBD2.

Weiterhin wurden die den SUMO-Isoformen entsprechende DNA-Sequenzen in den Y2H-*fish*-Vektor pGBKT7 kloniert.

4.4.1 Analyse der Interaktion von verschiedenen CFTR- und Δ F508-Domänen mit SUMO 1-4 im Y2H

Der Y2H zeigt auch hier, wie im Falle des Nachweises der Interaktion mit Ubc9 (4.3.1.), kein Signal mit CFTR-N-Term. Dagegen wurde eine Interaktion zwischen SUMO 3 und 4 mit CFTR-IC anhand der erhaltenen Signale experimentell belegt. Im Gegensatz zum CFTR zeigt die IC-Domäne von Δ F508 mit allen vier SUMO-Isoformen ein deutlich positives Signal. CFTR-NBD2, das für CFTR und Δ F508 gleich ist, zeigt mit SUMO 3 wie auch mit SUMO 4 eine Blaufärbung (Abbildung 12).

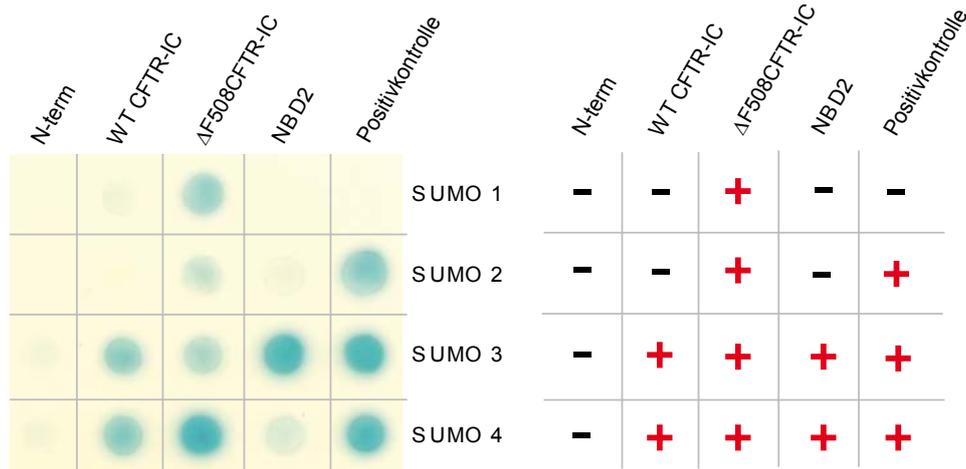


Abbildung 12: Y2H zur Demonstration der Bindung von SUMO an CFTR.

Der Y2H wurde analog zu der in Abbildung 9 skizzierten Vorgehensweise durchgeführt. Es wurden die in Abbildung 8 beschriebenen CFTR-Konstrukte als *bait* im pGADT7-Vektor eingesetzt. Die vier SUMO-Isoformen wurden in den pGBKT7 als *fish* im Y2H eingesetzt. NFAT-1 wurde als Kontrolle genutzt und zeigt die in der Literatur beschriebene Protein-Protein Interaktion mit SUMO 2, SUMO 3 und SUMO 4.

Die obigen Beobachtungen belegen, dass eine direkte Assoziation zwischen den SUMO-Proteinen und den untersuchten CFTR- und $\Delta F508$ -Domänen stattfindet.

4.4.2 Analyse der Interaktion von CFTR mit SUMO 1-4 in CHO-Zellen

Zur Bestätigung der im Y2H-System erzielten Resultate wurden CHO-Zellen, die mit dem kompletten CFTR-Vektor stabil transfiziert waren, mit den Plasmiden für die relevanten SUMO- Interaktionskomponenten (SUMO 1-4, Ubc9) transient transfiziert. Dazu sind die für das jeweilige komplette SUMO 1-4 codierenden Sequenzen in den Expressionsvektor pcDNA/HISc kloniert worden, dadurch erhalten die exprimierten SUMO-Proteine eine N-terminale Markierung (*Xpress-Tag*), gegen welche spezifische Antikörper zum Nachweis des die Markierung tragenden Fusionsproteins eingesetzt wurden. Die komplette Ubc9- kodierende Sequenz ist in den pFLAG-CMV-6a-Vektor kloniert worden.

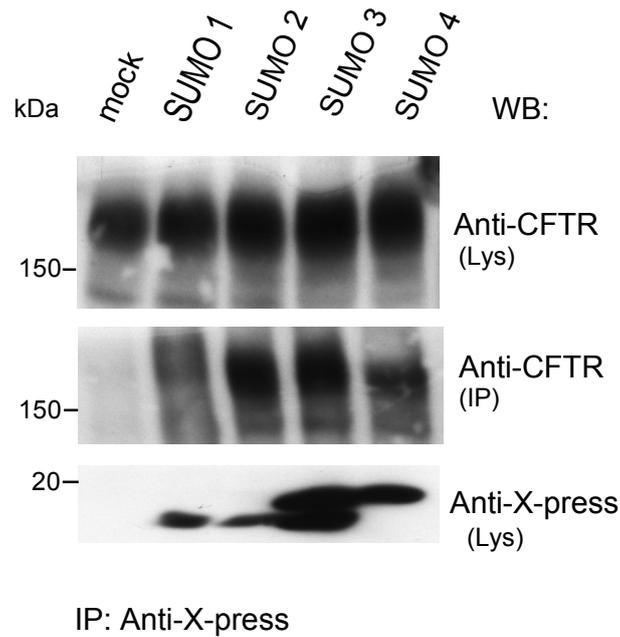


Abbildung 13: Immunpräzipitation der vier transfizierten SUMO-Isoformen 1-4 in CFTR- und Ubc9-exprimierenden CHO-Zellen.

CHO-Zellen sind mit einem CFTR-exprimierenden Vektor stabil transfiziert worden. Die auf diese Weise erhaltenen CHO-Zellen exprimieren CFTR ohne Markierung.

Die CFTR-exprimierenden CHO-Zellen wurden jeweils mit einem der für die vier SUMO-Isoformen codierenden Expressionsvektor pcDNA/HISc und einem für das Ubc9-codierenden Expressionsvektor pFLAG-CMV-6a transient co-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit TNT-Lysis-Puffer lysiert. Jeweils 30 µl der gewonnenen Lysate wurde für die Expressionskontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Expression im Westernblot mittels spezifischer CFTR- oder Xpress-Antikörper nachgewiesen (oberer und unterer Westernblot). An Beads-gekoppelte Xpress-spezifische Antikörper wurden zur Co-Immunpräzipitation der SUMO-Proteine eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte bei 4°C ÜN und wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit CFTR-spezifischen Antikörpern erfolgte der Nachweis von CFTR im Lysat und in den Co-Immunpräzipitaten.

Im Gegensatz zu dem in Abbildung 12 skizzierten Y2H-Experiment, in welchem nur CFTR-Domänen eingesetzt werden konnten, gestattet die Verwendung des CFTR-exprimierender CHO-Zellen die Co-Immunpräzipitation aller vier SUMO-Proteine mit CFTR und bestätigt damit eine Assoziation von CFTR und SUMO-Proteinen.

4.4.3 Analyse der Interaktion von CFTR mit SUMO-Proteinen in T84-Zellen, die endogenes CFTR und alle vier SUMO-Isoformen exprimieren

Die Überexpression von Proteinen erhöht grundsätzlich das Risiko einer unspezifischen Reaktion. Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Experimenten auf die humane Pankreaszelllinie T84 zurückgegriffen, welche sowohl endogenes CFTR als auch alle 4 SUMO-Isoformen exprimiert.

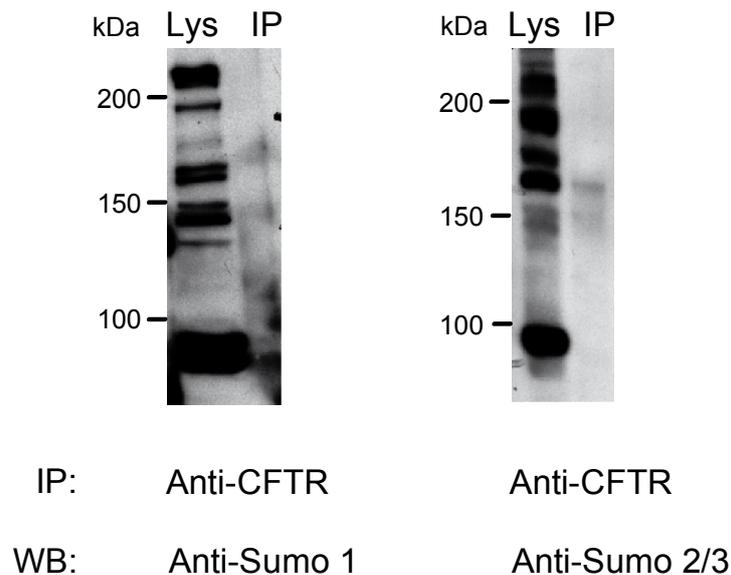


Abbildung 14: Immunpräzipitation von CFTR mit SUMO-spezifischen Antikörpern in CFTR-exprimierenden T84-Zellen.

T84 ist eine humane Pankreaszelllinie, die endogenes CFTR exprimiert. T84-Zellysate sind mit CFTR-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert worden. Mit SUMO-Isoform-spezifische Antikörpern, die entweder gegen SUMO 1 gerichtet sind (Anti-SUMO 1) oder beide SUMO-Isoformen detektieren (Anti-SUMO 2/3) wurden die mit CFTR co-immunopräzipitierten SUMO-Isoformen im Westernblot detektiert.

Die Immunpräzipitation in der T84-Linie wurde mit CFTR-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zur nachfolgenden Detektion wurden SUMO-1- und SUMO- 2/3-spezifische Antikörper eingesetzt. Ein SUMO-4-spezifischer Antikörper ist bislang noch nicht erhältlich. Der SUMO-2/3-spezifische Antikörper erkennt sowohl SUMO 2 wie auch SUMO 3, da diese SUMO-Isoformen eine starke Homologie aufweisen und der Antikörper gegen strukturhomologe Bereiche generiert worden ist (Gong et al., 1997; Saitoh and Hinchey, 2000). Im Lysat (Lys) detektieren SUMO-1- wie auch SUMO-2/3-spezifischer Antikörper eine Vielzahl von Banden, die sumoylierte

zelluläre Proteine repräsentieren. In der Immunpräzipitation (IP) mit dem SUMO-1-spezifischen Antikörper und dem SUMO-2/3-spezifischen Antikörper konnte ein Signal in der Laufhöhe des reifen und des nur teilglykosylierten CFTR bei 170 kDa bzw. 140 kDa erhalten werden (Abbildung 14).

4.4.4 Analyse der Interaktion von $\Delta F508$ mit den SUMO-Proteinen in CFPAC1-Zellen, die endogenes $\Delta F508$ exprimieren

Analog zu 4.4.3. sind hier sog. CFPAC1 Zellen eingesetzt worden, die eine immortalisierte Bronchialepithelzelllinie eines homozygoten $\Delta F508$ CF-Patienten präsentieren. Diese Zellen exprimieren endogenes $\Delta F508$ und alle vier SUMO Isoformen.

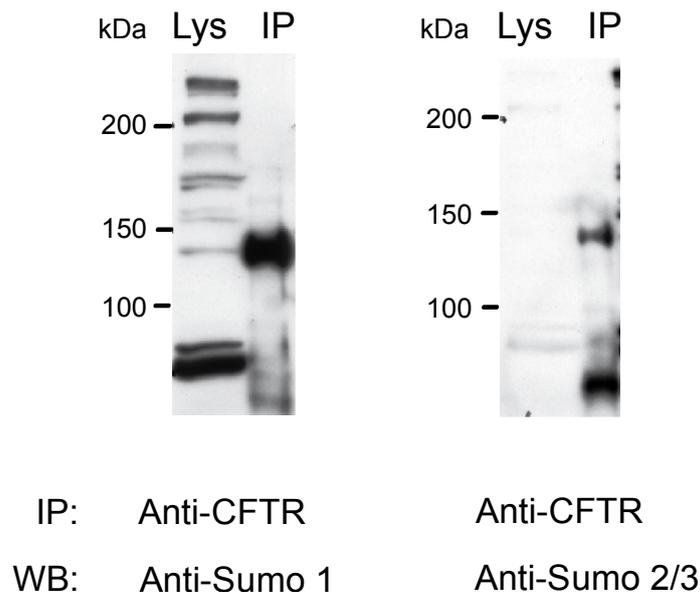


Abbildung 15: Immunpräzipitation von $\Delta F508$ mit SUMO-spezifischen Antikörpern in $\Delta F508$ -exprimierenden CFPAC1-Zellen.

CFPAC1 ist eine immortalisierte Bronchialepithelzelllinie eines homozygoten $\Delta F508$ CF-Patienten, die endogenes $\Delta F508$ exprimiert. Die Vorgehensweise entspricht dem in Abbildung 14 skizzierten Ablauf. Als Resultat ergibt sich nach Immunpräzipitation mit CFTR-spezifischen Antikörpern und Detektion mit SUMO-Isoform-spezifischen Antikörpern, der Nachweis der unvollständig glykosylierten $\Delta F508$ -B-Form, die bei 140 kDa lokalisiert ist.

SUMO-1 und SUMO-2/3-spezifische Antikörper detektieren beide $\Delta F508$ in den mit CFTR-spezifischen Antikörpern gewonnenen Immunpräzipitaten und lassen damit

auf eine Assoziation von $\Delta F508$ mit den entsprechenden SUMO Isoformen schließen (Abbildung 15).

Die bisherigen Experimente sind mit der Schlussfolgerung konsistent, dass es zu einer spezifischen Bindung der SUMO-Proteine 1-3 an das SUMO-Motiv von CFTR und $\Delta F508$ kommt und damit das SUMO-Motiv funktional ist.

Zur weiteren Erhärtung dieser Beobachtung wurden nun zunächst Mutationen in die SUMO-Motive verschiedener bereits unter 4.3.1 und 4.4.1 beschriebener CFTR-Domänen eingeführt, mit der Erwartung, dass es zu keiner Assoziierung von SUMO-Proteinen und diesen CFTR-Domänen kommt.

4.4.5 Analyse der Interaktion verschiedener CFTR- und $\Delta F508$ -CFTR-Domänen mit den SUMO-Proteinen 1-4

Zur Durchführung der Experimente sind in den CFTR- und $\Delta F508$ -Y2H-Konstrukten im jeweiligen SUMO-Motiv, wie unter 4.2 beschrieben, die spezifischen Mutationen eingeführt worden.

Das Ergebnis aus dem Y2H, welcher analog zu den unter Abschnitt 4.2. dargelegten Experimenten durchgeführt wurde, zeigt keinen Hinweis auf Assoziierung der Intrazellulärdomäne von CFTR und von CFTR-NBD2 mit einer der vier SUMO-Isoformen, wenn das entsprechende SUMO-Motiv mutiert war (CFTR-IC[K447D], CFTR-NBD2[K1468D]). Eine mögliche Interaktion von $\Delta F508$ -IC[K447D] mit einem der SUMO-Proteine, wie in Abbildung 9 für die Assoziation mit Ubc9 gezeigt, konnte hier nicht demonstriert werden.

Die in Abbildung 16 erkennbaren Farbsignale zeigen eine Assoziation der CFTR-IC mit den SUMO-Proteinen 3 und 4, wogegen CFTR-NBD2 nur mit SUMO 4 assoziiert erscheint, wogegen $\Delta F508$ -IC mit allen vier SUMO-Isoformen assoziiert.

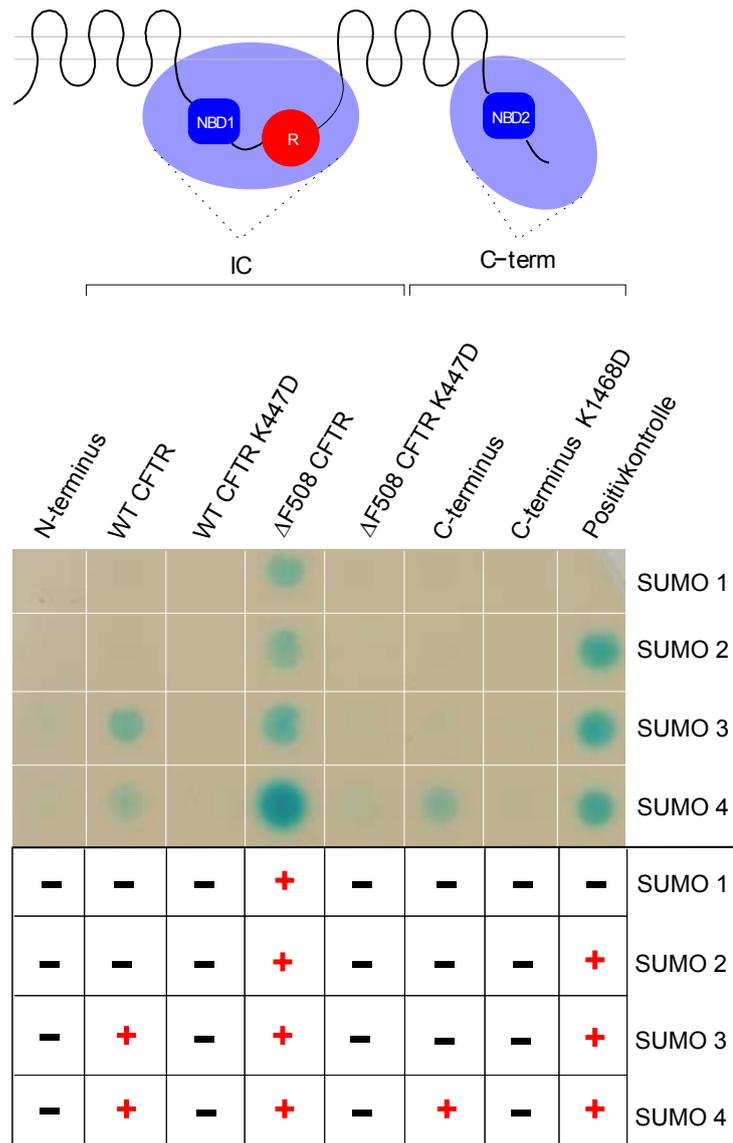


Abbildung 16: Analyse der Interaktion intakter und im SUMO-Motiv mutierter CFTR- und ΔF508-Domänen mit den SUMO-Proteinen 1-4 im Y2H.

Es wurden die in Abbildung 8 beschriebenen CFTR- und ΔF508-CFTR-Domänen, die in einem SUMO-Motiv mutiert sind, als *bait* im pGADT7 Vektor eingesetzt. Als *fish* wurden die entsprechenden SUMO-Isoformen 1-4 in den pGBKT7 eingesetzt. Eine Interaktion der beteiligten Proteine stellt sich im Y2H durch Blaufärbung der Hefekulturen dar.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Funktionalität der in der CFTR-Sequenz identifizierten SUMO-Motive demonstrieren eine Interaktion des kompletten CFTR-Proteins mit Ubc9 und verschiedenen SUMO-Proteinen und zwar in allen zum Einsatz gekommenen experimentellen Nachweissystemen. Diese grundsätzliche Schlussfolgerung gilt auch für ΔF508.

Die im Y2H-System erhaltenen Daten bestätigen auf der Ebene isolierter Domänen die Eigenschaft der identifizierten SUMO-Motive, mit der Sumoylierungskomponente

Ubc9 und den verschiedenen SUMO-Proteinen 1-4 interagieren zu können. Der Nachweis aller vier SUMO-Isoformen war durch eine in den N-terminalen Bereich der SUMO-Proteine eingefügte Markierung möglich, die zur Immunpräzipitation und zur Immundetektion im Westernblot genutzt werden konnte.

Δ F508-IC zeigte eine Bindung aller vier SUMO-Proteine, wogegen CFTR-IC nur eine Assoziation mit SUMO 3 und 4 aufwies. Der CFTR-C-Terminus CFTR-NBD2 assoziiert nur mit SUMO 4. Mutationen in den SUMO-Motiven führten in allen Fällen zu einem Verlust eines positiven Interaktionsnachweises zwischen CFTR und SUMO-Proteinen im Y2H-System. Nur für Ubc9 wurde ein schwacher Hinweis auf Assoziation mit Δ F508-IC[K447D] gefunden, der sich allerdings in Abbildung 16 für eine mögliche Assoziation mit den SUMO-Proteinen so nicht reproduzieren ließ. Die ursprüngliche Beobachtung kann artifizieller Natur sein, bedingt durch einen womöglich kompensatorischen Effekt zweier benachbarter Mutationen in einer isolierten Proteindomäne, deren Faltung in diesem Bereich sehr anfällig gegenüber geringfügigen Veränderungen in der Primärsequenz ist.

