

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung von Interaktionen
der HSP40-Proteine Sec63p und ERj7p**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2009

vorgelegt von

Andreas Schmitt

geboren am 31.10.1977 in Saarlouis

Dekan:

Prof. Dr. Michael D. Menger

Vorsitzender:

Berichterstatter:

Akad. Mitarbeiter:

Diese Arbeit widme ich
meiner Tochter Maria, meiner Frau Vita und meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	
1.1. Calcium und das endoplasmatische Retikulum	1
1.1.1. Die Rolle Calciums in den Signalkaskaden der Zelle	1
1.1.2. Calcium-Homeostase und neuronale Erkrankungen	4
1.1.3. Das endoplasmatische Retikulum und der Sec61p-Translokon-Komplex	7
1.1.4. Der Calcium-Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums	9
1.1.5. Die Familie der CRECs	12
1.1.5.1. Calumenin	13
1.2. Die Chaperone des endoplasmatischen Retikulums	16
1.2.1. Das Chaperon-Netzwerk und ER-Stress	17
1.2.2. Chaperone und Krankheit	19
Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2. Chemikalien	23
2.2. Verwendete Antikörper, Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	24
2.2.1. Antikörper	24
2.2.2. Bakterielle Stämme	24
2.2.3. Plasmide	25
2.2.4. Oligonukleotide	25
2.3. Präparative Methoden	26
2.3.1. Solubilisierung von rauen Mikrosomen	26
2.3.2. Expression und chromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine	26
2.3.2.1. Reinigung von Proteinen mit GST-„tag“	26
2.3.2.2. Synthese rekombinanter Proteine	27
2.3.2.3. Zellaufschluss der transformierten <i>E. coli</i> Zellen	28
2.3.2.4. Reinigung von GST-Fusionsproteinen	28
2.3.2.5. Verdau von Proteinen mit GST-„tag“ mittels TEV-Protease	29
2.3.3. <i>In vitro</i> Synthese und radioaktive Markierung von Proteinen / Calumenin in <i>E. coli</i> Lysaten: Rapid Translation System RTS 100 <i>E. coli</i> High Yield	30

2.3.4. Co-translatinaler Transport von in vitro synthetisiertem Calumenin in Hundepankreasmikrosomen	31
2.4. Analytische Methoden	33
2.4.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	33
2.4.1.1. Biorad-Gele	33
2.4.1.2. High-Tris-Gele	34
2.4.2. Protein-Färbung mit Coomassie brilliant Blau	35
2.4.3. Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western blotting)	35
2.4.4. Ablösung von Antikörpern von der PVDF-Membran	36
2.4.5. Immunologische Detektion von Proteinen	36
2.4.6. Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellkultur	37
2.4.7. Aceton-Methanol Fällung	38
2.4.8. Quantifizierung von Proteinen	38
2.4.8.1. Bestimmung der OD ₂₈₀	38
2.4.8.2. Quantifizierung <i>via</i> Coomassie-Färbung und BSA als Proteinstandard	39
2.4.9. „pull-down“ Versuche	39
2.4.10. Bestimmung der Affinitäten der BiP-Erj7 J-Domäne Interaktion <i>via</i> Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	40
2.4.11. Bestimmung der Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP durch die ERj7 J-Domäne	42
2.4.12. Bindung von Proteinen an immobilisierte Oligopeptide	43
2.4.12.1. Interaktion der [¹⁴ C]-markierten Proteine in Abhängigkeit von Ca ²⁺ oder EGTA mit immobilisierten Oligopeptiden	43
2.5. Molekularbiologische Methoden	46
2.5.1. PCR	46
2.5.2. DNA Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen und „calf intestine alkaline phosphatase“ (CIAP)	47
2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese	48
2.5.4. Elution von DNA aus dem Agarosegel	48
2.5.5. Ligation mit T4-DNA-Ligase	49
2.5.6. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	49
2.5.7. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	50
2.5.8. Kultivierung der Bakterien	50
2.5.9. Minipräparation zur Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	51

