



Olaf Jahn (Autor)

Das Bindungsprotein des Corticotropin-Releasing Factors: Pharmakologie, Ligandenbindungsstelle und Untereinheitenstruktur

Olaf Jahn

**Das Bindungsprotein des
Corticotropin-Releasing Factors:
Pharmakologie, Ligandenbindungsstelle
und Untereinheitenstruktur**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3577>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Vom Stress zum Corticotropin-Releasing Factor	1
1.1.1 Stress: Historie und Definition.....	1
1.1.2 Physiologie der Stress-Antwort	2
1.2 Das Corticotropin-Releasing Factor-System	4
1.2.1 Corticotropin-Releasing Factor: Peptidfamilie und Rezeptoren.....	4
1.2.2 Corticotropin-Releasing Factor-Bindungsprotein	7
1.2.3 Pathophysiologie und therapeutische Strategien.....	11
1.3 Photoaffinitätsmarkierung	13
1.4 Massenspektrometrie von Peptiden und Proteinen	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Ergebnisse	23
2.1 Produktion von rCRFBP.....	23
2.1.1 Transfektion und serumfreie Kultivierung von HEK 293-Zellen.....	23
2.1.2 Immunologische Detektion von rCRFBP im Zellkulturmedium.....	25
2.1.3 Aufreinigung von rCRFBP durch Nickel-Chelatchromatografie	27
2.2 Massenspektrometrische und proteinchemische Charakterisierung von rCRFBP	28
2.2.1 Bestimmung der Molekularmasse von rCRFBP mittels NanoESMS	28
2.2.2 Massenspektrometrisches <i>Peptide-Mapping</i> von rCRFBP.....	31
2.2.2.1 Charakterisierung der Primär- und Disulfidbrückenstruktur	31
2.2.2.2 Charakterisierung der Glykosylierungsstruktur.....	35
2.3 Pharmakologische Charakterisierung von rCRFBP	39
2.3.1 Bindungsprofil von rCRFBP.....	39
2.3.1.1 Bestimmung der Gleichgewichts-Disssoziationskonstante von [³ H-Leu ⁹]rUcn	39
2.3.1.2 Pharmakologisches Bindungsprofil von rCRFBP	41
2.3.3 Struktur-Affinität-Beziehung zwischen CRF-ähnlichen Peptiden und rCRFBP	42
2.3.3.1 Scintillation Proximity Assay.....	42

2.3.3.2 Bindungsaffinität modifizierter Svg-Analoga zu rCRFBP	44
2.3.3.3 Bindungsaffinität peptidischer CRF-Antagonisten zu rCRFBP	46
2.4 Photoaffinitätsmarkierung von rCRFBP	49
2.4.1 Entwicklung photoreaktiver CRF-Analoga	49
2.4.2 Optimierung der Markierungsbedingungen	51
2.4.3 Detektion und Reinigung der Photoaddukte.....	53
2.4.4 Lokalisation der Markierungsstellen in den Photoaddukten.....	56
2.4.4.1 Massenspektrometrische Charakterisierung des Photoaddukts von [Bp ¹]rUcn	56
2.4.4.2 Massenspektrometrische Charakterisierung des Photoaddukts von [Bp ¹]h/rCRF	66
2.5 Charakterisierung der Ligandenbindungsstelle von rCRFBP.....	69
2.5.1 Entwicklung verkürzter photoreaktiver CRF-Analoga	69
2.5.2 Detektion und Reinigung der Photoaddukte.....	71
2.5.3 Lokalisation der Markierungsstellen in den Photoaddukten der h/rCRF ⁶⁻³³ -Analoga	74
2.6 Untereinheitenstruktur von rCRFBP	84
3. Diskussion	88
3.1 Struktur-Affinität-Beziehung zwischen CRF-ähnlichen Peptiden und rCRFBP	88
3.2 Charakterisierung der Ligandenbindungsstelle von rCRFBP.....	92
3.3 Untereinheitenstruktur von CRFBP und Stöchiometrie des Bindungskomplexes.....	97
3.4 Photochemische Eigenschaften der photoreaktiven CRF-Analoga	98
3.5 Anwendungen von <i>Multiple Ion Chromatograms</i> in der LCMS-Analytik	101
4. Material und Methoden	104
4.1 Chemikalien	104
4.2 Zellkultur	105
4.2.1 Allgemeines	105
4.2.1.1 Steriles Arbeiten	105

4.2.1.2 Zentrifugation von Zellen.....	105
4.2.1.3 Mikroskopie	105
4.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	105
4.2.2 Kultivierung der HEK 293-Zellen	106
4.2.3 Einfrieren der HEK 293-Zellen	106
4.2.4 Auftauen der HEK 293-Zellen.....	107
4.2.5 Passagieren der HEK 293-Zellen.....	107
4.2.6 Kultivierung der HEK 293-Zellen unter serumfreien Bedingungen	108
4.2.7 Passagieren der HEK 293-Zellen unter serumfreien Bedingungen.....	108
4.2.8 Transfektion von HEK 293-Zellen	109
4.2.9 Produktion von rCRFBP in HEK 293-Zellen.....	109
 4.3 Bindungsstudien mit rCRFBP.....	110
4.3.1 Adsorptionstest	110
4.3.2 Scintillation Proximity Assay (SPA)	111
 4.4 Proteinchemische Experimente.....	111
4.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)	111
4.4.2 Detektion von Proteinen mittels Silberfärbung	113
4.4.3 Proteintransfer aus Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	114
4.4.4 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	115
4.4.5 Proteinreinigung mittels Nickel-Chelatchromatografie	117
4.4.6 Reduktion und Derivatisierung von rCRFBP	118
4.4.7 Enzymatische Spaltung von rCRFBP	119
4.4.7.1 Endoprotease Trypsin	119
4.4.7.2 Endoprotease AspN	120
4.4.7.3 Kombinationsverdau mit AspN und Trypsin.....	121
4.4.8 Enzymatische Deglykosylierung mit Peptid-N-Glycosidase F	121
4.4.9 Chemische Vernetzungsexperimente.....	122
4.4.10 Proteinsequenzierung durch automatisierten Edman-Abbau.....	122
 4.5 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)	122
4.5.1 Präparative Kapillar-RP-HPLC (Säulenformat 1,0 x 150 mm).....	122
4.5.2 Analytische Kapillar-RP-HPLC (Säulenformat 0,3 x 150 mm)	123
 4.6 Massenspektrometrie	125
4.6.1 Beschreibung des verwendeten Massenspektrometers VG AutoSpec-T	125
4.6.2 Aufnahme der Massenspektren.....	125
4.6.2.1 Betriebsarten des Massenspektrometers	125

4.6.2.2 Aufnahme von Massenspektren mit Massenspektrometer 1.....	127
4.6.2.3 Aufnahme von Hochenergie-CID-Spektren	129
4.7 Peptidsynthese.....	130
4.7.1 Synthese der Peptide am Trägerharz	130
4.7.2 Abspaltung der Peptide vom Trägerharz	132
4.7.3 Reinigung und Charakterisierung der Peptide.....	132
4.7.3.1 RP-HPLC	132
4.7.3.2 Kopplung von RP-HPLC mit Massenspektrometrie (LCMS)	133
4.7.3.3 Aminosäureanalyse.....	133
4.8 Photoaffinitätsmarkierung	134
4.8.1 Synthese der Photopeptide	134
4.8.2 Bestrahlungsexperimente	134
5. Literaturverzeichnis	136