Die Rekonstitution der Sumoylierung in CHO-Zellen durch stabile Transfektion der für das CFTR- und Δ F508-codierenden Sequenzen in Gegenwart co-transfizierter Sumoylierungskomponenten, Ubc9 und SUMO 1-4, bestätigen im Säugerzellsystem die im Y2H-System erhaltenen Resultate. Allerdings war insbesondere der Nachweis von stabil transfiziertem Δ F508 sehr schwierig. Ohne gleichzeitige Co-Transfektion von Ubc9 war der Nachweis von Δ F508 nicht möglich. Die gleichzeitige Überexpression der heterolog zu exprimierenden CFTR- und Sumoylierungskomponenten begünstigt unspezifische Reaktionen. Daher wurden nachfolgend Zelllinien eingesetzt, die beide CFTR Proteine endogen exprimierten. Am deutlichsten konnte die Bindung von SUMO-Proteinen an CFTR in Zelllinien gezeigt werden, die das CFTR oder Δ F508 endogen exprimierten. Da ein SUMO-4-spezifischer Antikörper nicht erhältlich war, konnte nur für SUMO 4 keine Bindung an eine der endogen exprimierten Formen belegt werden. Insgesamt bleibt also festzuhalten, dass die in der CFTR-Sequenz gefundenen SUMO-Motive verschiedene SUMO-Proteine binden können und CFTR auf diesem Wege spezifisch sumoyliert werden kann. Im nächsten Schritt wurde die funktionelle Rolle der Sumoylierung für CFTR untersucht.

4.5 Aufglykosylierung und Transport zur Plasmamembran sind abhängig von der Intaktheit der SUMO-Motive im CFTR

4.5.1 Der Transport an die Plasmamembran erfordert intakte SUMO-Motive

Zur weiteren Untersuchung der funktionellen Bedeutung der SUMO-Motive wurde dem Einfluss eines mutierten SUMO-Motivs auf den Transport von CFTR zur Plasmamembran nachgegangen.

Es ist bekannt, dass Synthese, Reifung und Transport von Transmembranproteinen und damit auch von CFTR von mehreren Glykosylierungsschritten begleitet sind. Die ersten Glykosylierungsschritte, die sog. „core“ Glykosylierung, finden im ER statt. Während der Passage durch den Golgi-Apparat erfolgen die weiteren Schritte zur vollständigen Glykosylierung des Proteins, die zum reifen Plasmamembranständigen Glykoprotein führen. Im Wesentlichen können mittels Immundetektion zwei unterschiedliche Glykosylierungsformen von CFTR nach gelelektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden. Man erhält im Zelllysate von CFTR-exprimierenden CHO-Zellen die im Kernbereich glykosylierte Form von CFTR, die als B-Form bezeichnet wird und bei etwa 140 kDa lokalisiert. Dagegen wird das komplett glykosylierte CFTR als sog. reife C-Form bei etwa 170 kDa detektiert (Abbildung 17).

Nach Einführung einer Mutation in beide SUMO-Motive in der CFTR Sequenz und nachfolgender Transfektion in CHO-Zellen sowie Auftrennung im Proteingel, erhält man für CFTR und $\Delta F508$, nach Detektion mit CFTR-spezifischen Antikörpern, keine reife C-Bande mehr. Es wird nur die im Kernbereich glykosylierte B-Bande nachgewiesen.

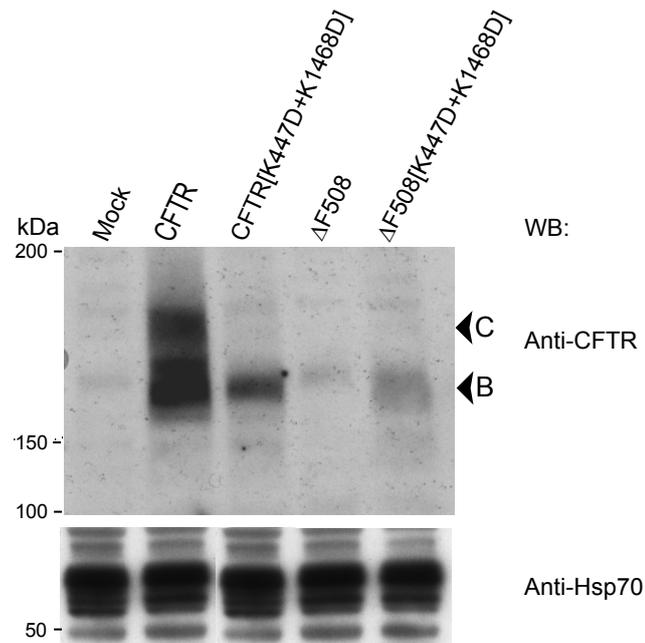


Abbildung 17: Mutationen in den SUMO-Motiven von CFTR bewirken eine unvollständige Glykosylierung von CFTR.

CHO-Zellen wurden mit dem das CFTR- oder $\Delta F508$ -Gen tragenden Expressionsvektor pcDNA/HISc und den beiden Konstrukten, CFTR[K447D+K1486D] und $\Delta F508$ [K447D+K1486D], transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit TNT-Lysis-Puffer lysiert. Die gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot mittels CFTR-spezifischen Antikörpern nachweisen (oberer Teil des Westernblots).

Der Nachweis mit einem Hsp70-spezifischen Antikörper belegt eine Beladung des Proteingels mit vergleichbaren Proteinmengen (unterer Teil des Westernblots).

Die Anwesenheit intakter SUMO-Motive ist demnach zur vollständigen Glykosylierung des reifen 170 kDa großen CFTR erforderlich.

Ein weiterer, von dem in Abbildung 17 dargestellten Experiment unabhängiger und direkter Nachweis membranständiger Glykoproteine ist mittels Biotinylierung der Zellmembranoberflächenproteine möglich.

4.5.2 Biotinylierung der Zellmembranoberfläche ermöglicht den Nachweis von CFTR, nicht jedoch von im SUMO-Motiv mutiertem CFTR

Zur Untersuchung des Einflusses der SUMO-Motive auf die Oberflächenexpression von CFTR wurden CFTR[K447D+K1486D], CFTR{K447D}, und CFTR[K1486D], in MDCK-Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Glukosereste aller membranständiger Glykoproteine mit einem LC-Hydrazid-Biotinrest versehen. Mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* wurden aus dem Zelllysats alle biotinylierten Proteine gefischt. Nach Gelelektrophorese konnte mit CFTR-spezifischen Antikörpern das membranständige CFTR nachgewiesen werden. Damit konnte belegt werden, dass nur das CFTR die Plasmamembran erreichte, nicht jedoch die in den SUMO-Motiven mutierten CFTR-Varianten (Abbildung 18).

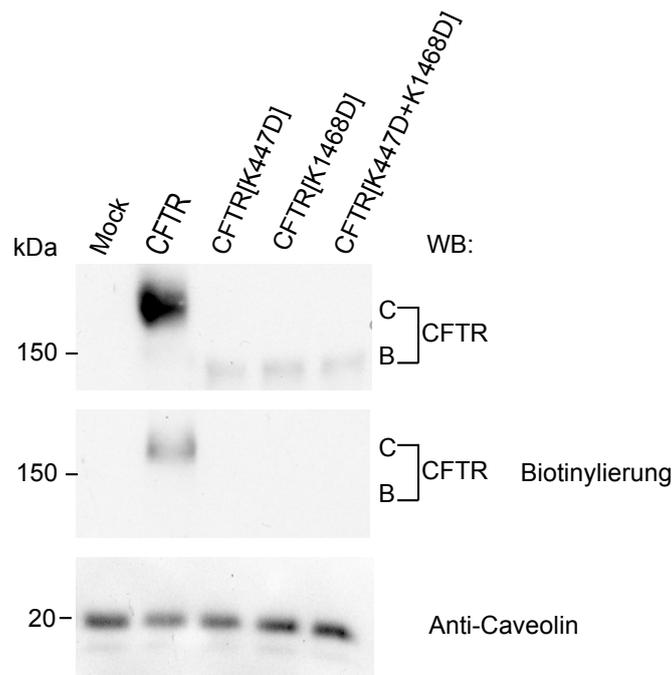


Abbildung 18: Biotinylierung zum Nachweis von CFTR an der Zellmembranoberfläche
 MDCK-Zellen wurden mit dem CFTR-, CFTR[K447D+K1486D]-, CFTR{K447D}-, und CFTR[K1486D]-exprimierenden pcDNA/HISc-Plasmiden, transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Glukosereste aller membranständiger Glykoproteine biotinyliert und nachfolgend mit Streptavidin-*Beads* inkubiert und damit als an Streptavidin-*Beads* gebundene Proteine isoliert. Nach Gelelektrophorese der auf diese Weise gewonnenen Probe konnte mit spezifischen CFTR-spezifischen Antikörpern das membranständige CFTR im Westernblot nachgewiesen werden.

Damit demonstriert die Biotinylierung aller glykosylierter membranständiger Proteine und die nachfolgende Immundetektion von CFTR mit Hilfe CFTR-spezifischer Antikörper, dass intakte SUMO-Motive im CFTR für eine Plasmamembranlokalisation erforderlich sind.

4.5.3 Fluoreszenzmikroskopie belegt die unterschiedliche Lokalisation von CFTR und im SUMO-Motiv mutiertem CFTR

Zum weiteren experimentellen Beleg für die membranständige Lokalisation des CFTR wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dazu wurden CFTR- und CFTR[K447D+K1486D]-exprimierende Plasmide hergestellt, in welchen die CFTR-Sequenz an das grün-fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert wurde und damit den Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie gestattete. Die pGFP-CFTR- bzw. pGFP-CFTR[K447D+K1486D]-Konstrukte wurden transient in die polaren MDCK-Zellen transfiziert. Die konfokale Mikroskopie belegt, dass sich pGFP-CFTR überwiegend an der apikalen Plasmamembran befindet. Das pGFP-CFTR[K447D+K1486D] lokalisiert das nahezu ausschließlich im Zytoplasma und nicht in der apikalen Membran (Abbildung 19).

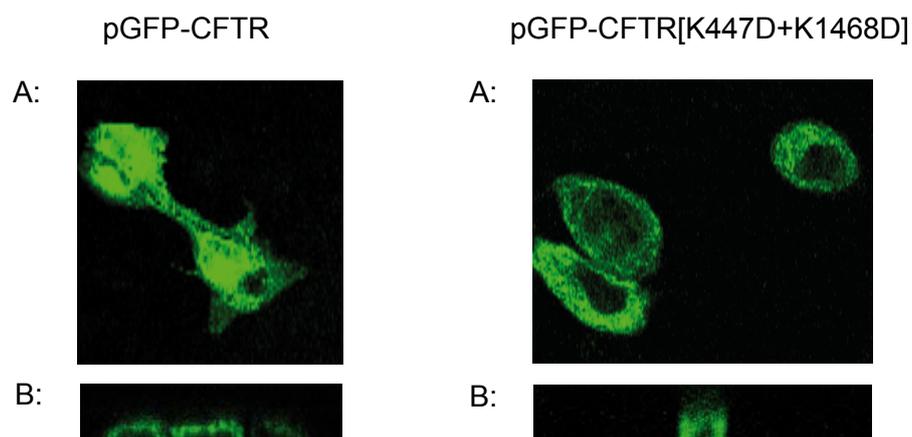


Abbildung 19: Konfokale Mikroskopie zum Nachweis von pGFP-CFTR und pGFP-CFTR[K447D+K1468D] in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen wurden transient mit pGFP-CFTR und pGFP-CFTR[K447D+K1468D]-exprimierenden Plasmiden transient transfiziert, nach 48 h fixiert und per konfokaler Mikroskopie ausgewertet. In der Aufsicht (A) wie auch im Längsschnitt (B) sieht man, dass pGFP-CFTR sowohl im Zytoplasma wie auch an der apikalen Plasmamembran lokalisiert ist. Hingegen befindet sich pGFP-CFTR[K447D+K1468D] überwiegend im Zytoplasma.

4.5.4 Überexpression von SENP1 führt zum Nachweis von unreifem CFTR

Da die Sumoylierung einem dynamischen Muster folgt, ist immer nur ein Bruchteil der auf diese Weise regulierten Proteine tatsächlich auch sumoyliert. Sumoylierung und Desumoylierung verlaufen zyklisch, wie in der Einleitung dargestellt.

SENP1 ist eine SUMO-spezifische Protease und als Desumoylierungskomponente beschrieben, von denen mindestens sieben verschiedene Desumoylasen existieren (Cheng et al., 2006). Sie ist sowohl für die Aktivierung des Vorläufer-SUMO-Proteins zuständig, wie auch für die Desumoylierung des Zielproteins.

Unter der Annahme, dass die zeitgleiche Überexpression einer Desumoylierungskomponente wie SENP1 zu einer stärkeren Desumoylierung von co-transfiziertem CFTR führt, sollte das Auftreten und der Nachweis der reifen im Kernbereich glykosylierten C-Bande des CFTR reduziert sein oder ganz ausbleiben.

Daher sollte nun experimentell bewiesen werden, dass die Co-Transfektion von CHO-Zellen mit Vektoren für CFTR und SENP1 zur Überexpression von SENP1 und damit zu einer verstärkten Desumoylierung von CFTR führt, die den Transport und damit den Nachweis des reifen CFTR in der Plasmamembran verhindert.

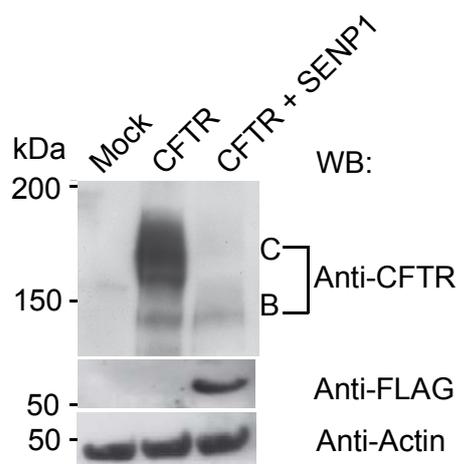


Abbildung 20: SENP1-Überexpression in CFTR-exprimierenden CHO-Zellen verhindert das Ausbilden der reifen C-Form von CFTR.

In CHO-Zellen sind ein das CFTR-exprimierendes Plasmid pcDNA/HISc und ein SENP1-exprimierender Vektor pFLAG CMV 6a co-transfiziert worden. Lysate der CHO-Zellen

wurden 48 h nach Transfektion gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot analysiert. Die Mock Kontrolle, Lysat von CHO-Zellen, die nur mit den Expressionsvektoren (pcDNA/HISc, pFLAG CMV 6a) transient transfiziert wurde, zeigt nach Detektion mit CFTR-spezifischen Antikörpern kein CFTR Protein. Die Ladekontrolle zeigt mit Actin-spezifischen Antikörpern, dass vergleichbare Proteinmengen in den Ausgangszelllysaten enthalten waren.

Die transiente Expression von CFTR gestattet die Immundetektion der B- (140 kDa) und C-Form (170 kDa) von CFTR, wogegen nach Co-Expression von einem FLAG-markiertem SENP1 nur die unreife 140 kDa B-Bande mit CFTR-spezifischen Antikörpern detektierbar ist.

Die Überexpression der SUMO-spezifischen Protease SENP1 in CFTR-exprimierenden Zellen führt demnach zur Ausbildung der im Kernbereich glykosylierten B-Form und blockiert die vollständige Synthese von komplett glykosyliertem CFTR. Diese Beobachtung bestätigt damit die mit den bisherigen Experimenten demonstrierte Relevanz der CFTR-spezifischen SUMO-Motive für eine vollständige Biosynthese von CFTR.

Der molekularen Aufklärung der funktionellen Bedeutung der spezifischen Sumoylierung im Rahmen der Biosynthese und besonders des intrazellulären Transportes von CFTR diene das nächste Experiment. CFTR, welches in einem seiner SUMO-Motive inaktiviert worden war, konnte nur als im Kernbereich glykosyliertes Protein nachgewiesen werden. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass nicht sumoyliertes CFTR bereits frühzeitig vor Erreichen der Plasmamembran im ER oder Golgi hängen bleibt. Danach könnte eine Sumoylierung von CFTR direkt oder indirekt für den Transport zwischen dem ER und dem Golgi oder für den Transport vom Golgi zur Plasmamembran notwendig sein. In diesem Fall würde das Protein auf dem Weg zur Plasmamembran in einem Zellkompartiment stecken bleiben und bereits früher degradiert werden können.

4.5.5 In beiden SUMO-Motiven mutiertes CFTR lokalisiert im Trans-Golgi-Netzwerk

Die subzelluläre Lokalisation von CFTR wurde mittels Zellfraktionierung über einen Dichtegradienten vorgenommen. Dabei war die saubere Auftrennung von ER, Golgi

und Plasmamembran von besonderer Bedeutung zwecks genauen Nachweises von CFTR in den einzelnen Kompartimenten. Dafür wurde ein linear abnehmender 30%-iger Iodixanol-Gradient gewählt.

Die CHO-Zellen wurden dazu transient mit drei verschiedenen CFTR-Expressionskonstrukten transfiziert, CFTR, CFTR[K447D+K1468D] und Δ F508. Die Zellysate wurden über einen Gradienten aufgetrennt und in 78 – 80 Fraktionen mit abnehmender Dichte gesammelt. Die Fraktionen konnten anschließend durch den Einsatz spezifischer Antikörper im Westernblot den einzelnen Zellkompartimenten zugeordnet werden. Für die Plasmamembran wurde ein Anti-Na-K-ATPase-spezifischer Antikörper, als ER-Marker wurde ein Anti-Calnexin-spezifischer Antikörper eingesetzt und der Golgi wurde mittels des Golgi-Markers GM130 sowie des Trans-Golgi-Markers TGN38 adressiert (Abbildung 21).

Die Fraktionierung und nachfolgende Separation in den Gradienten-Gelen zeigt die Detektion der unterschiedlichen CFTR-Proteine in den gleichen Fraktionen wie der entsprechende Kompartiment-spezifische Marker (Co-Lokalisation) und gestattet die Zuordnung zu den entsprechenden Kompartimenten.

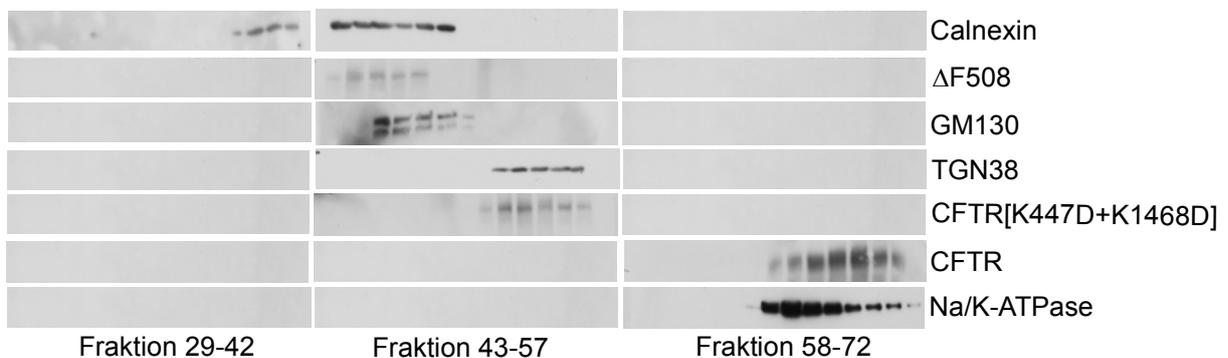


Abbildung 21: CFTR mit Mutationen in beiden SUMO-Motiven lokalisiert im TGN

CHO-Zellen wurden mit dem CFTR-, Δ F508- und CFTR[K447D+K1486D]-exprimierenden pcDNA/HISc-Plasmiden transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und über einen linear abnehmenden 30%-igen Iodixanol-Gradienten aufgetrennt, wobei 78 – 80 Fraktionen mit abnehmender Dichte gesammelt wurden. Spezifische Antikörper wurden zum Nachweis der entsprechenden Kompartimente in den einzelnen Fraktionen im Westernblot eingesetzt: Na/K-ATPase-spezifische Antikörper für den Nachweis der Plasmamembran, Calnexin-spezifische Antikörper für das ER, GM130-spezifische Antikörper für Golgi und TGN38-spezifische Antikörper für das TGN.

Calnexin ist ein im ER lokalisiertes Protein, welches in den Fraktionen 39 bis 48 mit Hilfe des Calnexin-spezifischen Antikörpers detektiert wurde. In denselben Fraktionen wurde das 140 kDa große $\Delta F508$ mit dem spezifischen CFTR-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Golgi-Marker GM130 findet sich in den Fraktionen 45 bis 49, der Trans-Golgi-Marker TGN38 in den Fraktionen 51 bis 55. Durch den GM130-spezifischen und den TGN38-spezifischen Antikörper konnten die dem Golgi-Apparat und die dem Trans-Golgi-Network entsprechenden Fraktionen klar unterschieden werden. CFTR[K447D+K1468D] co-lokalisiert demnach zusammen mit dem TGN (Fraktion 51 bis 55). Die Na/K-ATPase ist in der Plasmamembran lokalisiert und befindet sich wie auch CFTR in den Fraktionen 65 - 72.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CFTR, dessen SUMO-Motive mutiert sind, im Trans-Golgi-Kompartiment festgehalten wird. Diese Beobachtung ist aus zwei Gründen interessant. Das TGN fungiert als Zielkompartiment des für CFTR beschriebenen nicht-konventionellen Transportweges (Yoo et al., 2002). Außerdem schnüren sich Clathrin-ummantelte AP-1-Komplexe vom Trans-Golgi ab, welche als Transportvesikel für den weiteren Transport zur Plasmamembran in Frage kommen. Im Rahmen eines zirkulären und endosomal vermittelten Prozess wird schließlich auch noch membranständiges CFTR zum TGN transportiert.

Damit ist das TGN ein womöglich prominenter Ort der Regulation des CFTR-Transportes, an welchem analog zur Qualitätskontrolle im ER, eine Weitertransportkontrolle stattfindet. Sumoylierungsstatus und andere post-translationale Modifikationen von CFTR könnten dazu führen, dass CFTR eine Konformation annehmen kann, die eher transportförderlich oder hinderlich ist. Die daraus resultierende Exposition bzw. Maskierung entsprechender CFTR-Sortierungsmotive würde einen vesikulären Transport zur Plasmamembran oder zurück zum ER bewirken. Nachfolgend wurde daher in einem ersten orientierenden Experiment die Interaktion von CFTR mit weiteren Komponenten der Transportmaschinerie in Abhängigkeit intakter SUMO-Motive untersucht.

4.6. Einfluss eines mutierten Di-Leucin-Motives auf die Assoziation von CFTR mit AP-1 und AP-2

Hier wurde die mögliche Interaktion von CFTR mit beiden Clathrin-Vesikelkomplexen, AP-1 und AP-2, untersucht. Dabei wurde speziell die Funktion des zum SUMO-Motiv benachbart gelegenen Di-Leucin-Motivs in der Intrazellulärdomäne von CFTR analysiert (Abbildung 22).

```

      +10   +20   +30   +40   +50
      |    |    |    |    |
301 YVRYFNSSAFFFSGFFVFLSVLPYALIKGIILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQT
361 WYDSLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGELFEKAKQNNNNRK
421 TSNGDDSLFFSNFSLGTPVLKDINFKIERGOLLAVAGSTGAGKTSLLMMIMGELEPSEG
481 KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIV
541 LGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTETEKEIFESCVCCLMANKTR
601 ILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNS
661 ILTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFQKQTFGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLO
721 MNGIEEDSDEPLERRLSLVDPSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSVLNLMTHSVNOG
781 QNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSRRLSQETGLEISEEINEEDLKECFDDMESI
841 PAVTTWNTYLRYITVHKSILFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRN
901 NSYAVIITSTSSYYVFYIYGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHKMLHSVLQAP
961 MSTLNLTKAGGILNRFKDIALLDPLLPTIFDFIQLLIVIGAIAVVAVLQPYIFVATV
1021 PVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSIPFTHLVTSKGLWTLRAFGROPYFETLFHK
1081 ALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTLAMNIM
1141 STLQWAVNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIIENSHVKK
1201 DDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGLLGRGTGSGKSTLLSAFLRL
1261 LNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVIFISGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVAD
1321 EVGLRSVIEQFPKGLDFVLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPSAHLDPVT
1381 YQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECCQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQA
1441 ISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTRL
      |    |    |    |    |
      +10   +20   +30   +40   +50

```

SUMO-Motiv: ΨKXE

Di-Leucin: [DER]xxxL[LVI]

Abbildung 22: Spezifisches Di-Leucin-Sortierungsmotiv in der CFTR-Aminosäuresequenz.

Im Einzelnen sind die in der Literatur beschriebenen und zum Teil funktional charakterisierten Sortierungsmotive aufgeführt. In unmittelbarer Nähe des SUMO-Motivs in der Intrazellulärdomäne (446 – 449) liegt ein Di-Leucin-Motiv (449-454). Beide Motive überlappen an der Position der Glutaminsäure (E). Das im C-Terminus gelegene SUMO-

Motiv ist an Position 1468 lokalisiert. Weitere mögliche Di-Leucin-Motive finden sich an Position 734 – 739, 933 – 938 und 993 – 998.

Das für die Internalisierung benötigte Tyrosin-Motiv befindet sich bei Position 1424, vor dem Di-Leucin-Motiv an Stelle 1430. Zur über das Tyrosinmotiv-vermittelten Internalisierung der Membranproteine sind saure Aminosäurereste fünf Positionen aufwärts von dem Leucinpaar und eine Serinphosphorylierung, vier bis fünf Positionen aufwärts von dem eigentlichen Motiv, nötig und hier auch anzutreffen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde nun das Di-Leucin-Motiv in CFTR-exprimierenden Plasmiden mutiert, was zu den CFTR[XL]-Konstrukten führte. Die Expressionskonstrukte wurden nach Transfektion in CHO-Zellen über CFTR-spezifische Antikörper immunpräzipitiert und nachfolgend mittels AP-1- und AP-2-spezifischen Antikörpern im Westernblot detektiert. Damit sollte der Nachweis der Funktionalität des beschriebenen Di-Leucin-Motivs erbracht werden, unter der Annahme, dass die in das Di-Leucin-Motiv eingeführte Deletion die Interaktion von CFTR mit AP-1 und/oder AP-2 verhindern könnte.

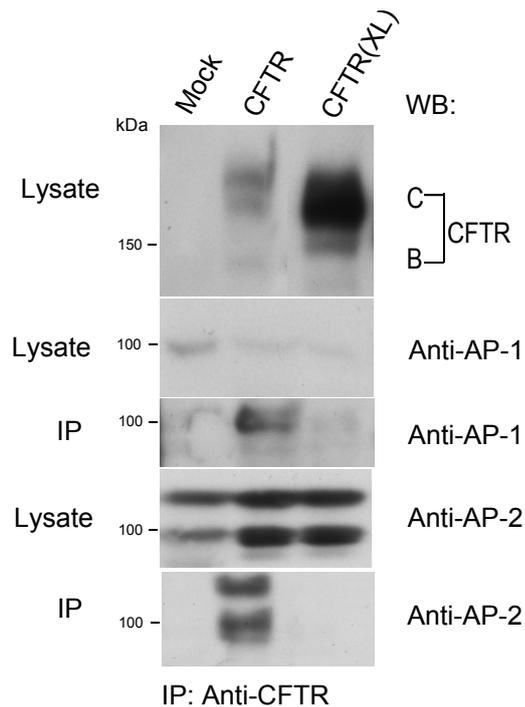


Abbildung 23: Interaktion von CFTR mit AP-1 und AP-2 abhängig von einem intaktem Di-Leucin-Motiv.

CHO-Zellen wurden mit CFTR- und CFTR[XL]-exprimierenden pcDNA/HISc Plasmiden transient transfiziert. Mit an *G-Beads* gekoppelten CFTR-spezifischen Antikörpern wurde 48 h nach Transfektion im Zelllysat eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt, die eine Assoziation von CFTR mit AP-1 und AP-2 zeigte.

Als Kontrolle wurden die AP-1- und AP-2-Komplexe mit spezifischen Antikörpern in allen Zelllysaten nachgewiesen. Die AP-2-Doppelbande erklärt sich daher, dass der AP-2-spezifische Antikörper mit beiden α -Untereinheiten des AP-2-Proteins interagiert (100 kDa und 115 kDa).

Die CHO-Zelllysate zeigen die entsprechenden AP-1- und AP-2-Komplexe, die mit AP-1- und AP-2-spezifischen Antikörpern detektierbar sind. Nach Transfektion mit CFTR werden sowohl AP-1 als auch AP-2 mittels eines CFTR-spezifischen Antiköpers co-immunpräzipitiert. Das Auftreten der reifen C-Form von CFTR bestätigt die erfolgreiche Expression in den CHO-Zellen.

Der Einsatz von CFTR[XL] zeigt weder ein Hinweis auf eine Interaktion mit AP-1 noch mit AP-2, obgleich die deutlich größeren Proteinmengen im Ausgangslysat einen Nachweis begünstigt haben sollten. Im direkten Vergleich mit der Co-Immunitäzipitation von CFTR und AP-1 bzw. AP-2 erscheint die dort gefundene Interaktion mit AP-1, vor dem Hintergrund der geringen CFTR Proteinmengen im Ausgangszelllllysat, real zu sein.

Damit ist dieses orientierende Experiment ein erster möglicher Hinweis darauf, dass eine Mutation im beschriebenen Di-Leucin-Motiv mit der Interaktion zwischen AP-1 und AP-2 und CFTR interferieren könnte. Inwiefern sich diese Beobachtung erhärten lässt muss dagegen zukünftig abgeklärt werden.

5. Diskussion

Die Identifikation zweier hoch konservierter SUMO-Motive im CFTR mittels computergestützter Aminosäuresequenzanalyse führten zu der Frage, ob und in welcher Weise die Sumoylierung die Biosynthese funktional aktiven CFTR-Proteins kontrollieren kann bzw. Teil einer umfassenderen Regulation der Aktivität von CFTR ist. Die Sumoylierung, analog zur vielfach beschriebenen Ubiquitinierung, ist ein spezifischer posttranslationaler Modifikationsprozess der zur Übertragung eines SUMO-Restes oder mehrerer SUMO-Moleküle (bei SUMO 1) auf die Aminosäure Lysin führt. Dabei ist dieses Lysin eingebettet in eine spezifische Erkennungssequenz, das SUMO-Motive, welches quasi als Andockstelle fungiert. SUMO-Motive werden in zahlreichen Proteinen beschrieben (Hershko and Ciechanover, 1998; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Außerdem begründet die Häufigkeit ihres Auftretens die Frage nach Relevanz und Funktionalität, der hier für CFTR nachgegangen wurde.

Im Fall des Kaliumkanals K2P1 wird die Sumoylierung, die nach Rajan et al. (2005) zur Hemmung der Kanalaktivität führt, allerdings kontrovers diskutiert (Felicangeli et al., 2007). Das mutierte Lysin an Position 274 in der K2P1-Sequenz (LK²⁷⁴KF) fügt sich nicht in das klassische Sumo-Konsensus-Motif ein, da sich darin anstelle des Phenylalanins (F) eine saure Aminosäure (E oder D) findet. Auch konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, dass K2P1 in COS-7-Zellen und in *Xenopus* Oocyten quantitativ sumoyliert war, was nach Ansicht der Autoren hätte erwartet werden müssen, um die beobachtete Inaktivität von K2P1 nach Expression in verschiedenen Zelltypen zu erklären. Schließlich führte ein konservativer Aminosäureaustausch des Lysins²⁷⁴ durch ein Arginin nicht zu einer Zunahme der Leitfähigkeit, d.h. des Kaliumstromes. Dagegen wird nach Austausch des positiv geladenen Lysins durch einen negativ geladenen Glutamatrest eine entsprechende Zunahme des Kaliumstromes gemessen. Daraus schließen die Autoren, dass der zu beobachtende Anstieg des Kaliumstromes eher einem Ladungseffekt zuzuordnen ist, da nur nach Einfügen des negativ geladenen Glutamates, nicht aber in Gegenwart des Arginins, zu beobachten ist.

Interessanterweise und im Unterschied zu dem hier vorgestellten Modell, würde nach Rajan et al. (2005) die Sumoylierung des K2P1-Kanals eine negative Kontrolle

darstellen, da sie zur Hemmung des Kaliumtransportes führen würde. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten argumentieren in Richtung einer positiven Kontrolle, wonach die Sumoylierung für den Transport von CFTR zur Plasmamembran nötig ist.

Die Analyse von CFTR und seiner häufigsten Mutation, $\Delta F508$, hat bereits zu wesentlichen Einsichten geführt, die im Zusammenhang mit den Steuerungsmechanismen von Proteinfaltung, -abbau, -transport und funktioneller Insertion in die Plasmamembran stehen (Riordan et al. 1989; Loo et al., 1998; Meacham et al., 1999; Pind et al., 1994). Die Deletion des Phenylalanins an Position 508 prägt sich unterschiedlich aus und führt zu einer Störung des Transportes zur Membran und zu veränderten Kanaltransporteigenschaften (Dalemans et al., 1991; Drumm et al., 1991).

Der auswärtsgerichtete Transport von CFTR ist nur ungenügend verstanden. Neben den aus der Charakterisierung der $\Delta F508$ -Variante gefolgerten Rückschlüssen auf die Regulation des CFTR-Transportes bietet die Sumoylierung einen konkreten Mechanismus im Zusammenhang mit der Reifung von CFTR, der bislang noch nicht beschrieben ist.

5.1 Interaktion von CFTR mit dem E2 (Ubc9)-konjugierenden Enzymkomplex

Die vier bekannten SUMO-Proteine werden mittels einer spezifischen Hydrolase aus Vorläufer-Proteinen, durch Prozessierung ihres C-Terminus, gewonnen. Dabei wird ein Di-Glycin-Motiv exponiert und verfügbar für nachfolgende Aktivierungs- und Konjugationsschritte im Rahmen des Sumoylierungszyklus. Daher wurde zuerst versucht, eine direkte Interaktion zwischen einzelnen CFTR-Domänen und einer wesentlichen Komponente (Ubc9) des Sumoylierungszyklus nachzuweisen.

Unter der Voraussetzung, dass die SUMO-Motive im CFTR funktional sind, sollte eine direkte Interaktion zwischen dem als Zielprotein fungierendem CFTR und Ubc9 nachweisbar sein bzw. im Falle der in das SUMO-Motiv eingeführten Mutationen sollte eine spezifische Interaktion abgeschwächt und nicht nachweisbar sein.

Die Resultate des *Yeast Two-Hybrid-Systems* (Y2H) bestätigen diese Annahme grundsätzlich. Weder konnte eine Interaktion von Ubc9 mit denjenigen CFTR-Domänen nachgewiesen werden, die entweder das erste SUMO-Motiv (CFTR-

IC[K447D], in der ersten intrazellulären Domäne zusammen mit NBD1 liegend) oder das zweite SUMO-Motiv (CFTR-NBD2[K1468D], im C-terminalen Bereich gelegen) in mutierter Form trugen. Dagegen war die Assoziation zwischen CFTR-IC sowie Δ F508-IC gut detektierbar. Es war auch eine Interaktion zwischen Δ F508-IC[K447D] und Ubc9 nachweisbar (s. 5.2.).

Zur weiteren Bestätigung der Interaktion von Ubc9 und CFTR wurden endogen Ubc9-exprimierende CHO-Zellen eingesetzt. Diese waren entweder stabil mit CFTR transfiziert oder wurden mit den CFTR-Expressionskonstrukten mit SUMO-Motiv-Mutationen, CFTR[K447D], CFTR[K1468D] und CFTR[K447D+K1468D], transient transfiziert. Nachfolgende Co-Immunopräzipitationen mit einem CFTR-spezifischen Antikörper bestätigten die beobachtete Interaktion zwischen Ubc9 und CFTR und das Ausbleiben einer nachweisbaren Interaktion von Ubc9 mit CFTR, wenn eines der SUMO-Motive mutiert war. Analoge Experimente wurden mit Δ F508 in Gegenwart und in Abwesenheit der Mutation in beiden SUMO-Motiven durchgeführt (Δ F508[K447D+K1486D], Δ F508[K447D], und Δ F508[K1486D]). Auch in diesem Fall war keine Interaktion von Ubc9 und Δ F508 zu beobachten, wenn eines oder beide SUMO-Motive mutiert waren. Dagegen war eine Interaktion von Ubc9 und Δ F508 nachweisbar.

Damit haben die Δ F508-Mutation und die mit der Mutation einhergehende lokale Strukturveränderung im CFTR keinen nachweisbaren Effekt auf die Bindung von Ubc9, auch dort nicht, wo die Mutation im SUMO-Motiv an Stelle 447 räumlich benachbart zur Δ F508-Mutation liegt.

5.2 Direkte Interaktion von CFTR mit verschiedenen SUMO-Proteinen

Mittels des Y2H wurde der Nachweis erbracht, dass isolierte CFTR-Domänen (IC und NBD2) mit verschiedenen SUMO-Isoformen direkt assoziieren können. Die SUMO-Proteine 1-4 wurden auch mit Δ F508-IC assoziiert gefunden. Die in die SUMO-Motive eingeführten Mutationen ließen beim Einsatz von CFTR-IC[K447D] keinen Nachweis einer Interaktion mit einem der SUMO-Proteine zu.

Bei Verwendung von Δ F508-IC[K447D] ließ sich keine Interaktion mit einem der SUMO-Proteine nachweisen. Da jedoch zuvor ein Hinweis auf Assoziation von Δ F508-IC[K447D] und Ubc9 erhalten wurde, bleibt die Möglichkeit, dass das parallele

Auftreten der $\Delta F508$ -Mutation und der K447D-Mutation die Assoziation mit Ubc9 und SUMO-Proteinen begünstigt. Bei der Interpretation dieser Resultate sollte man bedenken, dass in diesen Experimenten Proteindomänen betrachtet wurden. CFTR-Konstrukte, welche die gesamte Länge des Proteins abbilden und im Säugerzellsystem untersucht wurden, bieten weniger artifizielle Bedingungen zur Ausbildung einer nativen und voll funktionsfähigen Proteinstruktur.

Die Nachstellung der Y2H-Experimente in einem Säugerzellsystem (CFTR stabil exprimierende CHO-Zellen) führte schließlich zum Nachweis einer direkten Interaktion von SUMO und CFTR. Die Tatsache, dass der Vorgang der Sumoylierung ein sehr dynamischer Prozess ist und immer nur ein Bruchteil des Zielproteins in messbaren Mengen sumoyliert vorliegt, erschwert den direkten experimentellen Nachweis einer *in vivo*-Sumoylierung.

Dazu wurden entsprechend Xpress-markierte SUMO-1-4-Konstrukte zusammen mit Ubc9 in CHO-Zellen co-transfiziert und mit Xpress-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In allen Fällen konnten SUMO 1-4 mit CFTR co-immunoprecipitiert werden.

Die zwischen dem Säugerzell-Kultursystem und dem Y2H beobachteten Unterschiede im Interaktionsmuster lassen sich auf verschiedene Weise erklären. Die eingesetzten Proteindomänen können sich anders falten als das komplette CFTR und damit auch unterschiedliche Affinitäten gegenüber der Sumoylierungsreaktion aufweisen. Die Überexpression von Proteinen bewirkt außerdem eine hohe lokale Konzentration in der Zelle und begünstigt unspezifische Wechselwirkungen, kann aber auch dazu führen, dass spezifische Bindungen in ihrer Intensität überproportional abgebildet werden. Die eingesetzten Zellsysteme können weiterhin zelltypische Proteine (Co-Faktoren, Chaperone) enthalten, die mit CFTR bzw. den CFTR-Domänen assoziieren können und eine abweichende Sumoylierungseffizienz verursachen.

Da nun die Überexpression von transfizierten SUMO-Proteinen und stabil transfiziertem CFTR zu sehr unspezifischen Befunden führen kann, wurden die Experimente komplett in zwei Zelllinien reproduziert, die zum einen alle vier SUMO-Isoformen und CFTR endogen exprimieren (humane Pankreas Zelllinie T84) oder die $\Delta F508$ -Variante endogen exprimieren (aus einem Patienten abgeleitete epitheliale CFPAC1 Zellen). Alle untersuchten SUMO-Isoformen zeigten eine Assoziation mit CFTR bzw. $\Delta F508$.

In der Summe belegen die bislang geschilderten Resultate eine direkte und spezifische Interaktion zwischen den SUMO-Proteinen und sowohl CFTR als auch $\Delta F508$. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von einer bzw. beiden intakten SUMO-Motiven abhängig ist. Eine Mutation in einem der beiden Motive führt bereits zu einem Verlust der Nachweisbarkeit der Interaktion von SUMO 1-4 und den beschriebenen CFTR-Domänen bzw. dem kompletten CFTR. Diese Beobachtungen sind konsistent mit der Annahme, dass es sich bei den beschriebenen SUMO-Motiven um funktionale SUMO-Motive handelt, an welche die SUMO-Proteine sequenzabhängig binden können und damit CFTR spezifisch sumoylieren können. Weiterhin zeigen erste Hinweise, dass intakte SUMO-Motive für den Prozess der intrazellulären Reifung, d.h. den Transport von CFTR notwendig sind. Dieser speziellen Frage zum möglichen Einfluss der Sumoylierung auf den Prozess der CFTR-Reifung und intrazellulären Lokalisation dienten die nun diskutierten Experimente.

5.3 SUMO-Bindung an CFTR ist Teil des Glykosylierungsprozesses von CFTR

Die in die SUMO-Motive eingeführten Mutationen führen bei Co-Transfektion von Ubc9 und verschiedenen CFTR-Konstrukten in CHO-Zellen nicht nur zum Ausfall einer Assoziation mit Ubc9, sondern auch zum Ausbleiben der reifen und vollständig glykosylierten 170 kDa großen C-Bande von CFTR im Westernblot. Dagegen zeigen alle die SUMO-Motiv-Mutation tragenden CFTR-Konstrukte nur die unreife und nicht vollständig glykosylierte 140 kDa große B-Bande. Die $\Delta F508$ -Variante, von der bekannt ist, dass sie im ER festgehalten wird und damit den weiteren Reifeprozess hin zum 170-kDa-Protein nicht durchlaufen kann, zeigt daher keine nachweisbare 170 kDa große, reifem CFTR entsprechende, Bande. Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob $\Delta F508$ ein intaktes oder mutiertes SUMO-Motiv enthält. Demnach verursachen die in das SUMO-Motiv eingeführten Mutationen keine kompensatorischen Effekte, die den durch die räumlich benachbarte $\Delta F508$ -Mutation bewirkten Transportdefekt aufheben können. Die Intaktheit der SUMO-Motive ist also für die im Golgi stattfindende Glykosylierung wichtig und deren Verlust führt zu einer unreifen CFTR-Form.

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass eine vollständige komplexe Glykosylierung nicht nötig ist, um CFTR zur Plasmamembran zu transportieren (Yu et al., 2007). Erste Hinweise darauf wurden von Shen et al. durch den Einsatz von Oligosaccharid-Prozessierungsinhibitoren erzielt (Shen et al., 1993). D.h. ein Vorwärtstransport ist auch unabhängig von einer vollständigen Glykosylierung möglich. Weiter unten zu diskutierende Resultate ergänzen diese Beobachtungen, wonach die in den SUMO-Motiven von CFTR eingeführten Mutationen, analog zu $\Delta F508$, die nicht vollständig glykosylierte B-Form ausbilden, aber zu einer unterschiedlich Arretierung im Transportprozess im Vergleich zu $\Delta F508$ führen.

5.4 Intakte CFTR-SUMO-Motive sind für den Transport von CFTR zur Plasmamembran notwendig

Es ist vielfach beschrieben, dass eine gestörte Reifung bzw. Prozessierung von Transmembranproteinen dazu führt, dass diese nicht zur Plasmamembran transportiert werden können bzw. in der Plasmamembran nicht funktional aktiv sind. ABC-Transporter, wie das P-Glycoprotein oder MRP1, zeigen eine nahezu vollständige Reifung und einen kompletten Export aus dem ER im Vergleich zu CFTR, von welchem nur etwa jedes dritte Molekül die Plasmamembran funktional aktiv erreicht (Loo et al., 1998; Kopito, 1999; Skach, 2000). Interessanterweise führt die Deletion des Phenylalanins an analoger Stelle zur Position 508 im CFTR in den genannten ABC-Transportern dazu, dass, vergleichbar zum CFTR, Reifung und Export aus dem ER ausbleiben (Loo et al., 2004; Loo et al., 2005).

Mittels Biotinylierung der Zelloberfläche konnte hier gezeigt werden, dass zwar CFTR in der Plasmamembran detektiert werden konnte, aber in keinem Fall CFTR, welches eine Mutation in einem oder in beiden SUMO-Motiven trug. Parallel dazu bestätigt die konfokale Mikroskopie, dass das ein in beiden SUMO-Motiven mutiertes CFTR nahezu ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und nicht in der apikalen Membran, wo CFTR quantitativ nachgewiesen wurde.

Mit diesen Resultaten ist ein weiterer Hinweis erhalten worden, der die Annahme bestätigt, dass funktionale SUMO-Motive im CFTR für den Transport zur Plasmamembran erforderlich sind.

Es sei daran erinnert, dass Yu et al. (2007) beobachtete, dass der Transport zur Plasmamembran und korrekte Faltung auch entkoppelt ablaufen können. In den hier durchgeführten Experimenten konnte eine Plasmalokalisation von CFTR, welches eine Mutation in einem der SUMO-Motive trug, jedenfalls nicht beobachtet werden. In der Einleitung wurde dabei auch schon auf die mögliche Zelltyp-Spezifität dieser Beobachtung verwiesen.

5.5 Reifes CFTR kann in Gegenwart überexprimierter SENP1 nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden

Es ist allgemein bekannt und häufig beschrieben, dass die Einführung von Mutationen in die Primärsequenz eines Proteins erhebliche Auswirkungen auf die Faltungseigenschaften und damit auf die native Konformation des zu untersuchenden Proteins haben kann. Dieser Umstand kann die Interpretation struktureller und funktioneller Analysen zur Proteininteraktion und Proteinaktivität negativ beeinträchtigen, da viele Mutation *per se* strukturelle Veränderung in sensitiven Domänen bewirken können und damit zu falschen Rückschlüssen bezüglich der spezifischen Bedeutung der untersuchten Sequenz führen können.

Infolge dieser Überlegungen wurde ein experimenteller Weg gewählt, welcher die Funktionalität der SUMO-Motive und damit die Relevanz der Sumoylierung für den Reifungs- und Transportprozess von CFTR durch Überexpression einer Desumoylierungskomponente, der SUMO-spezifischen Protease SENP1 (SUMO/*sentrin-specific protease*), bestätigen sollte.

Überexpression einer Desumoylierungskomponente wie SENP1 (SUMO/*sentrin-specific protease*) sollte sich analog zur Inaktivierung eines SUMO-Motives durch Mutation auswirken, eine verstärkte Desumoylierung von co-transfizierten CFTR bewirken und zu einer Abnahme der reifen CFTR-C-Bande führen.

In der Tat kann die reife CFTR-C-Bande bei gleichzeitiger Überexpression von SENP1 in CHO-Zellen, die mit CFTR-Expressionskonstrukten co-transfiziert wurden, nicht detektiert werden. Daraus lässt sich erneut schließen, dass eine Sumoylierung von CFTR für die Reifung von CFTR erforderlich ist bzw. eine wesentliche Rolle spielt.

Die Überexpression von SUMO-spezifischer SENP1 desumoyliert danach aller Wahrscheinlichkeit nach sumoyliertes CFTR und simuliert damit die durch Mutation verursachte Inaktivierung eines SUMO-Motives. Alternativ wäre vorstellbar, dass auch die durch SENP1 bewirkte Desumoylierung einer zellulären Komponente erfolgt, die nur in sumoylierter Form mit CFTR interagieren kann und für eine erfolgreiche Biosynthese benötigt würde. Endgültig ließe sich diese Frage nur durch einen direkten massenspektrometrischen Nachweis spezifisch an CFTR bzw. an eine CFTR-Domäne gebundenen SUMO-Proteins vor und nach SENP1-vermittelter Desumoylierung zeigen.

Posttranslationale Modifikationen, wie die Sumoylierung, können die Konformation, Interaktionseigenschaften oder Aktivität des Zielmoleküls oder alle Prozesse zusammen beeinflussen. Infolgedessen ist eine weitere Eingrenzung der molekularen Ursachen und Konsequenzen wünschenswert, die aus den durch Mutation inaktivierten SUMO-Motiven im CFTR resultieren können. In diesem Zusammenhang ist ein Vergleich zu den für $\Delta F508$ beschriebenen molekularen Transportdefekten weiterführend. Die Mutation an Position 508 im CFTR führt, wie publiziert, zu einer Arretierung von unreifem CFTR im ER. In diesem Fall führt das Auftreten einer Mutation zu einem Transportdefekt und zu einem teilweisen Funktionsausfall nach Einbau in die Plasmamembran. Unklar ist nach wie vor, auf welche Weise die Mutation an Position 508 zu dem beobachteten Transportausfall zur Plasmamembran bzw. zu einer Reduktion des cAMP-stimulierten Chloridtransportes des CFTR-Kanals führt (Dalemans et al., 1991; Wang et al., 2000). Vorstellbar sind durch den Aminosäureaustausch bewirkte strukturelle Veränderungen im CFTR, die eine produktive Interaktion mit den Komponenten der zellulären Transportmaschinerie unmöglich oder ineffizient machen. Dabei ist auch eine unmittelbare Wechselwirkung mit dem benachbart gelegenen SUMO-Motiv an Position 447 denkbar. Weiterhin ist bekannt, dass Sumoylierung und Ubiquitinierung kompetitive Prozesse darstellen können. Infolgedessen könnte das native CFTR sowohl im Falle von $\Delta F508$ als auch durch Veränderung der SUMO-Motive eine räumliche Struktur annehmen, die eher von Komponenten der ERAD erkannt werden und somit zu einem früheren und schnelleren Abbau von CFTR führen.

Experimente zur subzellulären Lokalisation sollten hier weitere Klarheit bringen, da bestimmte Funktionen im Reifungsprozess sekretorischer Proteine bekanntermaßen

an spezielle Kompartimente gebunden sind und durch spezifische Sortierungssignale vermittelt werden.

5.6 Inaktivierung der CFTR-SUMO-Motive führt zur Arretierung von CFTR im Trans-Golgi-Netzwerk

CHO-Zellen wurden mit CFTR-, $\Delta F508$ - und CFTR[K447D+K1486D]-Expressionskonstrukten transfiziert und nachfolgend mittels Dichtegradientenzentrifugation in subzelluläre Fraktionen aufgeteilt. Der parallele Antikörpernachweis von CFTR bzw. CFTR-Mutanten und co-migrierender Kompartiment-spezifischer Marker gestattete die genaue Zuordnung der jeweiligen CFTR-Moleküle zu den darstellbaren subzellulären Kompartimenten.

Die $\Delta F508$ Variante fand sich, wie in der Literatur beschrieben, im ER Kompartiment. CFTR co-lokalisierte als voll glykosylierte C-Bande zusammen mit der für die Plasmamembran charakteristischen Na/K-ATPase. CFTR[K447D+K1486D] fand sich dagegen quantitativ im TGN, co-migrierend mit dem TGN-spezifischen TGN38.

Damit konnte der beobachtete Transportdefekt von CFTR infolge Inaktivierung der CFTR-SUMO-Motive einem spezifischen subzellulären Kompartiment zugeordnet werden und gleichzeitig von dem mit $\Delta F508$ assoziierten Transportdefekt differenziert werden. In einer ersten Interpretation lässt sich damit sagen, dass die Mutation an Position 508 zu einem anderen Lokalisationsarrest führt als die in die SUMO-Motive eingeführten Mutationen. Es lässt sich aber eine strukturelle Wechselwirkung beider Regionen nicht alleine deswegen ausschließen, weil sie nicht zu der gleichen subzellulären Lokalisation führen. Im weiteren Transport spielen andere Komponenten eine Rolle, deren Interaktion durchaus auch als Resultat des Zusammenwirkens der beiden genannten CFTR-Regionen vorstellbar ist.

5.7 Hinweise auf einen Einfluss des Di-Leucin-Motivs und auf eine Assoziation von CFTR mit AP-1 und AP-2

Für das TGN ist beschrieben worden, dass sich dort AP-1-Komplexe abschnüren, welche mit Di-Leucin- und Tyrosin-Motiven im zu transportierenden Protein interagieren (Rapoport et al., 1997; Ohno et al., 1995). Für CFTR ist bereits experimentell belegt, dass Tyrosin- und Di-Leucin-Motive im C-Terminus von CFTR mit der μ 2-Untereinheit des AP-2 -Clathrin-Adaptorkomplexes interagieren und somit die Clathrin-vermittelte Endocytose initiieren (Weixel, 2001). Grundsätzlich scheinen Tyrosin- und Di-Leucin-Motive den Einschluss von Proteinen, einschließlich des CFTR Proteins, in Clathrin-umhüllte Vesikel (AP-2-Komplexe) im Rahmen des Endozytoseprozesses an der Plasmamembran zu steuern (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999; Hu et al., 2001; Weixel and Bradbury, 2000). Mutation dieser C-terminalen gelegenen CFTR-Motive bewirkt eine starke Hemmung der Endozytose von CFTR (Hu et al., 2001). Es ist bekannt, dass das CFTR einen endozytotisch vermittelten zirkularen Prozess durchläuft und dabei wieder in aktiver Form zurück zur Plasmamembran geführt werden kann (Ameen et al., 2007).

Durch Co-Immunpräzipitation mit AP-1- oder AP-2-spezifischen Antikörpern konnte eine Assoziation sowohl von AP-1 und AP-2 mit CFTR gezeigt werden. Wie im Resultateteil ausgeführt, werden in Gegenwart der Di-Leucin-Mutation mit CFTR[XL] deutlich größere Mengen von CFTR detektierbar. Im direkten Vergleich zum parallel eingesetzten CFTR erscheint die Assoziation real zu sein, da die Proteinmengen im Zelllysat und im Immunpräzipitat beider experimenteller Ansätze korrespondieren. Eine bevorzugte Interaktion von CFTR und AP-1 wäre konsistent mit der Beobachtung, dass AP-1 im TGN mit Clathrin assoziiert vorliegt. Die beobachtete Assoziation mit AP-1 konnte in der zitierten Arbeit von Weixel und Bradbury (2000) nicht gezeigt werden. Obgleich an dortiger Stelle die Interaktion von AP-2-Adaptoren und AP-2-Komplexen mit *in-vivo*- und in *in-vitro*-Bindungsstudien (mit *in-vitro*-translatiertem CFTR) verifiziert wurde, waren nur GST-CFTR- Fusionsproteine zum Nachweis einer Interaktion mit AP-1- und AP-2-Komplexen eingesetzt worden. Damit bieten sich mehrere Erklärungen für den beobachteten Unterschied an. Zum einen kann das eingesetzte GST-CFTR-Fusionsprotein geeignet sein, um eine Bindung an AP-2-Komplexe, nicht jedoch an AP-1-Komplexe, zu gestatten. Neben

konformationellen Gründen und dem Umstand, dass nur der C-Terminus genutzt wurde, kann auch die zelluläre Konzentration der AP-1-Komplexe einen Nachweis erschwert oder unmöglich gemacht haben. Analoges würde auch für das beschriebene *in-vitro*-translatierte CFTR gelten können, wo dieser Nachweis einer Interaktion mit AP-1 nicht versucht wurde. Auch unterschiedliche Immunopräzipitationsbedingungen können die Unterschiede erklären.

5.8. Entwurf und Diskussion eines Modells zur Funktion der Sumoylierung von CFTR

Die vermeintliche Inaktivierung der SUMO-Motive im CFTR bewirkt, dass ein auf diese Weise beeinträchtigtes CFTR-Molekül bevorzugt im TGN festgehalten wird und der weitere Transport zur Plasmamembran hin unterbunden erscheint. Das TGN (*late Golgi/endosomal compartment*) repräsentiert dasjenige Kompartiment, welches dem für CFTR beschriebenen nicht-konventionellen Transport als Zielkompartiment, anstelle des für den konventionellen Transport genutzten frühen Cis-Golgi, dient (Yoo et al., 2002; Ladinsky et al., 1999).

Der komplette Ablauf des intrazellulären Transportes von CFTR zur Plasmamembran ist dagegen nur recht unvollständig verstanden. Grundsätzlich ist bekannt, dass die COPII-Maschinerie die Freisetzung von Proteinen aus dem ER und deren Transport zum Golgi vermittelt. Diese Funktion von COPII ist auch für den Export von CFTR aus dem ER gezeigt worden (Fu and Sztul, 2003; Wang et al., 2004). Mittlerweile ist auch eine wichtige Rolle für COPI im Transport funktionalen CFTR-Proteins etabliert worden (Rennolds et al., 2008; Yu et al., 2007).

$\Delta F508$ wird dagegen bereits im ER bzw. im ERGIC (ER-Golgi *intermediate compartment*) arretiert und der ERAD zugeführt (Gilbert et al., 1998). D.h. dortige Mutation führt zu einem anderen Lokalisationsdefekt im Transport als hier für das in den SUMO-Motiven mutierte CFTR beschrieben. Interessanterweise führt die Inhibition der ERAD nicht zu einer nennenswert erhöhten Exportrate von einem ABC-Transporterprotein, welches die $\Delta F508$ -Mutation trägt, aus dem ER (Pagant et al., 2007). Danach sollten zusätzlich andere, als alleine ERAD-assoziierte Komponenten, die Exportrate aus dem ER mitbestimmen können.

Zur möglichen Erklärung des Transportarrestes im TGN von CFTR, welches durch Mutation inaktivierte SUMO-Motive trägt, bieten sich zwei Hypothesen an. Zum einen ist denkbar, dass die Sumoylierung mit dem Prozess des Ubiquitin-gesteuerten Proteinabbaus interferiert. Dazu sind einige prominente Fälle in der Literatur beschrieben, bei der SUMO und Ubiquitin kompetitive Funktionen wahrnehmen. Für I κ B α und Phosphoducin bewirkt eine Modifikation mit SUMO am gleichen Lysinrest (an welchem auch Ubiquitin bindet) einen Schutz vor Proteindegradation (Desterro et al., 1998; Klenk et al., 2006). Bei PCNA verhindert SUMO-Modifikation, anstelle Ubiquitinierung, Rekombinationsereignisse während der S-Phase mittels Rekrutierung der Helikase Srs2 (Pfander et al., 2005). Weitere Beispiele für einen regulatorischen Einfluss der SUMO-Modifikation auf die Aktivität des Zielproteins repräsentieren Topoisomerasen (I, II), Helikasen und der Tumorsuppressor p53 (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

Die Sumoylierung von CFTR könnte demnach vor einem forcierten Proteinabbau schützen und umgekehrt könnte eine unvollständige oder nicht mögliche Sumoylierung zu einem beschleunigten Proteinabbau führen. Allerdings belegen die Experimente mit CFTR, in welchem eines oder beide SUMO-Motive mutiert waren, eher einen Reifungsdefekt, d.h. eine unvollständige Glykosylierung anstelle eines beschleunigten Proteinabbaus.

Zum anderen ist auch denkbar, dass die Sumoylierung den vorwärtsgerichteten Transport zur Plasmamembran fördert bzw. erst ermöglicht durch die Freilegung derjenigen Signalerkennungsregionen, die von den Transportvesikeln (COPII; AP-1) für den anterograden Transport erkannt werden müssen. Das sec24-Protein, eine Komponente des COPII-Komplexes, erkennt ein sog. zwei saure Aminosäuren umfassendes Exit-Motiv in der NBD-1 von CFTR, welches in mutierter Form den Austritt aus dem ER hemmt (Wang et al., 2004). Insofern kann man die Hypothese formulieren, dass sowohl die Δ F508-Mutation als auch die mutierten SUMO-Motive eine lokal begrenzte strukturelle Veränderung im CFTR bewirken und damit die für den weiteren Transport benötigten Signalmotive maskieren könnten. Die zur ER-Rückführung benutzten Signalsequenzen würden im Zuge der Faltung zum reifen CFTR hin in der Konformation versteckt und daher für eine Erkennung durch vorwärts transportierende Vesikel nicht zugänglich. Als Resultat dieser strukturellen Veränderungen im mutierten CFTR käme es zur Arretierung im TGN.

Das nachfolgend vorgestellte Modell unterstellt eine regulatorische Funktion der Sumoylierung für den Transport des CFTR-Proteins durch den Golgi und dessen weiteren Transport zur Plasmamembran. Dabei wird angenommen, dass die Sumoylierung eine Konformationsänderung in den sensiblen Regionen der Intrazellulärdomäne und des C-Terminus von CFTR bewirkt und benachbart gelegene Sortierungsmotive, wie das Di-Leucin-Motiv, in ihrer Funktion unterstützen oder behindern kann. Kürzlich publizierte Arbeiten zur molekular modellierten 3D-Struktur von CFTR, die durch biochemische Daten unterlegt sind, stützen diese Beobachtung. Danach stellen die NBD-1 und die zytoplasmatischen Loops in der Membran-durchspannenden Domäne (MSD-2) eine hochsensitive Region dar, welche durch Punktmutationen in ihrer Tertiärstruktur stark beeinträchtigt werden kann und dadurch den Prozess der funktionalen CFTR-Synthese verhindert (Serohijos et al., 2008; He et al., 2008). Dort ist besonders gezeigt worden, dass das Phenylalanin 508 einen essentiellen Kontakt zwischen der NBD-1 und dem zytoplasmatischen Loop (CL4) in der C-terminalen MSD-2 von CFTR vermittelt. Mutationen in dieser Region, in welcher auch das N-terminal SUMO-Motiv von CFTR liegt, haben demnach weitreichende Konsequenzen.

Diese Beobachtungen miteinbeziehend, käme es danach im ER zu einer Bindung von COPII-Komponenten (Sec24) mit zytoplasmatischen Sequenzen von CFTR (Wang et al., 2004; Tsigelny et al., 2005). Zeitgleich wäre im ERGIC eine Interaktion mit dem die Rückführung zum ER vermittelnden COPI-Komplex vorstellbar (Rowe et al., 1996; Scales et al., 1997, 2000; Nickel and Wieland, 1997; Nickel et al., 1998). Geringfügige Unterschiede in der Faltung von CFTR, die begleitet von in der Einleitung beschriebenen Aktivität von Chaperonen und Co-Chaperonen, würden die Affinität in Richtung COPI oder COPII verändern (Konformationsveränderung oder auch *folding shift*). Die Sumoylierung einer der beiden oder beider SUMO-Motive könnte eine solche Konformationsveränderung bewirken, in dem die für den weiteren Transport im Golgi benötigten Sequenzen zur Interaktion mit den entsprechenden Vesikelkomponenten des AP-1-Komplexes oder des COP-Komplexes zugänglich würden. So könnte man postulieren, dass eine bevorzugte Bindung an COPII (und nachfolgend AP-1) den vorwärtsgerichteten Transport zur Plasmamembran fördern würde. Dagegen würde eine bevorzugte Bindung an COPI eher eine Rückführung von CFTR zum ER begünstigen. Die Sumoylierung könnte in einem Schritt eine

Konformationsveränderung zugunsten von z.B. COPII (oder AP-1) bewirken, welche simultan eine Wechselwirkung mit COPII sterisch verhindern könnte. Somit würde u.a. das Di-Leucin-Motiv in koordinierter Weise mit der Sumoylierung den Vorwärtstransport steuern und auch die Interaktion mit den AP-Komplexen begünstigen. Verlust der Sumoylierung führte danach zur Arretierung im TGN und zur Rückführung zum ER über entsprechend exponierte Sortierungsmotive, die den Rücktransport vermitteln.

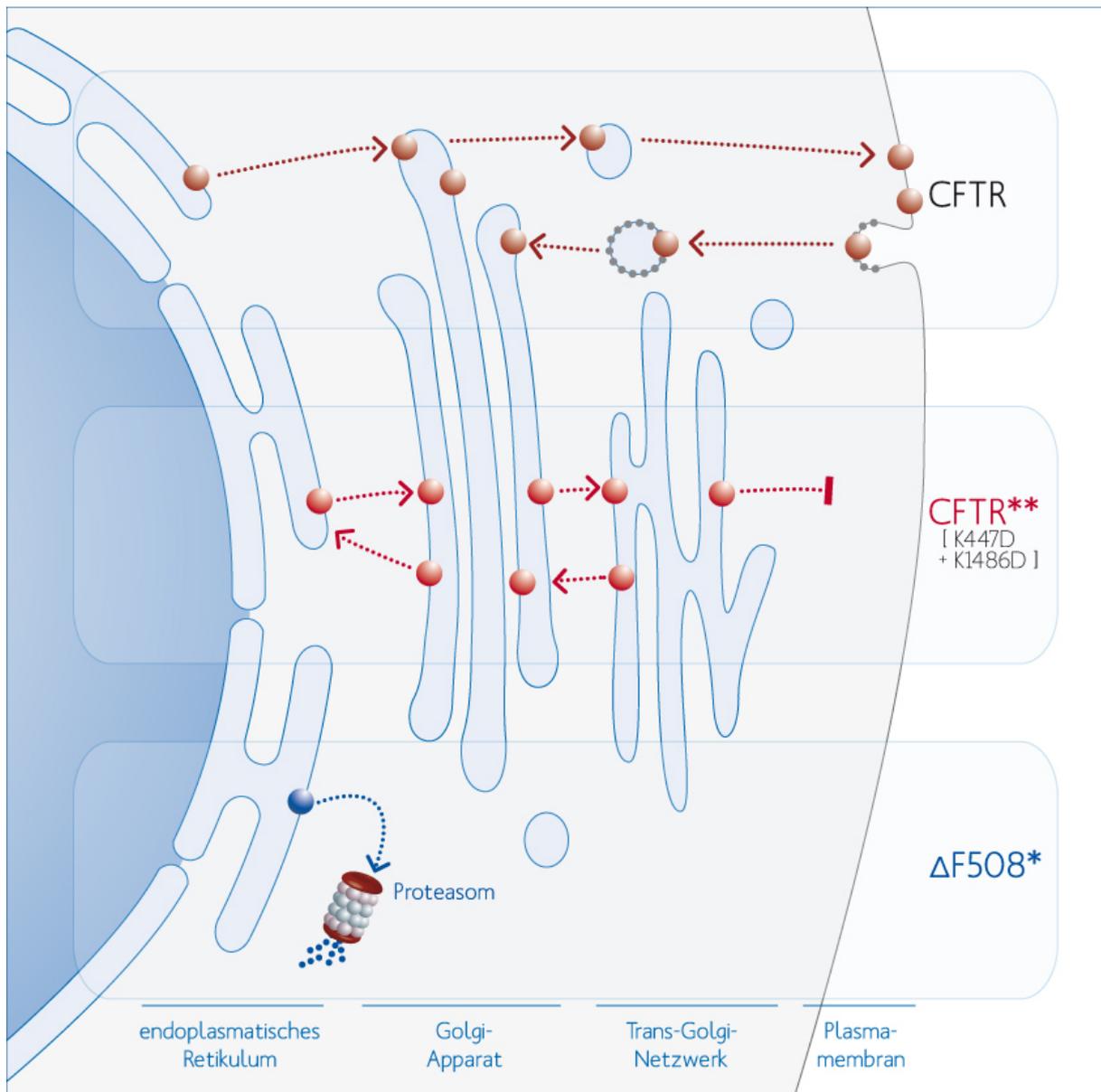


Abbildung 24: CFTR[K447D+K1486D] wird im TGN festgehalten.

Es ist hier der Versuch dargestellt, für drei verschiedene CFTR-Proteine den bislang bekannten intrazellulären Transportweg zu skizzieren. Für das CFTR und besonders für ΔF508 existieren zahlreiche experimentelle Belege, die im Text der Einleitung diskutiert sind. CFTR wird auf dem klassischen oder einem bislang nur für CFTR beschriebenen alternativen Weg aus dem ER über den Golgi und das TGN in Vesikel-assoziiierter Form transportiert. ΔF508 wird aufgrund des durch die Mutation bedingten Faltungsdefektes als

unreif im ER erkannt und dem Proteinabbau im Proteasom zugeführt. Unter bestimmten Zellkulturbedingungen ist auch ein Transport zur Plasmamembran möglich, aber hier nicht dargestellt.

Für CFTR kann hier festgehalten werden, dass die Sumoylierung den Transport zur Plasmamembran hin begünstigt und deren Inaktivierung zur Transportblockade im TGN führt. Die in dieser Arbeit genauer untersuchte Doppelmutante CFTR[K447D+K1486D] zeigt eine auffällige Lokalisation im TGN.

Die hier gewählte Darstellung dient einer vereinfachten und schematischen Skizzierung der für die untersuchten Motive angenommenen Rolle und steht in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Resultaten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die hier modellhaft erstellte Skizze noch erheblich korrigiert und weiter entwickelt werden muss. Weitere Sortierung-Motive im CFTR unterliegen wahrscheinlich einer posttranslationalen Kontrolle und können infolgedessen zusammen mit den hier beschriebenen Sequenzen exponiert bzw. verdeckt werden. Die Summe aus zu einem bestimmten Zeitpunkt zugänglichen oder nicht zugänglichen für den vesikulären Transport benötigten Motive bestimmt demnach in welche Richtung das Protein transportiert wird. Die Resultate zu dem mutierten CFTR-Di-Leucin-Motiv wurden, da bislang nur orientierender Natur und weiterer Verifikation bedürftig, hier noch nicht berücksichtigt.

Erste Experimente mit mutierten CFTR-Proteinen, in welchen das zum SUMO-Motiv benachbart gelegene Di-Leucin-Motiv mutiert war, zeigten bereits, dass eine Wechselwirkung mit dem benachbarten SUMO-Motiv wahrscheinlich ist und einen möglichen Einfluss auf Reifung (Glykosylierungsstatus) und Interaktionseigenschaften von CFTR mit AP-1 und AP-2 haben kann. Wie im Ausblick dargelegt, bedürfen diese vorläufigen Experimente einer genauen Abklärung im Rahmen einer vollständigen Beschreibung der Funktion der für den CFTR-Transport relevanten Sortierungs- und Regulationsmotive.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Die hier vorgelegten Resultate zeigen, dass CFTR zwei klassische SUMO-Motive trägt, welche spezifisch sumoyliert werden können. Eine Inaktivierung der beiden SUMO-Motive führt zur Arretierung von CFTR im Golgi-Apparat. Dazu wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation eindeutig demonstriert, dass in den SUMO-Motiven mutiertes CFTR mit einem für den Golgi-Apparat spezifischen Markerprotein co-lokalisiert. Die Fraktionierung intrazellulärer Kompartimente bestätigte auch die bekannte Arretierung von $\Delta F508$ im ER.

Damit stellt die Sumoylierung einen völlig neuartigen Mechanismus zur Kontrolle des intrazellulären Transportes von CFTR dar, welcher über die Reifung hinausgehend womöglich auch einen Einfluss auf die Aktivität von CFTR haben könnte.

Aktuell bleibt noch ungeklärt, auf welche Weise die Bindung von SUMO an CFTR mittelbar oder unmittelbar die weitere Prozessierung von CFTR beeinflusst. Sowohl die Wechselwirkung mit möglichen Komponenten der intrazellulären Transportmaschinerie, aber auch mit den Komponenten des Ubiquitinsystems und weiterer, die räumliche Struktur des CFTR-Proteins modifizierender Faktoren (z.B. Phosphorylierungen), sollten zukünftig untersucht werden.

Die Schlussfolgerungen in den publizierten Arbeiten zur Funktion von COPI für den CFTR-Transport und die CFTR-Funktion unterscheiden sich dahingehend, ob der intakte COPI-Komplex eher für die Ausbildung des aktiven Chloridkanals notwendig ist oder auch für den Transport und die Lokalisation in der Plasmamembran. Der erstere Fall wäre konsistent mit anderen Publikationen, wonach der Transport von CFTR nach Export aus dem ER unabhängig von COPI verlaufen kann. Die aktuell in der Literatur diskutierten Resultate zeigen, dass komplexe Glykosylierungen von CFTR nicht erforderlich sind, um die Plasmamembran zu erreichen. Insgesamt wäre demnach der intrazelluläre Transport außerhalb des ER unabhängig von einer korrekten Faltung von CFTR zu einem funktionsfähigem Chloridkanal. Übereinstimmend damit würde COPI dann als die CFTR-Faltung unterstützender Faktor beschreibbar sein, welcher die Eigenschaften eines Chaperons im ERGIC ausübt.

Aktuell muss wohl noch offen bleiben, ob COPI eher den Transport von CFTR zur Plasmamembran vermittelt und damit auch zur korrekten Ausbildung eines

Chloridkanals beiträgt oder sehr viel unmittelbarer die korrekte Faltung vermittelt ohne primär für den Transport verantwortlich zu sein. Weiterhin ungeklärt bleibt, auf welche Weise COPI mit CFTR interagiert, z.B. über ein weiteres noch zu identifizierendes Protein, welches mit COPI und CFTR interagiert oder auf direktem Wege, im Rahmen einer physischen Interaktion. Auch ist vorstellbar, dass die Abwesenheit von COPI den parallelen Transport von CFTR-bindenden Proteinen verhindert, die aber zur Ausbildung eines funktionalen Chloridkanals in der Plasmamembran benötigt würden. Die bislang erhobenen und hier vorgelegten Resultate lassen noch keine diesbezüglichen Schlussfolgerungen zu. Zu ihrer weiteren Abklärung bieten sich die in Kürze nachfolgend skizzierten Experimente an. Es müssten die Di-Leucin-Motive einzeln durch die Einführung einer Mutation inaktiviert werden. Anschließend sollte im Rahmen von sog. *pulse-chase*-Experimenten der weitere Transport zur Plasmamembran verfolgt werden und parallel dazu, mittels Dichtegradientenzentrifugation, der mögliche Verbleib in weiteren subzellulären Strukturen des sekretorischen Weges bestimmt werden. Damit würde man aussagekräftige Daten zur intrazellulären und Kompartiment-assoziierten Verteilung von CFTR erhalten.

Es sollten die intrazellulären Resultate in einen Zusammenhang mit den an der Membran messbaren Kanaltransporteigenschaften des membranständigen CFTR gebracht werden. Damit ließe sich schließlich eine umfassende Hypothese zum Einfluss der Sumoylierung nicht nur auf den Transport und die Lokalisation sondern auch auf die Aktivität des CFTR Proteins formulieren. Eine solche Hypothese wäre physiologisch relevant und könnte Ausgangspunkt von rationalen Ansätzen zur Identifikation pharmakologisch aktiver Moleküle sein, die einen Transportdefekt bei Membranproteinen zu korrigieren vermögen.

Erste Experimente zur Bestimmung des Chlorid-Efflux mit den im SUMO-Motiv mutierten CFTR-Proteinen sind im Rahmen einer Kooperation initiiert worden und zeigen Aktivitätsunterschiede, denen weiter nachgegangen wird.

Darüber hinaus wären Experimente angezeigt, die auf einen Nachweis der Interaktion intakten und im SUMO-Motiv mutierten CFTR mit COPI- und COPII-Komponenten abzielen und dabei eine mögliche Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer oder beider funktionsfähiger SUMO-Motive im CFTR nachweisen könnten. Co-Immunopräzipitationsexperimente mit den Clathrin-AP-Komplexen würden weiterhin zeigen, welche vesikulären Komponenten zeit- und ortsabhängig in den Transport

involviert sind. Auch mögliche Effekte der Sumoylierung auf den für CFTR beschriebenen nicht-konventionellen Transportweg sollten untersucht werden. Der Einsatz bzw. die Überexpression von spezifischen Komponenten, die entweder den konventionellen oder den nicht-konventionellen Weg blockieren, ist dazu angezeigt.

Zellversuche zur kompetitiven Bindung von SUMO und Ubiquitin an CFTR und $\Delta F508$ sollten adressieren, ob und auf welche Weise die Sumoylierung einem verstärkten Proteinabbau entgegenwirkt. Im spezifischen Wettbewerbsfall würde ein durch Ubiquitinbindung verursachtes Signal in Gegenwart von SUMO abnehmen.

Die in das SUMO-Motiv eingeführten Mutationen könnten die SUMO-Bindung an CFTR und damit die Sumoylierung nicht vollständig funktional inaktiviert haben. Eine residuale Aktivität würde jedoch die oben diskutierten Unterschiede nicht einfach erklären und die vorgelegten Resultate diesbezüglich auch nicht invalidieren.

Man würde dann immer noch argumentieren, dass bereits eine relevante Herabsetzung der Funktionalität der SUMO-Motive den Ausfall der beobachteten Effekte bewirkt hätte. Umgekehrt könnte die durch das Aspartat eingeführte negative Ladung *per se* strukturelle Veränderungen im CFTR-Protein verursachen und damit sequenzunabhängig dazu beitragen, dass SUMO-Proteine nicht mehr an das SUMO-Motiv binden können. Zur Abklärung könnte man nun einen konservativen Aminosäureaustausch im Lysin des SUMO-Motives durchführen und nachfolgende mögliche Effekte auf SUMO-Bindung und Transport von CFTR untersuchen. Die in Gegenwart überexprimierter SENP1 beobachteten Effekte gleichen den durch Mutation im SUMO-Motiv bewirkten Defekten und unterstützen stark die Hypothese, wonach die Inaktivierung des SUMO-Motivs spezifische und nicht durch eine zusätzliche negative Ladung bedingte unspezifische Konsequenzen hat.

Es ist ein attraktives Ziel, die Relevanz der Sumoylierung für die Synthese weiterer ABC-Transporter zu demonstrieren, insbesondere für diejenigen, welche SUMO-Motive an zur CFTR-Sequenz vergleichbarer Position tragen. Schließlich würde auf diesem Weg ein neuartiger Regulationsmechanismus im Reifungsgeschehen komplexer Membranproteine etabliert werden und auch für die Medikamentenentwicklung adressierbar.

7. Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analyse-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Zellkulturmedien und Medienzusätze stammten von Invitrogen (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), PAA (Cölbe) und Becton Dickinson (Heidelberg).

Die allgemein gebräuchlichen Puffer und Lösungen wurden mit H₂O bidest, welches von der Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU bezogen wurde, hergestellt.

Anwendungsspezifische Puffer werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

7.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Geräte und Materialien	Modell	Hersteller
Agarosegelkammer	Agagel: Mini-SUB Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filterpapier (Westernblot)	Dickes Filterpapier 15 x 20 cm, 30 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filme	Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Entwicklungsmaschine	CP 1000	AGFA, Köln
Gewebekulturflaschen	Cellstar: Tissue Culture Flasks; 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturtestplatte	Gewebekulturtestplatte mit 6 oder 12 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Heizblockinkubator	Typ 50126101	Liebisch Labortechnik, Bielfeld
Konfokales Mikroskop	Model LSM510-META	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kühlzentrifuge	Model J2-21 Centrifuge	Beckmann, München
Mikroskop	Axiovert 40 c	Carl Zeiss Jena GmbH,

		Jena
PCR-Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Probenrad	L 28	Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Schwabach
SDS-Gelelektrophorese-kammer	Running/Transfer: Mini Protein Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilwerkbank	Lamin Air HBB 2472	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischkühlzentrifuge	5810R	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Nitrozellulose	HybondTM-ECL Amersham	Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ultrazentrifuge	TIX Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Zellinkubator	Hera Cell 240	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

7.1.3 Enzyme

Enzyme sowie dazugehörige Reaktionspuffer wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen gewählt.

Enzyme	Hersteller
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Pfu</i> TURBO DNA-Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Bam</i> H I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Dpn</i> I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Eco</i> R I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Eco</i> R V	New England BioLabs GmbH, Frankfurt

<i>Nco</i> I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Nde</i> I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Not</i> I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Pst</i> I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
<i>Sal</i> I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt

7.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Bezeichnung	Clone	Source	WB	Hersteller
AP-1	100/3	Maus Ascites	WB: 1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AP-2	100/2	Maus Ascites	WB: 1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calnexin	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Stressgen Biotrend GmbH; Köln
Caveolin	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Upstate Biotech, Charlottesville, VA, USA
CFTR	M3A7	Maus	WB: 1:1000 IP: 1 µl	Upstate Biotech, Charlottesville, VA, USA
CFTR	MM 13-4	Maus	WB: 1:1000 IP: 1 µl	Upstate Biotech, Charlottesville, VA, USA
CFTR	L12B4	Maus	WB: 1:1000	Upstate

7. Material und Methoden

			IP: 2 µl	Biotech, Charlottesville, VA, USA
EEA 1	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling, Boston, MA, USA
Flag	Monoclonal	Maus	WB: 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GM 130	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling, Boston, MA, USA
Hsp 70	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Stressgen
Na/K-ATPase	464.6	Maus	WB: 1:5000	Cell Signaling, Boston, USA
SENP1	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Zymed, Wien
SUMO 1	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Zymed, Wien
SUMO 1	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling, Boston, MA, USA
SUMO 2/3	Polyclonal	Kaninchen	WB: 1:1000	Zymed, Wien
TGN38	Polyclonal	Ziege	WB: 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ubc9	Clone 50	Maus	WB: 1:1000	BD Deutschland GmbH, Heidelberg
Ubiquitin	Monoclonal	Maus	WB: 1:250	Zymed, Wien
Xpress	Monoclonal	Maus	WB: 1:1000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Gekoppelt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege	HRP	1:20 000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Anti-Rat IgG (H+L)	Ziege	HRP	1:20 000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Anti-Rabbit IgG (H+L)	Ziege	HRP	1:20 000	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Anti-Goat IgG (H+L)	Kaninchen	HRP	1:20 000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

7.1.5 Plasmide

Die Tabelle 7.1.5 listet in dieser Arbeit verwendete, nicht selbst erstellte Plasmide auf.

Plasmid	Referenz
pcDNA3.1+ (Amp. ^R)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA3.1+/HISc (Amp. ^R)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pFLAG CMV6a (Amp. ^R)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGFP-N1 (Amp. ^R)	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pGADT7 (Amp. ^R)	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
pGBKT7 (Kana. ^R)	CLONTECH Laboratories, Heidelberg

7.1.6 *Escherichia coli*-Stämme

Die Tabelle 7.1.6 listet die verwendeten chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme auf.

Stamm	Merkmal	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α TM	F- Φ 80lacZC Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XL10-Gold	Tetr Δ (mcrA)183 Δ (mcrB-hsdSMR-mrr)173	Stratagene,

	endA1supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte[F' proAB lacI _q ZΔM15 Tn10(Tetr) Amy Cam _r]a	La Jolla, CA, USA
--	--	-------------------

7.1.7 Kulturmedien für Bakterien- und Gewebekulturen

Die Tabelle 7.1.7 listet die verwendeten Kulturmedien und Zusätze für Bakterien- und eukaryotische Zellkulturen auf.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller/Referenz
LB-Medium (Luria-Bertani, Vollmedium)	1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Pepton aus Casein; pH 7,5 mit NaOH.	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/L Agar-Agar	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Zellkulturmedium: mit 3,7 g/L NaHCO ₃ und 1,0 g/L D-Glucose; 2mM L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM	Zellkulturmedium für Transfektionen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einfriermedium	Zellkulturmedium zum Einfrieren von Zellen: 50% (v/v) DMEM, 40 % (v/v) FCS, 9 % (v/v) DMSO, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	
Fötales Kälberserum (FCS)		Invitrogen GmbH, Karlsruhe

L-Glutamin 200mM		GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Antibiotikum für Zellkulturmedien: 50 U/ml (Wirkkonzentration)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kanamycin-Sulfat	Antibiotikum für Bakterienkulturen: 40 µg/ml (Wirkkonzentration)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampicillin-Lösung (Stammlösung 1000x)	50 mg/ml gelöst in 70% Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)	Für das Passagieren von adhärennten Kulturen:	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden verschiedene kommerziell erhältliche *Kits* von

QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) oder Macherey-Nagel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren) verwendet. Je nach erforderlicher Plasmid-DNA-Menge wurde der Miniprep *Kit* oder der Plasmid Midi *Kit* verwendet. Die Präparationen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die PCR wurde durch die *Taq*-DNA-Polymerase (New England BioLabs), die *Pfu*-DNA-Polymerase bzw. *Pfu*-TURBO-DNA-Polymerase (Invitrogen Karlsruhe, Deutschland) katalysiert (Tab. 7.1.3). Die in der PCR verwendeten Primer (Metabion, Martinsried) sind in den Tabellen 7.2.3.2, 7.2.3.4, 7.2.3.5 und 7.2.2.6 aufgelistet. Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gelextraktions-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Restriktionen von DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen der Hersteller New England BioLabs durchgeführt (Tab. 7.1.3). Je nach verwendetem

Enzym wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer und die benötigte Menge an Enzym verwendet. Die Restriktionsreaktion verlief im Heizblock oder im Wasserbad bei 37 °C für 1 bis 2 h.

Ligationen wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England BioLabs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Ligationsreaktion verlief bei Raumtemperatur über Nacht (ÜN) und wurde anschließend in *E. coli* DH5α transformiert. Die Transformationen

von Plasmiden oder Ligationsansätzen erfolgten durch Transformation in chemisch kompetenten *E. coli* Stämme (Tab. 7.1.6) nach Herstellerangaben.

Die Zellen wurden nach der Transfektion in 500 µl 37 °C warmes LB- oder YPD Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und 1 h im Schüttler bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen entsprechend der Antibiotika-Resistenz des transformierten Plasmids, auf Ampicillin oder Kanamycin versetzte LB-Agar-Platten ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C kultiviert (Medien und Zusätze siehe Tab. 7.1.7).

7.2.2 Verwendete Kits

Kits	Hersteller
NucleoBond AX500 Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Gelextraktions Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

7.2.3 Klonierung

7.2.3.1 Yeast Two-Hybrid Konstrukten von CFTR, Ubc9 und SUMO 1-4

Die pcDNA/HISc-CFTR- und pcDNA/HISc- Δ F508-exprimierende Vektoren wurden von Frau Dr. Judith Glöckner-Pagel (Dr. von Hauner'sches Kinderspital LMU München) zur Verfügung gestellt (korrespondierende mRNA-Referenzsequenz, annotiert in der NCBI-GenBank, *accession number* NM_000492, Version: NM_000492.3, GI:90421312). Für die Durchführung des *Yeast-Two-Hybrid* (Y2H), wurden aus dem 4320 bp großen CFTR-Gen Hefe-kerngängige DNA-Konstrukte zur Translation hergestellt. Hierfür wurden die intrazellulären Bereiche von CFTR in den pGADT7- Vektor kloniert (Abbildung 25). Die entsprechenden cDNA-Sequenzen der Aminosäuresequenzen 1 bis 80 (CFTR-N-Term), 351 bis 859 (IC: Intrazellulärdomäne; CFTR-IC und Δ F508-IC) sowie 1219 bis 1386 (NBD2-Terminus; CFTR-NBD2) wurden mittels PCR amplifiziert (7.2.1). Die Konstrukte pcDNA/HISc-SUMO und pFLAG CMV 6a-Ubc9 wurden mit entsprechenden Primern (Tab. 7.2.3.6) aus einer Milzbibliothek mittels PCR (Tab. 7.2.1) amplifiziert. Die eingesetzten Primer beinhalteten eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme, welche in der Primertabelle (Tab. 7.2.3.6) angegeben sind. Das Umklonieren in den pGADT7 bzw. pGBKT7 erfolgte wie für die CFTR-Konstrukten beschrieben. Die bei der PCR verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für bestimmte Restriktionsenzyme. Das PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben geschnitten, und die gewünschten DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese von den übrigen DNA-Fragmenten getrennt und gereinigt (7.2.1). Gleichmaßen wurde der *Yeast-Two-Hybrid-Vektor* pGADT7 (Tab. 7.1.5, CLONTECH Laboratories, Heidelberg) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.

Gereinigte PCR- und Vektorfragmente wurden nach Herstellerangaben durch T4-DNA- Ligase ligiert (7.1.3). Von den Ligationsansätzen wurden 1-2 μ l in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (7.1.6).

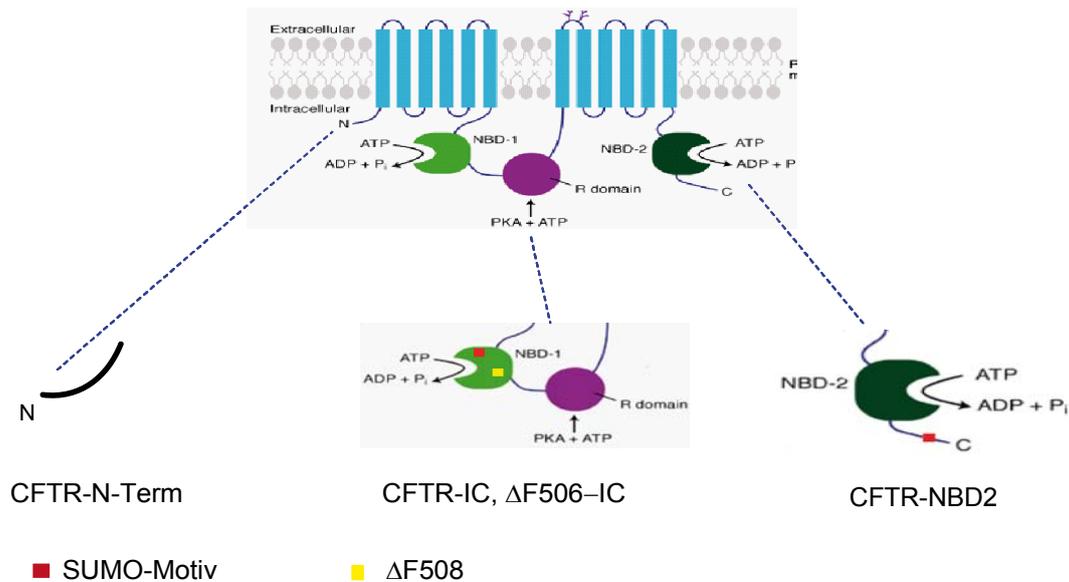


Abbildung 25: Schematische Darstellung der CFTR-Proteindomänenstruktur und der intrazellulären Y2H-Konstrukte.

Der intrazellulär gelegene N-Terminus besitzt kein SUMO-Motiv (Aminosäure 1 bis 80, CFTR-N-Term). Die 508 Aminosäuren (AS 351-859) umfassende Intrazellulärdomäne im CFTR und in $\Delta F508$ (CFTR-IC, $\Delta F508$ -IC) weist an Position 447 das zentrale Lysin des ersten SUMO-Motivs ■ und an Position 508 die Deletion F508 ■ des Phenylalanins auf. Sowohl das SUMO-Motiv wie auch die Deletion F508 sind in der NBD-1 lokalisiert. An dem 167 Aminosäuren (1219-1386) umfassenden C-Terminus befindet sich an der Aminosäureposition 1468 das zweite SUMO-Motiv ■ (bezogen auf das Lysin).

7.2.3.2 Yeast-Two-Hybrid-CFTR – Konstrukte

Konstrukt	Plasmid	DNA Matrize	Primersequenz (5' nach 3')
CFTR-N-Term	pGADT7	pcDNA/HISc-CFTR	GGA ATT CCA TAT GAT GCA GAG GTC GCC TCT G
			AAC TGC AGT CTC CAG AAA AAA CAT GCG CGA AG
CFTR-IC und CFTR-IC[K447D]	pGADT7	pcDNA/HISc-CFTR	GGA ATT CCA TAT GAC TCG GCA ATT TCC CTG G
			AAC TGC AGA GCT CTT GTG GAC AGT AAT ATA TCG AAG GTA

CFTR-NBD2 und CFTR- NBD2[K1468D]	pGADT7	pcDNA/HISc- CFTR	GGA ATT CCA TAT GTA CAC AGA AGG TGG AAA TGC CA
			AAC AGC ACT GCA GCT AAA GCC TTG TAT CTT G
ΔF508-IC und ΔF508-IC[K447D]	pGADT7	pcDNA/HISc- ΔF508	GGA ATT CCA TAT GAC TCG GCA ATT TCC CTG G
			AAC TGC AGA GCT CTT GTG GAC AGT AAT ATA TCG AAG GTA

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „**fett**“ hervorgehoben:

Nde I = **CATATG**; *Pst* I = **CTGCAG**. Die DNA-Matrize, welche die gesamte humane CFTR-cDNA enthält (7.2.3.1), wurde von Frau Dr. Judith Glöckner-Pagel zur Verfügung gestellt. Alle Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erzeugt.

7.2.3.3 Yeast-Two-Hybrid-Ubc9 – Konstrukte

Konstrukt	Plasmid	DNA Matrize	Primersequenz (5' nach 3')
Ubc9	pGADT7	pFLAG CMV 6a-Ubc9	CAT GCC ATG GTT ATG AGG GCG CAA ACT TCT TGG C
			CGG GAT CCT TAT GAG GGC GCA AAC

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch die Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „**fett**“ hervorgehoben: *Nco* I = **CCATGG**;
*Bam*HI = **GGATCC**.

7.2.3.4 *Yeast-Two-Hybrid-SUMO* - Konstrukte

Konstrukt	Plasmid	DNA Matrize	Primersequenz (5' nach 3')
SUMO 1	pGBKT7	pcDNA/HISc-SUMO 1	CAT GCC ATG GAG ATG TCT GAC CAG
			CGG GAT CCC TAA ACT GTT GAA TGA CC
SUMO 2	pGBKT7	pcDNA/HISc-SUMO 2	CAT GCC ATG GCC GAC GAA AAG CCC
			CGG GAT CCT CAG TAG ACA CCT CCC GT
SUMO 3	pGBKT7	pcDNA/HISc-SUMO 3	CAT GCC ATG GCC GAG GAG AAG CCC AAG
			CGG GAT CCC TAG AAA CTG TGC CCT GC
SUMO 4	pGBKT7	pcDNA/HISc-SUMO 4	CAT GCC ATG GCC AAC GAA AAG CCC ACA
			CGG GAT CCT CAG TAG ACA CCT CCC GT

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch die Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „fett“ hervorgehoben: *Nco* I = **CCATGG**; *Bam*HI = **GGATCC**.

7.2.3.5 Eukaryotische Expressionskonstrukte

Die pcDNA/HISc-exprimierenden SUMO1- bis SUMO-3 Vektoren wurden von Frau Dr. Judith Glöckner-Pagel (Dr. von Hauner'sches Kinderspital LMU München) zur Verfügung gestellt.

Für die Klonierung der Ubc9-, SUMO-IV- und SENP1-Konstrukte in eukaryotische Expressionssysteme wurde eine humane cDNA-Milzbibliothek (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die eingesetzten Primer beinhalteten eine Schnittstelle für die

Restriktionsenzyme, welche in der Primertabelle (Tab. 7.2.3.6) angegeben sind. Diese amplifizierten DNA-Fragmente sowie die Plasmide, pcDNA/HISc, pFLAG CMV 6a und pEGFP-N1 (Tab. 7.1.5) wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (7.1.3). Die verwendeten Primer für die Generierung der Konstrukte sind in der Tab. 7.2.3.4 aufgelistet.

7.2.3.6 pcDNA/HISc-, pFLAG- und pGFP-N1-Konstrukte von SUMO 4, Ubc9, SENP1 und CFTR

Konstrukt	Restriktions-enzym	Plasmid	DNA Matrize	Primersequenz (5' nach 3')
SUMO 4	<i>BamH I</i>	pcDNA/HISc	Milzbibliothek	CGC GGA TCC ATG GCC AAC GAA AAC CCC ACA
	<i>Not I</i>			ATA AGA ATG CGG CCG CTC AGT AGA CAC CTC CCG T
Ubc9	<i>EcoR I</i>	pcDNA/HISc	Milzbibliothek	CGG AAT TCA TGT CGG GGA TCG CCC TCA GCA GA
	<i>EcoR V</i>			CGG ATA TCT TAT GAG GGC GCA AAT TTC TTG GC
SENP1	<i>EcoR I</i>	pFLAG-CMV 6a	Milzbibliothek	CGG AAT TCC ATG GAT GAT ATT GCT GAT
	<i>Sal I</i>			GCG TCG ACG TCA CAA GAG TTT TCG GTG GAG

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „**fett**“ hervorgehoben.

7.2.4 Ortsspezifische Mutagenese

Die Einführung von sequenzspezifischen Mutationen in CFTR und $\Delta F508$ wurde nach der *QuickChange Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, Amsterdam) durchgeführt. Ausgangsvektoren für die Mutagenese waren pcDNA/HISc-CFTR und pcDNA/HISc- $\Delta F508$. Für die Mutagenese wurde ein komplementäres Primerpaar synthetisiert (Metabion, Martinsried), dessen Oligonukleotidsequenz die gewünschte Mutation enthielt (Tab. 7.2.4.2). Um neusynthetisierte Plasmide gegenüber der DNA-Matrize anzureichern, wurde der PCR-Ansatz mit 0,5 μ l (5 U) *Dpn* I bei 37 °C für 16 h enzymatisch behandelt und die Reaktion bei 80 °C für 20 min inaktiviert. *Dpn* I spaltet spezifisch die bakterielle, methylierte Matrizen-DNA (Vovis and Lacks, 1977), nicht jedoch die mittels PCR-synthetisierte DNA.

7.2.4.1 Tabelle: Reaktionsansatz der Mutagenese

Einzelreaktionsansatz	
5 μ l	10x Reaktionspuffer
5-50 ng	dsDNA (<i>template</i>)
125 ng	Primer 1
125 ng	Primer 2
1 μ l	dNTP
1 μ l	<i>Pfu Turbo</i> DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)
dH ₂ O auf 50 μ l Volumen auffüllen	

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 Sekunden
12 – 18	95°C	30 Sekunden
	55°C	1 Minute
	68°C	1 Minute / kb der Plasmidlänge

7.2.4.2 Tabelle: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese zur Erzeugung von CFTR- und Δ F508-Konstrukten.

Konstrukt	Plasmid	DNA Matrize	Primersequenz; vor- und rückwärts (5' nach 3')
CFTR [K447D] und Δ F508 [K447D]	pcDNA/HISc	pcDNA/HISc-CFTR bzw. pcDNA/HISc- Δ F508	GTC CTG AAA GAT ATT AAT TTC GAG ATA GAA AGA GGA CAG TTG TTG G CCA ACA ACT GTC CTC TTT CTA TCT CGA AAT TAA TAT CTT TCA GGA C
CFTR [K1468D] und Δ F508 [K1468D]	pcDNA/HISc	pcDNA/HISc-CFTR bzw. pcDNA/HISc- Δ F508	CCC CAG ATT GCT GCT CTG GAA GAG GAG ACA GAA GAA GAG G CCT CTT CTT CTG TCT CCT CTT CCA GAG CAG CAA TCT GGG G

Zur ortsgerichteten Mutagenese der CFTR- und Δ F508-Sequenz sind die gleichen Oligonukleotide eingesetzt worden. Aus dem Lysin an Aminosäureposition 447 bzw. 1468 wurde durch die Mutation ein Aspartatrest. Die Position der Mutation ist in der Oligonukleotidsequenz „**fett**“ hervorgehoben. Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an.

	Plasmid	DNA Matrize	Primersequenz vor- und rückwärts (5' nach 3')
CFTR[XL] und CFTR [K447D+XL]	pcDNA/HISc	pcDNA/HISc-CFTR bzw. pcDNA/HISc-CFTR[K447D]	AGC AAC CGC CAA CAA CTG (tcc tct) TCC TTC TAT CTT GAA ATT AAT ATC GAT ATT AAT TTC AAG ATA GAA GGA (aga gga) CAG TTG TTG GCG GTT GCT

Zur Erzeugung von CFTR-Konstrukten mit einer Deletion im Di-Leucin-Motiv [XL] wurden die in der Tabelle angegebenen Oligonukleotide eingesetzt. Die zwei deletierten Leucine sind in der Tabelle mit kleinen Buchstaben in Klammern angegeben, fehlen aber natürlich in der eingesetzten Sequenz. Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an.

7.3 Der *Yeast-Two-Hybrid* (Y2H) Assay

Das Y2H-System ist eine genetische Methode zur Erfassung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Dieser wurde ursprünglich 1989 von Fields und Song entwickelt und seitdem modifiziert (Fields and Song, 1989; Chien et al., 1991; Uetz, 2002).

Der Y2H wurde entsprechend den Angaben im Matchmaker GAL4 *Two-Hybrid-System 3 User Manual* (Clontech GmbH) durchgeführt.

7.3.1 Tabelle: Medien und Agarplatten die zur Durchführung des Y2H benötigt wurden.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller / Referenz
YPD Medium	50 g/l YPD	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
YPD Agar	50 g/l YPD + 20 g/l Agar	
10 x Lithiumacetat	1 M Lithiumacetat pH 7,5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
10 x TE	0,1 M Tris-HCl 10 mM EDTA pH 7,5	
50 % PEG 3350	50 g Polyethylenglykol, ad 100 ml mit dH ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

7. Material und Methoden

PEG 40 %/Lithiumacetat	8 ml 50% PEG 1 ml 10 x TE 1 ml 10 x Litiumacetat	
SD 2(-)-Platten (Synthetisches Minimalmedium ohne Leu und Trp)	26,7 g/l Minimal SD Base 0,6 g/l DO Supplement –A/-H/- Leu/-Trp 10 ml/l 100 x Histidin (2 g/l) 10 ml/l 100 x Adenin (2 g/l) 20 g/l Agar	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
SD 3(-)-Platten (Synthetisches Minimalmedium ohne His, Leu und Trp)	26,7 g/l Minimal SD Base 0,6 g/l DO Supplement Ade ⁻ /His ⁻ /Leu ⁻ /Trp ⁻ 10 ml/l 100 x Adenin (2 g/l) 1 M 3 AT (3-amino-1, 2, 4 – Triazol) 20 g/l Agar	CLONTECH Laboratories, Heidelberg
X α Gal	20 mg/ml Dimethylformamide	CLONTECH Laboratories, Heidelberg

Zunächst werden 3 - 4 Hefeklone (*Saccharomyces cerevisiae*, AH 109; Clontech) in 50 ml YPD inokuliert und für 24 h bei 30°C auf dem Rüttler (240 rpm) inkubiert. 30 ml der Übernachtskultur werden zu 300 ml YPD gegeben und erneut bei 30°C auf dem Rüttler bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 inkubiert. Mittels Zentrifugation bei 2200 rpm über 5 min werden die Zellen sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment wird in 50 ml 1 x TE resuspendiert. Durch erneutes Zentrifugieren (5 min bei 2200 rpm) wird das gewonnene Zellsediment in 1,5 ml sterilem 1 x TE / 1 x Lithiumacetat aufgenommen. Jeweils 0,1 µg pGADT7- und pGBKT7-Konstrukt (Tabelle 7.2.3.2; 7.2.3.3; 7.2.3.4) werden zu 100 µl Hefezellen gegeben und gemischt. Dem Hefe/Plasmidgemisch werden 600 µl PEG/Lithiumacetat zugefügt und 10 min gemischt. Anschließend wird für 30 min bei 30°C auf dem Rüttler (240 rpm) inkubiert. Dem Hitzeschock für 15 min bei 42°C folgt, nach Zugabe von 70 µl DMSO, eine Inkubation auf Eis für 5 min. Es folgt eine erneute Zentrifugation bei

2200 rpm für 10 min. Das Zellpellet wird nun in 500 µl 1 x TE aufgenommen und das gesamte Volumen wird auf SD 2(-)-Platten für 3-8 Tage bei 30°C inkubiert.

Zum Ausstempeln auf SD 3(-)-Platten, werden diese kurz vor Gebrauch mit 100 µl X- α -Gal behandelt. Ein gewachsener Hefeklon pro Ansatz, wird in 100 µl dH₂O resuspendiert und mit einem Stempel auf die mit X α Gal behandelte Platte gedrückt. Die Platte wird erneut bei 30°C inkubiert, bis sich blau gefärbte Hefekolonien zeigen.

7.4 Zellkulturmethoden

7.4.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Zellkulturen wurden in einer sterilen Arbeitsbank angelegt, wobei die eingesetzten Medien, Lösungen und Geräte steril behandelt waren. Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im entsprechenden Medium inkubiert. Zur Passage der adhärenenten Zellen wurden diese zunächst mit 5 ml PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 1 ml Trypsin-EDTA für circa 5-10 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 9 ml Nährmedium gestoppt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen aus einer dicht bewachsenen 75 cm²-Kulturflasche abzentrifugiert (300 g, 5 min), in 7 ml Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

7.4.1.1 Tabelle: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Medium	Bezugsquelle
CHO	Hamster Ovarzellen	DMEM, 10% FCS, 50 U/ml Pen/Strep., 2 mM L-Glutamin	ATCC
CFPAC 1	Humane Pankreas Zellen	Iscove's Modified Dulbecco's Medium, 10 % FCS, 50 U/ml Pen./Strep., 2 mM L-Glutamin	ATCC
CHO - CFTR	Hamster Ovarzellen, die	α -MEM, 10% FCS, 50 U/ml	Frau Dr. Glöckner- Pagel

	humanes CFTR exprimieren	Pen./Strep., 2 mM L-Glutamine, 200 μ M Methotrexat	
CHO – ΔF508	Hamster Ovarzellen, die humanes Δ F508-CFTR exprimieren	α -MEM, 10% FCS, 50 U/ml Pen./Strep., 2 mM L-Glutamin, 200 μ M Methotrexat	Frau Dr. Glöckner-Pagel
T84	humane Lungen Epithel-Zellen	DMEM, 10 % FCS, 50 U/ml Pen./Strep., 2 mM L-Glutamin	ATCC
MDCK	Madin-Darby <i>canine kidney cells</i>	DMEM, 10% FCS, 50 U/ml Pen/Strep., 2 mM L-Glutamin	ATCC

7.4.2 Transiente Transfektion von Gewebekulturzellen

Transfektionen von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA wurden mit FuGENE-HD (Roche) bzw. GenJammer (Invitrogen) durchgeführt. Wie im Herstellerprotokoll angegeben, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 - 90% transfiziert.

Der Transfektionsansatz wurde entsprechend der Kulturgefäßfläche durchgeführt. Das Transfektionsreagenz FuGENE-HD/GenJammer und entsprechende Mengen Plasmid-DNA (siehe Tab. 7.4.2.1) wurden jeweils mit Opti-MEM-Medium (Invitrogen) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Mengen und das Transfektinsreagenz FuGENE-HD/GenJammer vereint, vorsichtig gemischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Zeitgleich ist bei den zu transfizierenden Kulturen ein Mediumwechsel durchgeführt und das DNA-FuGENE-HD/GenJammer-Gemisch hinzugegeben worden.

7.4.2.1 Tabelle: Transfektionsansatz

Plattengröße	DNA Menge	FuGENE-HD bzw. GenJammer	Opti-MEM
12-well Platten	1 µg	2 µl	50 µl
6-well Platten	2 µg	3 µl	100 µl
10 cm Schalen	8 µg	12 µl	400 µl

7.4.3 Präparation von Gesamt-Zelllysaten

Die gesamten Arbeitsschritte wurden bei 4°C im Eisbad durchgeführt. Zur Herstellung der Lysate wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysis-Puffer (Tab. 7.4.3.1) versetzt und mit einem Schaber von dem Plattenboden gelöst. Anschließend wurden die Lysate 8- bis 10 x durch eine Spritze mit feiner Kanüle gezogen. Das Homogenat wurde anschließend zentrifugiert (13000 x g, 15 min) und der Überstand in frische, gekühlte Eppendorfgefäße überführt.

7.4.3.1 Tabelle: Verwendete Lysispuffer

Puffer	Zusammensetzung
Eismann	10 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 0,5 % NP40 0,5 % SDS 0,5 % Deoxycholat pH 7,5
TNT	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% Triton X-100 0,02% SDS pH 8,5 1 mM DTT, Protease Inhibitor Cocktail (1000x), 100 mg/ml PMSF
TNT mit N-Ethylmaleimide	Siehe TNT + 20 mM N-Ethylmaleimide

7.4.4 Co-Immünpräzipitation von Proteinen

Alle Schritte wurden bei 4°C unter Verwendung gekühlter Lösungen ausgeführt.

Zunächst wurden die gewünschte Menge Protein-G-Sepharose-Kügelchen (nachfolgend *Beads* genannt, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) (pro 1 ml Lysat 20 µl Protein-G-Sepharose-*Beads*) in Lysispuffer äquilibriert. Anschließend wurden den *Beads* die Antikörper in entsprechender Konzentration (Tabelle 7.1.4) zugegeben.

Der an Protein-G-Sepharose-gebundene spezifische Antikörper wurde zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad mit dem Zelllysate (7.4.3 Präparation von Gesamt-Zelllysaten) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem Lysispuffer wurden die Sepharose-G-*Beads* in 6x SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und *Westernblot* analysiert.

7.5 Biochemische Methoden

7.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gele

A. Zusammensetzung des Trenngels (Mini-Gel 5 ml)

Die Angaben beziehen sich auf ein Mini-Gel von Bio Rad mit einer Dicke von 1,5 mm.

Polyacrylamid-Gehalt	6%	8%	10%	12%
30% Acrylamid-Bis (ml)	1,0	1,3	1,7	2,0
ddH ₂ O (ml)	2,6	2,3	1,9	1,6
Puffer A (ml)	1,25	1,25	1,25	1,25
20% SDS (µl)	50	50	50	50
10% APS (µl)	50	50	50	50
TEMED (µl)	4	3	2	2

B. Zusammensetzung des 4%igen Sammelgels (Mini-Gel 2 ml)

	2 ml
30% Acrylamid-Bis (ml)	0,33
ddH ₂ O (ml)	1,4
Puffer B (ml)	0,25

20% SDS (μl)	20
10% APS (μl)	20
TEMED (μl)	2

C. Puffer für Trenn- und Sammelgel

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A	36,3 g Tris base (3M) 48 ml 1 N HCl auf 100 ml mit dH ₂ O aufgefüllt, pH 8,9
Puffer B	5,7 g Tris base (0.47 M) 25,6 ml 1M H ₃ PO ₄ auf 100 ml mit dH ₂ O aufgefüllt, pH 6,7

7.5.2 Western Blot - Methode

Bei dem spezifischen Nachweis von Proteinen durch die Immunoblot-Methode wurden

Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose (Hybond™ ECL Amersham Biosciences Europe GmbH) übertragen (Towbin *et al.*, 1979) und spezifisch durch Antikörper nachgewiesen. Bei der verwendeten Blot-Apparatur handelte es sich um eine SDS-Gelelektrophoresekammer Running/Transfer: Mini Protein Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Spannung (120V) für 60 min. Um den Transfererfolg zu überprüfen, wurde die Membran anschließend mit Ponceau-Färbelösung (Tab. 7.5.2.1) gefärbt. Nach Entfernung der Ponceau-Färbung durch Schwenken in Wasser wurde die Membran 30 min in TBSTM (Tab. 7.5.2.1) bei RT geschwenkt. Danach wurde der primäre Antikörper (Tab. 7.1.4) in geeigneter Verdünnung (Herstellerangaben) in TBSTM auf die Membran aufgetragen und ÜN bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem zehnmütigen Waschen mit TBST wurde der sekundäre Antikörper für 60 min (Tab. 7.1.4; HRP = *horseradish peroxidase*-Konjugat) hinzugegeben. Nach drei weiteren zehnmütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran mit der *ECL Western blotting detection reagents* Lösung (Amersham Biosciences Europe GmbH) nach Herstellerangaben entwickelt.

7.5.2.1 Tabelle: Puffer für die Western Blot – Methode

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin 200 ml Methanol 1 ml 20% SDS 700 ml dH ₂ O
TBST	20 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween-20
TBSTM	TBST mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver
10 x Tris-Glycine	144 g Glycine 30 g Tris Base auf 1 l dH ₂ O pH 8,5
10x Elektrophoresepuffer (EP)	250 mM Tris-Base pH 8,6 1,92 M Glycin
1x Laufpuffer	70 ml 10x EP 7 ml 10% SDS ad 700 ml dH ₂ O
6x Probenpuffer	7,5ml Sammelgelpuffer 0,2 g SDS 600 µl Mercaptoethanol 36 mg BPB 1,6 ml Glycerin ad 10 ml dH ₂ O
Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure
Acrylamid/Bis-Acrylamid	30% Acrylamid/Bis-acrylamid; Gibco BRL, Eggenstein

7.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden MDCK-Zellen in einer Gewebekulturtestplatte (24 Vertiefungen) auf Deckgläschen (12 mm Ø) eingesät und mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert (7.2.4.2). Zwei bis drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten mittels eines Tropfen Einbettmedium auf dem Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden zur Aushärtung ÜN bei 4 °C oder für 2 h bei RT gelagert und anschließend mittels eines LSM510-META (UV oder NLO) konfokalen Mikroskopes (Carl Zeiss Jena GmbH) analysiert.

7.5.4 Zelloberflächenbiotinylierung

CHO-Zellen wurden mit einer Zelldichte von ca. 70 % in 10 cm²-Gewebekulturschalen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und nach 24 Stunden transfiziert (7.4.2.1). Nach zwei Tagen wurden die Zellen im Eiswasserbad abgekühlt und zweimal mit eiskaltem PBS (CaCl₂, MgCl₂; Tabelle 7.5.5.1) gewaschen. Alle anschließenden Schritte wurden mit 4 °C kalten Lösungen und auf Eis durchgeführt. Die Kulturen wurden im Kühlraum für 50 min mit 0,4 mg/ml *EZ-link-biotin* (Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH) in 1,3 ml PBS (CaCl₂, MgCl₂) unter ständigem, sanftem Schwenken inkubiert. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS (CaCl₂, MgCl₂) gewaschen. Die Zellen wurden abgeschabt und in 200 µl Eismann- bzw. TNT-Puffer (Tab. 7.4.3.1) für 10 min lysiert (auf Eis) und unlösliche Zellbestandteile bei 13 000 x g, 20 min und 4 °C, abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 20 µl Streptavidin-*Beads* versetzt und ÜN bei 4°C rotiert. Nach zweimaligem Waschen mit Eismann- bzw. TNT-Puffer wurden die Streptavidin-*Beads* mit 6 x Probenpuffer versehen. Die Ansätze wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel (6.5.1) getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

7.5.5 Gradientenzentrifugation

Die CHO-Zellen wurden in 10-cm-Schalen, wie unter 7.4.2 beschrieben, transient transfiziert. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C vorgenommen.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS (CaCl₂, MgCl₂; Tabelle 7.5.5.1) gewaschen und anschließend in 2,5 ml Lösung D aufgenommen. Die Homogenisierung erfolgte wie unter 7.4.3 beschrieben. Die homogenisierte Zellsuspension wurde 10 min bei 2000

rpm zentrifugiert. Der auf diese Weise gewonnene Überstand wurde für 15 min bei 21 000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2,5 ml Lösung D gelöst und vorsichtig über die 2,5 ml Lösung C geschichtet. Nun folgte eine 3 h Zentrifugation bei 81 000 rpm bei 4°C.

Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Röhrchenboden vorsichtig angebohrt, daraufhin ca. 80 Fraktionen (a` 2 Tropfen) gesammelt und mit 6 x Laufpuffer versehen.

7.5.5.1 Tabelle: Puffer für Gradientenzentrifugation

Puffer	Zusammensetzung
PBS (CaCl, MgCl)	PBS mit 0,1 mM CaCl und 1 mM MgCl
Lösung B	0,25 M Sucrose 6 mM EDTA 60 mM Hepes-NaOH pH 7,4
Lösung C	1 Vol Optiprep 1 Vol Lösung B
Lösung D (Homogenisierungsmedium)	0,25 M Sucrose 1 mM EDTA 10 mM Hepes-NaOH pH 7,4

8. Literaturverzeichnis

Accurso FJ. (2007); *Update in cystic fibrosis Am J Respir Crit Care Med* 175: 754–57

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004); *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, Taylor & Francis, Inc.

Aleksandrov L. (2002); *The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. J Biol Chem* 277: 15419–25

Ameen N., Silvis M., Bradbury NA. (2007); *Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. J Cyst Fibros* 6: 1-14

Arnold SM., Fessler LI., Fessler JH., Kaufmann RJ. (2000); *Two homologues encoding human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity. Biochemistry* 7: 2149-63

Bannykh SI., Bannykh GI., Fish KN., Moyer BD., Riordan JR., Balch WE. (2000); *Traffic pattern of cystic fibrosis transmembrane regulator through the early exocytic pathway. Traffic* 1: 852-70

Barlowe C. (2000); *Traffic COPs of the early secretory pathway. Traffic.* 1: 371-7. *Review*

Bayer P., Arndt A., Metzger S., Mahajan R., Melchior F., Jaenicke R. and Becker J. (1998); *Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. J Mol Biol.* 280: 275-286

Bebök Z., Mazzochi C., King SA., Hong JS. and Sorscher EJ. (1998); *The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. J Biol Chem.* 273: 29873-29878

Bednarek SY., Orci L., Schekman R. (1996); *Traffic COPs and the formation of vesicle coats. Trends Cell Biol.* 6: 468-73

Benson MD., Li QJ., Kieckhafer K., Dudek D., Whorton MR., Sunahara RK., Iniguez-Lluhi JA., Martens JR. (2007); *SUMO modification regulates inactivation of the voltage-gated potassium channel Kv1.5. Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 1805-10

Bohren KM. and Nadkarni V. (2004); *AM55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. J Biol Chem* 279: 27233-8

Bonifacino JS., and Dell'Angelica EC. (1999); *Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. J Cell Biol.* 145: 923-6. *Review*

- Bonifacino JS.** and Glick BS. (2004); *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. *Cell*. 23: 153-66. *Review*
- Boehm M.** and Bonifacino JS. (2002); *Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals*. *Gene*. 20: 175-86. *Review*
- Brown CR.,** Hong-Brown LQ., Biwersi J., Verkman AS., Welch WJ. (1996); *Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein*. *Cell Stress Chaperones* 1: 117–25
- Chang XB.,** Cui L., Hou YX, Jensen TJ., Aleksandrov AA., Mengos A., Riordan JR. (1999); *Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis*. *Mol Cell*. 4: 137-42
- Cheng J.,** Bawa T., Lee P., Gong L., Yeh ET. (2006); *Role of desumoylation in the development of prostate cancer*. *Neoplasia*. 8: 667-76. *Review*
- Cheng SH.,** Gregory RJ., Marshall J., Paul S., Souza DW., White GA., O`Riordan CR. and Smith AE. (1990); *Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis*. *Cell*. 63: 827-834
- Chevet E.,** Cameron PH., Pelletier MF., Thomas DY., Bergeron JJ. (2001); *The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation*. *Curr Opin Struct Biol*. 11: 120-4. *Review*
- Chien CT.,** Bartel PL., Sternglanz R., Fields S. (1991); *The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 9578-82
- Cosson P.** and Letourneur F. (1994); *Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs*. *Science*. 263: 1629-31
- Cosson P.** and Letourneur F. (1997); *Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting*. *Curr Opin Cell Biol*. 9: 484-7. *Review*
- Cui L.,** Aleksandrov L., Chang XB., Hou YX., He L., Hegedus T., Gentsch M., Aleksandrov A., Balch WE., Riordan JR. (2007); *Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR*. *J Mol Biol*. 365: 981–94
- Dalemans W.,** Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal RG., Pavirani A., Lecocq JP. and Lazdunski M. (1991); *Altered chloride ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation*. *Nature*. 354: 526-528
- Davidson DJ.** and Dorin JR. (2001); *A model of the proposed structure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 3: 1-27
- Dean M.** (2005); *The genetics of ATP-binding cassette transporters*. *Methods Enzymol*. 400: 409–29

- Denning** GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. (1992); *Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. Nature* 358: 761–64
- Desterro** JM., Rodriguez MS. and Hay RT. (1998); *SUMO-1 modification of IkkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. Mol. Cell.* 2: 233-239
- Desterro** JM., Rodriguez MS., Kemp GD. and Hay RT. (1999); *Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. J Biol Chem.* 274: 10618-10624
- Drumm** ML., Wilkinson DJ., Smit LS., Worrell RT., Strong TV., Frizzell RA., Dawson DC., Collins FS. (1991); *Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in Xenopus oocytes. Science.* 254: 1797-9
- Duden** R. (2003); *ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function. Mol Membr Biol.* 20: 197-207. Review
- Ellgaard** L. and Helenius A. (2003); *Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 181-191
- Farinha** CM., Nogueira P., Mendes F., Penque D., Amaral MD. (2002); *The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. Biochem J.* 366: 797-806
- Feliciangeli** S., Bendahhou S., Sandoz G., Gounon P., Reichold M., Warth R., Lazdunski M., Barharin J., Lesage F. (2007); *Does sumoylation control K2P1TWIK1 background K⁺ channels? Cell* 130: 563-69
- Fields** S. and Song O. (1989); *A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature* 340: 245-6
- Fu** L. and Sztul E. (2003); *Traffic-independent function of the Sar1p/COPII machinery in proteasomal sorting of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J Cell Biol.* 160: 157-63
- Gelman** MS., Kopito RR. (2003); *Cystic fibrosis: premature degradation of mutant proteins as a molecular disease mechanism. Methods Mol. Biol.* 232: 27–37
- Gentsch** M., Chang XB., Cui L., Wu Y., Ozols VV., Choudhury A., Pagano RE., Riordan JR. (2004); *Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Mol Biol Cell.* 15: 2684–96
- Geiss-Friedlander** R. and Melchior F. (2007); *Concepts in sumoylation: a decade on. Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 947-56. Review

Gerlach JH., Endicott JA., Juranka PF., Henderson G., Sarangi F., Deuchars KL., Ling V. (1986); *Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. Nature.* 324: 485–89

Gilbert A., Jadot M., Leontieva E., Wattiaux-De Coninck S., Wattiaux P. (1998); *Delta F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells. Exp Cell Res.* 242: 144-52

Giorgino F. (2000); *The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. Proc Natl Acad Sci. USA* 97: 1125-1130

Gong L., Kamitani T., Fujise K., Caskey LS., Yeh ET. (1997); *Preferential interaction of sentrin with a ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc9. J Biol Chem.* 272: 28198-201

Gong L., Millas, S., Maul GG. and Yeh ET. (2000); *Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. J Biol Chem.* 275: 3355-3359

Goodson ML., Hong Y., Rogers R., Matunis MJ., Park-Sarge OK., Sarge KD. (2001); *Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. J Biol Chem.* 276: 18513-8

Gorelick FS., Shugrue C. (2001); *Exiting the endoplasmic reticulum. Mol Cell Endocrinol.* 177: 13-8

Görlich D., Kutay U. (1999); *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 607-660

Görlich D. and Rapoport TA. (1993); *Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. Cell.* 75: 615-30

Gros P., Croop J., Housmann D. (1986); *Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. Cell.* 47: 371–80

Guo B., Yang SH., Witty J., Sharrocjs AD. (2007); *Signalling pathways and the regulation of SUMO modification. Biochem Soc Trans.* 35: 1414-1418

Harter C. and Wieland FT. (1998); *A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatomer. Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 11649-54

Hartl FU. (1996); *Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature.* 381: 571-579

He L., Aleksandrov AA., Serohijos AW., Hegedus T., Aleksandrov LA., Cui L., Dokholyan NV., Riordan JR. (2008); *Multiple membrane-cytoplasmic domain contacts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediate regulation of channel gating.* *J Biol Chem.* 283: 26383-90

Hegedus T., Aleksandrov A., Cui L., Guntsch M., Chang XB., Riordan JR. (2006); *F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive.* *Cent Euro J Biol.* 1: 29–42

Helenius A. and Aebi M. (2001); *Intracellular functions of N-linked glycans.* *Science.* 291: 2364-2369

Hershko A. and Ciechanover A. (1998); *The ubiquitin system.* *Annu Rev Biochem.* 67: 425-479. Review

Higgins CF, Haag PD., Nickaido K., Ardeshir F., Garcia G., Ames GF. (1982); *Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of S. typhimurium.* *Nature.* 298: 723–27

Hietakangas V., Anckar J., Blomster HA., Fujimoto M., Palvimo JJ., Nakai A., Sistonen L. (2006); *PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 45-50

Hochstrasser M. (1996); *Ubiquitin-dependent protein degradation.* *Annu Rev Genet.* 30: 405-439

Hochstrasser M. (2000); *Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems.* *Nature Cell Biol.* 2, E153-E157

Hoegge C., Pfander B., Moldovan GL., Pyrowolakis G., Jentsch S. (2002); *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO.* *Nature.* 419: 135-41

Holland IB., Cole SPC., Kuchler K., Higgins CF. (2003); *ABC Proteins: From Bacteria to Man.* Academic Press. London

Hosokawa N., Wada I., Hasegawa K., Yorihuzi T., Tremblay LO., Herscovics A., Nagata K. (2001); *A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation.* *EMBO Rep.* 2: 415-22

Hu W., Howard M., Lukacs GL. (2001); *Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* *Biochem J.* 354: 561-72

Huang TT., Wuerzberger-Davis SM., Wu Z-H., Miyamoto S. (2003); *Sequential Modification of NEMO/IKKg by SUMO-1 and Ubiquitin Mediates NF-kB Activation by Genotoxic Stress.* *Cell.* 115: 565-576

- Jensen** TJ., Loo MA., Pind S., Williams DB., Goldberg AL. and Riordan JR. (1995); *Multiple Proteolytic Systems, Including the Proteasome, Contribute to CFTR Processing. Cell.* 83, 129-135
- Jentsch** S. (1992); *The ubiquitin-conjugation system. Annu Rev Genet.* 26: 179-207
- Jentsch** S. and Pyrowolakis G. (2000); *Ubiquitin and its kin: how close are the familyties? Trends Cell Biol.* 10: 335-342
- Kamitani** T., Nguyen HP., Yeh ET. (1997); *Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. J Biol Chem.* 272: 14001-4
- Kamitani** T., Kito K., Nguyen HP., Fukuda-Kamitani T. and Yeh ET. (1998); *Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. J Biol Chem.* 273: 11349-11353
- Kim** Y. H., Choi C. Y., and Kim Y. (1999); *Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 12350–12355
- Klenk** C., Humrich J., Quitterer K., Lohse MJ. (2006); *SUMO-1 controls the protein stability and the biological function of phosducin. J Biol Chem.* 281: 8357-64
- Kopito** RR. (1999); *Biosynthesis and degradation of CFTR. Physiol Rev.* 79: 167-73
- Ladinsky** MS., Mastronarde DN., McIntosh JR., Howell KE., Staehelin LA. (1999); *Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. J Cell Biol.* 144: 1135-49
- Lanoix** J., Ouwendijk J., Stark A., Szafer E., Cassel D., Dejgaard K., Weiss M., Nilsson T. (2001); *Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. J Cell Biol.* 155: 1199-212
- Lederkremer** GZ., Cheng Y., Petre BM., Vogan E., Springer S., Schekman R., Walz T., Kirchhausen T. (2001); *Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10704-9
- Letourneur** F., Gaynor EC., Hennecke S., Démollière C., Duden R., Emr SD., Riezman H., Cosson P. (1994); *Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. Cell.* 79: 1199-207
- Lewis** HA., Buchanan SG., Burley SK., Connors K., Dickey M., Dorwart M., Fowler R., Gao X., Guggino WB., Hendrickson WA., Hunt JF., Kearins MC., Lorimer D., Maloney PC., Post KW., Rajashankar KR., Rutter ME., Sauder JM., Shriver S., Thibodeau PH., Thomas PJ., Zhang M., Zhao X., Emtage S. (2004); *Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. EMBO J.* 23: 282–93

- Liakopoulos D.**, Doenges G., Matuschewski K., Jentsch S. (1998); *A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. EMBO J.* 17: 2208-14
- Liu LB.**, Omata W., Kojima I., Shibata H. (2007); *The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is a regulator of GLUT4 turnover and targeting to the insulin-responsive storage compartment in 3T3-L1 adipocytes. Diabetes.* 56: 1977-85
- Lodish H.**, Berk A., Kaiser CA., Krieger M., Scott MP., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. (2007); *Molecular Cell Biology, Sixth Edition, Palgrave Macmillan; Freeman*
- Loo MA.**, Jensen TJ., Cui L., Hou Y., Chang XB. and Riordan JR. (1998); *Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. EMBO J.* 17: 6879-6887
- Loo TW.**, Barlett MC., Clarke DM. (2004); *Processing mutations located throughout the human multidrug resistance P-glycoprotein disrupt interactions between the nucleotide binding domains. J Biol Chem.* 279: 38395–401
- Loo TW.**, Barlett MC., Clarke DM. (2005); *The dileucine motif at the COOH terminus of human multidrug resistance P-glycoprotein is important for folding but not activity. J Biol Chem.* 280: 2522-8
- Lukacs GL.**, Mohamed A., Kartner N., Chang XB., Riordan JR. and Grinstein S. (1994); *Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. EMBO J.* 13: 6076-6086
- Lukacs GL.**, Segal G., Kartner N., Grinstein S., Zhang F. (1997); *Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. Biochem J.* 328: 353–61
- Mahajan R.**, Delphin C., Guan T., Gerace L. and Melchior F. (1997); *A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. Cell.* 88: 97-107
- Mahajan R.**, Gerace L. and Melchior F. (1998); *Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. J Cell Biol.* 140: 259-270
- Martin S.**, Nishimune A., Mellor JR., Henley JM. (2007); *SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. Nature.* 447: 321-5
- Matunis MJ.**, Coutavas E. and Blobel G. (1996); *A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. J Cell Biol.* 135: 1457-1470

- Matunis MJ., Wu J. and Blobel G.,(1998);** *SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. J Cell Biol.* 140: 499-509
- Meacham GC., Lu Z., King S., Sorscher E., Tousson A. and Cyr DM. (1999)** *The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. EMBO J.* 18: 1492-1505
- Meacham GC., Patterson C., Zhang W., Younger JM. and Cyr DM. (2001);** *The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. Nat Cell Biol.* 3: 100-105
- Melchior F., Schergaut M., Pichler A. (2003);** *SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. Trends Biochem Sci* 28: 612-8
- Melchior F. (2000);** *SUMO – nonclassical ubiquitin. Annu Rev Cell Dev Biol.* 16: 591–626
- Müller S., Hoegge C., Pyrowolakis G., Jentsch S. (2001);** SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 202-10
- Nickel W., Malsam J., Gorgas K., Ravazzola M., Jenne N., Helms JB., Wieland FT. (1998);** *Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. J Cell Sci.*111: 3081-90
- Nickel W. and Wielander FT. (1997);** *Biogenesis of COPI-coated transport vesicles. FEBS Lett.* 413: 395-400. Review
- Ohno H., Stewart J., Fournier MC., Bosshart H., Rhee I., Miyatake S., Saito T., Gallusser A., Kirchhausen T., Bonifacino JS. (1995);** *Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. Science.* 269: 1872-5
- Ostedgaard LS., Baldursson O., Welsh MJ. (2001);** *Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by its R domain. J Biol Chem* 276: 7689–7692
- Ozkaynak E., Finley D., Varshavsky A. (1984);** *The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. Nature.* 312: 663-666
- Pagant S., Kung L., Dorrington M., Lee MC., Miller. (2007);** *Inhibiting endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded Yor1p does not permit ER export despite the presence of a diacidic sorting signal. Mol Biol Cell* 18: 3398–413
- Palade G. (1975);** *Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. Science.* 189: 867
- Parodi AJ. (2000);** *Protein glucosylation and its role in protein folding. Annu Rev Biochem.* 69: 69-93

- Pedemonte N.**, Lukacs GL., Du K., Caci E., Zegarra-Moran O. (2005); *Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. J. Clin. Investig.* 115: 2564–71
- Pfander B.**, Moldovan GL., Sacher M., Hoege C., Jentsch S. (2005); *SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. Nature.* 436: 428-33
- Pfeffer S.** (2003); *Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. Cell.* 112: 507-17. *Review*
- Picciano JA.**, Ameen N., Grant BD., Bradbury NA. (2003); *Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Am J Physiol Cell Physiol.* 285: 1009-18
- Pickart CM.** (2000); *Ubiquitin in chains. Trends Biochem. Science.* 25: 544–548
- Pind S.**, Riordan JR. and Williams DB. (1994); *Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J Biol Chem.* 269: 12784-12788
- Prince LS.**, Workman RB., Marchase RB. (1994); *Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 5192–96
- Prudden J.**, Pebernard S., Raffa G., Slavin DA., Perry JP., Tainer JA., McGowan CA. and Boddy MN. (2007); *SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. EMBO J* 26: 4089-4101
- Quinton PM.** (2007). *Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. Physiology.* 22: 212–25
- Rabouille C.**, Klumpermann J. (2005); *Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. Nat Rev Mol Cell Biol.* 6: 812-7
- Rajan S.**, Plant LD., Rabin ML., Butler MH., Goldstein SA. (2005); *Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. Cell.* 121:37-47
- Rapoport I.**, Miyazaki M., Boll W., Duckworth B., Cantley LC., Shoelson S., Kirchhausen T. (1997); *Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. EMBO J.* 16: 2240-50
- Renolds J.**, Tower C., Musgrove L., Fan L., Maloney K., Clancy JP., Kirk KL., Sztul E., Cormet-Boyaka E. (2008); *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking is mediated by the COPI coat in epithelial cells. J Biol Chem.* 283: 833-9
- Renolds J.**, Boyaka PN., Bellis SL., Cormet-Boyaka E. (2007); *Low temperature induces the delivery of mature and immature CFTR to the plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun.* 366: 1025-9

- Riordan JR.**, Rommens JM., Kerem B-S, Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski, J., Lok S., Plavsic N., Chou J-L., Drumm ML., Iannuzzi MC., Collins FS., Tsui L-C. (1989); *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA*. *Science*. 245: 1066-1073
- Riordan JR.** (2008); *CFTR function and prospects for therapy*. *Annu Rev Biochem*. 77: 701-26
- Rogers RS.**, Horvath CM., Matunis MJ. (2003); *SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation*. *J Biol Chem* 278:30091-97
- Rosenberg MF.**, Callaghan R., Modok S., Higgins CF., Ford RC. (2005); *Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state*. *J. Biol. Chem*. 280: 2857–62
- Rothman JE.** and Wieland FT. (1996); *Protein sorting by transport vesicles*. *Science*. 272: 227-34. *Review*
- Rowe T.**, Aridor M., McCaffery JM., Plutner H., Nuoffer C., Balch WE. (1996); *COPII vesicles derived from mammalian endoplasmic reticulum microsomes recruit COPI*. *J Cell Biol*. 135: 895-911
- Saitoh H.**, Sparrow DB., Shiomi T., Pu RT., Nishimoto T., Mohun TJ., Dasso M. (1998); *Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2*. *Curr Biol* 8: 121-124
- Saitoh H.**, Hinchev J. (2000); *Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3*. *J Biol Chem*. 275: 6252-6258
- Sampson DA.**, Wang M., Matunis MJ. (2001); *The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification*. *J. Biol. Chem*. 276: 21664 - 9
- Sato S.**, Ward CL., Kopito RR. (1998); *Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in vitro*. *J Biol Chem*. 273: 7189-7192
- Scales SJ.**, Gomez M., Kreis TE. (1997); *Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI*. *Cell*. 90: 1137-48
- Scales SJ.**, Gomez M., Kreis TE. (2000); *Coat proteins regulating membrane traffic*. *Int Rev Cytol*. 195: 67-144
- Serohijos AW.**, Hegedus T., Aleksandrov AA., He L., Cui L., Dokholyan NV., Riordan JR. (2008); *Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 3256-61
- Serohijos AW.**, Hegedus T., Riordan JR., Dokholyan NV. (2008); *Diminished self-chaperoning activity of the DeltaF508 mutant of CFTR results in protein misfolding*. *PLoS Comput Biol*. 4: e1000008

- Sharma M.**, Pampinella F., Nemes C., Benharouga M., So J., Du K., Bache KG., Papsin B., Zerangue N., Stenmark H., Lukacs GL. (2004); *Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes.* *J Cell Biol.* 164: 923-33
- Shen BQ.**, Barthelson RA., Skach W., Gruenert DC., Sigal E., Mrsny RJ., Widdicombe JH. (1993); *Mechanism of inhibition of cAMP-dependent epithelial chloride secretion by phorbol esters.* *J Biol Chem.* 268: 19070-19075
- Sheppard DN.**, Rich DP., Ostedgaard LS., Gregory RJ., Smith AE., Welsh MJ. (1993); *Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties.* *Nature.* 362: 160–164
- Skach WR.** (2000); *Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* *Kidney Int.* 57: 825-31
- Song J.**, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. (2004); *Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 14373-14378
- Stagg SM.**, LaPointe P., Razvi A., Gürkan C., Potter CS., Carragher B., Balch WE. (2008); *Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly.* *Cell.* 134: 474-84
- Stefkova J.**, Poledne R., Hubáček JA. (2004); *ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases.* *Physiol Res.* 53: 235–243
- Tanaka K.**, Suzuki T., Chiba T., Shimura H., Hattori N., Mizuno Y. (2001); *Parkin is linked to the ubiquitin pathway.* *J Mol Med.* 79: 482-94. Review
- Tang Z.**, El Far O., Betz H., Scheschonka A. (2005); *Pias1 interaction and sumoylation of metabotropic glutamate receptor R8.* *J. Biol. Chem.* 280: 38153 - 9
- Terui Y.**, Saad N., Jia S., McKeon F., Yuan J. (2004); *Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1.* *J Biol Chem.* 279: 28257-65
- Thrower JS.**, Hoffman L., Rechsteiner M. and Pickart CM. (2000); *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal.* *EMBO J.* 19: 94-102
- Towbin H.**, Staehelin T. and Gordon J. (1979); *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 4350-4354
- Tsigelny I.**, Hotchko M., Yuan JX., Keller SH. (2005); *Identification of molecular determinants that modulate trafficking of DeltaF508 CFTR, the mutant ABC transporter associated with cystic fibrosis.* *Cell Biochem Biophys.* 42: 41-53

- Uetz P. (2002);** *Two-hybrid arrays. Curr Opin Chem Biol.* 6: 57-62. Review
- Vovis GF. and Lacks S. (1977);** *Complementary action of restriction enzymes endo R-Dpnl and Endo R-DpnII on bacteriophage f1 DNA. J Mol Biol.* 115: 525-38
- Walton TA. and Sousa MC. (2004);** Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell* 15: 367-74
- Wang F., Zeltwanger S., Hu S., Hwang TC. (2000);** *Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. J Physiol.* 524: 637-648
- Wang X., Matteson J., An Y., Moyer B., Yoo JS., Bannykh S., Wilson IA., Riordan JR., Balch WE. (2004);** *COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. J Cell Biol.* 167: 65–74
- Wang X., Venable J., LaPointe P., Hutt DM., Koulov AV., Coppinger J., Gurkan C., Kellner W., Matteson J., Plutner H., Riordan JR., Kelly JW., Yates JR. 3rd, Balch WE. (2006).** *Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. Cell.* 127: 803–15
- Ward CL. and Kopito RR. (1994);** Intracellular Turnover of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J Biol Chem.* 269: 25710-25718
- Ward CL., Omura S. and Kopito RR. (1995);** *Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Cell.* 83: 121-127
- Watson PJ., Frigerio G., Collins BM., Duden R., Owen DJ. (2004);** *Gamma-COP appendage domain - structure and function. Traffic.* 5: 79-88
- Weimbs T., Mostov K., Low SH., Hofmann K. (1998);** *A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. Trends Cell Biol.* 8:260-2
- Weixel KM., Bradbury NA. (2000);** *The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. J Biol Chem.* 275: 3655-60
- Weixel KM., Bradbury NA. (2001);** *Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. J. Biol. Chem.* 276: 46251–59
- Winter MC., Welsh MJ. (1997);** *Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. Nature.* 389: 294–296
- Yang Y., Janich S., Cohn JA. and Wilson JM. (1993);** *The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 9480-9484

- Yoo JS.**, Moyer BD., Bannykh S., Yoo HM., Riordan JR., Balch WE. (2002); *Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. J Biol Chem.* 277: 11401-9
- Younger JM.**, Chen L., Ren HY., Rosser MF., Turnbull EL., Fan CY., Patterson C., Cyr DM. (2006). *Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Cell.* 126: 571–82
- Yu Y.**, Platoshyn O., Safrina O., Tsigelny I., Yuan JX., Keller SH. (2007); *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) functionality is dependent on coatamer protein I (COPI). Biol Cell.* 99: 433-44
- Yuan X.**, Shao Y., Bystroff C. (2003); *Ab initio protein structure prediction using pathway models. Comp Funct Genomics.* 4: 397-401
- Zapun A.**, Jakob CA., Thomas DY., Bergeron JJ. (1999); *Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. Structure.* 7: 173-82. Review
- Zhang F.**, Kartner N., Lukacs GL.. (1998); *Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR. Nat Struct Biol.* 5: 180–83

Abkürzungen

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP1/2	Adaptorprotein
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
COP	<i>Coatomer</i> -Protein-Komplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERGIC	ER-Golgi <i>intermediate compartment</i>
FCS	Fötales Kälberserum
g	9,81 m/s ²
h	Hour
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IP	Immunpräzipitation
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
min	Minute(n)
MSD	Membran-durchspannende Domäne
NBD	Nukleotidbindende Domäne
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Saline-Puffer
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEN1	<i>Sentrin specific Phosphatase</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin related Modifier</i>
TBS	Tris-Saline-Puffer
TBS-T	Tris-Saline-Puffer mit Tween 20
TGN	Trans-Golgi-Network
Ubc9	<i>Ubiquitin-like protein SUMO-1 conjugating enzyme</i>
ÜS	Überstand
ÜN	Übernacht
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

PUBLIKATION

Publikation erstellt und im Prozess der Einreichung:

Schulze, C., Illenyi, M., Pagel, P., Roscher, A., Glöckner-Pagel, J. (2009)
„Regulation of the CFTR Maturation and Trafficking by SUMOylation“.

ABSTRACTS

Schulze, C., Illenyi, M., Reinhardt, D., Roscher, A., Glöckner-Pagel, J. (2006)
„Secondary Modification of CFTR by Small Ubiquitin-Like Modifier“. 20th Annual North
America CFTR Conference. 2. – 5.11.2006, Denver, Colorado, USA.

Schulze, C., Illenyi, M., Reinhardt, D., Roscher, A., Glöckner-Pagel, J. (2008)
„SUMOylation Is Necessary for CFTR Trafficking“. 31st European Cystic Fibrosis
Conference, 11. – 14.06.2008, Prague.