2.5.10. Zellkultur	53
2.5.11. Transfektion von Zellen mit siRNA	54
2.5.12. Stress-Induktion in Zellen durch Thapsigargin und Tunicamycin	54
3. Ergebnisse	55
3.1. ERj7p, ein HSP40-Homolog im ER?	55
3.1.1. ERj7p lokalisiert bei einer Immunfluoreszenz im ER von PC3-Zellen	56
3.1.2. ERj7p wird in das ER importiert	58
3.1.3. ERj7p liegt in hoher Konzentration in der Membran von rauen Mikrosomen vor	59
3.1.4. Rekombinante Expression und Reinigung des Fusionsproteins GST-ERj7 J-Domäne	61
3.1.5. Funktion der GST-ERj7 J-Domäne	63
3.1.5.1. Das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne interagiert ATP-abhängig mit BiP	63
3.1.5.2. Das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP	65
3.1.5.3. Das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne zeigt eine hohe Affinität zu BiP	67
3.1.6. Funktion von ERj7p	68
3.1.6.1. Herunterregulation von ERj7 leitet keine UPR ein	70
3.1.6.2. ERj7 wird bei Stress durch Tunicamycin hochreguliert	74
3.2. Calumenin, ein EF-Hand-Protein im ER	77
3.2.1. Calumenin ist im ER von PC3-Zellen lokalisiert	78
3.2.2. Calumenin wird in das ER importiert	80
3.2.3. Rekombinante Expression und Reinigung des Fusionsproteins GST-Calumenin	82
3.2.4. Funktion von GST-Calumenin	85
3.2.4.1. GST-Calumenin interagiert Ca ²⁺ -unabhängig mit Sec63p	85
3.2.4.2. TEV-Protease gespaltenes Calumenin interagiert Ca ²⁺ -unabhängig mit GST-Sec63 C-Terminus	88
3.2.4.3. [¹⁴ C] markiertes GST-Calumenin interagiert mit den putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p	91

3.2.4.3.1.	[¹⁴ C] markiertes GST-Calumenin und GST-Calmodulin binden in Anwesenheit von CaCl ₂ an verschiedene putative Calmodulin-Bindemotive	91
3.2.4.3.2.	[¹⁴ C] markiertes GST-Calumenin bindet Ca ²⁺ -unabhängig an Peptide aus dem Sec63p	95
3.2.5.	Funktion von Calumenin	106
3.2.5.1.	CALU wird bei induziertem ER-Stress durch Tunicamycin oder Thapsigargin nicht hochreguliert	106
4.	Diskussion	108
4.1.	Charakterisierung von ERj7p	108
4.1.1.	ERj7p interagiert ATP-abhängig mit BiP	110
4.1.2.	ERj7p lokalisiert im ER von PC3-Zellen	111
4.1.3.	ERj7 ist durch siRNA oder Tunicamycin regulierbar	112
4.1.4.	Zusammenfassung der Interaktionen des HSP70-HSP40 Chaperonsystems des ER in Säugerzellen	114
4.2.	Charakterisierung von Calumenin	116
4.2.1.	Calumenin lokalisiert im ER von PC3-Zellen	118
4.2.1.1.	Calumenin kann via Immunfluoreszenz im ER nachgewiesen werden	119
4.2.1.2.	Calumenin wird in raue Mikrosomen importiert	119
4.2.2.	Rekombinante Synthese und Reinigung von Calumenin	119
4.2.3.	Calumenin interagiert Calcium-unabhängig mit Sec63p	121
4.2.4.	Calumenin wird bei ER-Stress nicht überproduziert	127
4.3.	Der Calcium-Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums	128
5.	Zusammenfassung	130
	Summary	131
6.	Literatur	132

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
accel	„acceleration“ (Beschleunigung des Rotors)
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure aus reverser Transkription
CALU	Calumenin
Ci	Curie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
decel	„deceleration“ (Verzögerung des Rotors)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERj	ER“ resident DnaJ-like protein“
GSH-Sepharose	Gluthation
GRP78 (BiP)	“glucose-regulated protein” 78 (kDa)
h	Stunde(n)
hs	<i>Homo sapiens</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin der Subklasse G

Abkürzungsverzeichnis

IP ₃	Inositol-2,3-triphosphat
IP ₃ R	Inositol-2,3-triphosphat-Rezeptor
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
μ	mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
m	milli (10 ⁻³)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	mol/l
mM	millimolar
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MW	molekulare Masse
MVP	Mikrosomenverdünnungspuffer
n	nano (10 ⁻⁹)
nm	Nanometer
Ni-NTA-Agarose	Nickel-Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
P _i	Phosphatgruppe
PK	Proteinase K
PKRM	Puromycin und Kaliumchlorid behandelte RMs
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid

Abkürzungsverzeichnis

RM	Raue Mikrosomen (Hundepankreasmikrosomen)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU	“response unit”
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TX-100	TritonX-100
U	Unit (Enzymeinheit)
UPR	„unfolded protein response“
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
% (v/v)	Volumenprozent (volume/volume)
% (w/v)	Gewichtsprozent (weight/volume)

Ein- beziehungsweise Dreibuchstaben Code für Aminosäuren:

A	(Ala)	Alanin	M	(Met) Methionin
C	(Cys)	Cystein	N	(Asn) Asparagin
D	(Asp)	Aspartat	P	(Pro) Prolin
E	(Glu)	Glutamat	Q	(Gln) Glutamin
F	(Phe)	Phenylalanin	R	(Arg) Arginin
G	(Gly)	Glycin	S	(Ser) Serin
H	(His)	Histidin	T	(Thr) Threonin
I	(Ile)	Isoleucin	V	(Val) Valin
K	(Lys)	Lysin	W	(Trp) Tryptophan
L	(Leu)	Leucin	Y	(Tyr) Tyrosin

1. Einleitung

1.1. Calcium und das endoplasmatische Retikulum

1.1.1. Die Rolle Calciums in den Signalkaskaden der Zelle

Das divalente Kation Calcium hat durch seine Rolle als sekundärer Botenstoff auf viele physiologische wie biochemische Prozesse des zellulären Lebens einen Einfluss. Hier wären zu nennen: Exozytose, Bewegung, Apoptose, Transkription und Reizweiterleitung (Berridge, 2000; Clapham, 2007). Um eine gezielte Weiterleitung von Signalen auf Calcium-Basis zu gewährleisten, muss das Signal stark lokal wie zeitlich moduliert werden. Nach Meldolesi und Pozzan (1998) verwendet die Zelle daher das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mitochondrien als Calcium-Speicher. Durch diese Speicherung entsteht ein Ca^{2+} -Ionengradient von 3 bis 4 Größenordnungen innerhalb der Zelle (Yu und Hinkle, 2000). Die Calcium-Konzentration im Cytosol entspricht hierbei ca. 5 - 100 nM, wohingegen im ER-Lumen (~ 500 μM) wie im extrazellulären Raum höhere Konzentrationen vorliegen (Yu und Hinkle, 2000; Alvarez und Montero, 2002). Die Erhaltung dieses Gradienten wird durch diverse Transportvorgänge und -proteine gesteuert (Clapham, 2007; vgl. Abb. 1.1.). Eine Veränderung der cytosolischen Calcium-Konzentration auf 500 – 1000 nM aufgrund von Stimulation ist daher ein Auslöser von Signalkaskade über Calmodulin und Troponin C. Der Einsatz von Calcium-Pumpen (z.B. SERCA) reduziert die Calcium-Konzentration im Cytosol durch das ATP-abhängige Einpumpen von Calcium in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Hierdurch wird das Calcium-Signal wieder abgeschwächt. Durch diese „ON“ und „OFF“ Mechanismen ist die Zelle in der Lage die Signale individuell zu variieren (Calbiochem, 2006).

Nach Kiselyov *et al.* (2006) sowie Laude und Simpson (2009) ist jedoch nicht nur eine räumliche Trennung für die Signalweiterleitung durch Calcium notwendig, sondern auch eine zeitliche (Abb. 1.2.A.). Unterschiedliche Effekte z.B. die Exocytose benötigen unterschiedlich lange Signale, um ausgelöst zu werden.

1. Einleitung

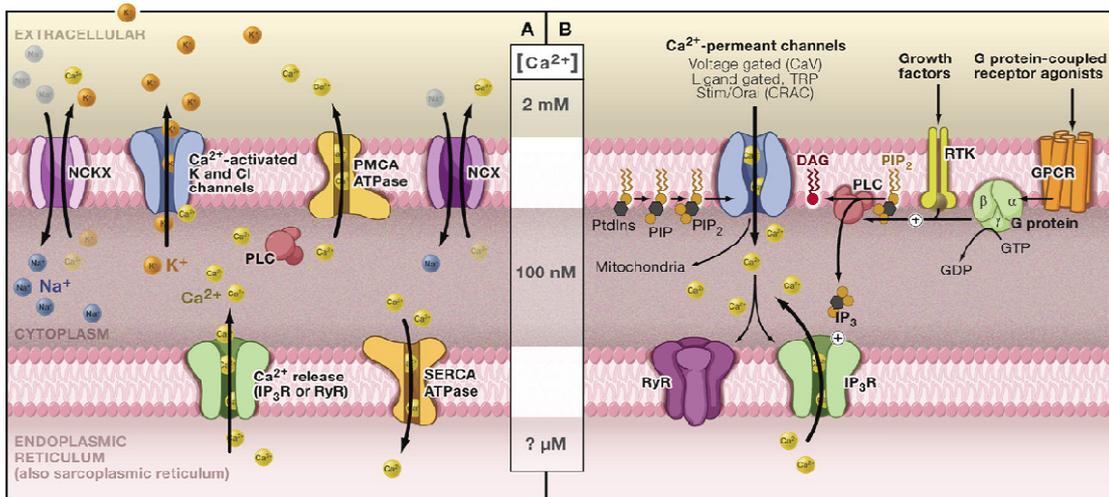


Abb. 1.1.: aus Clapham (2007): Calcium-Konzentrationen und –Netzwerk in der Säugerzelle.

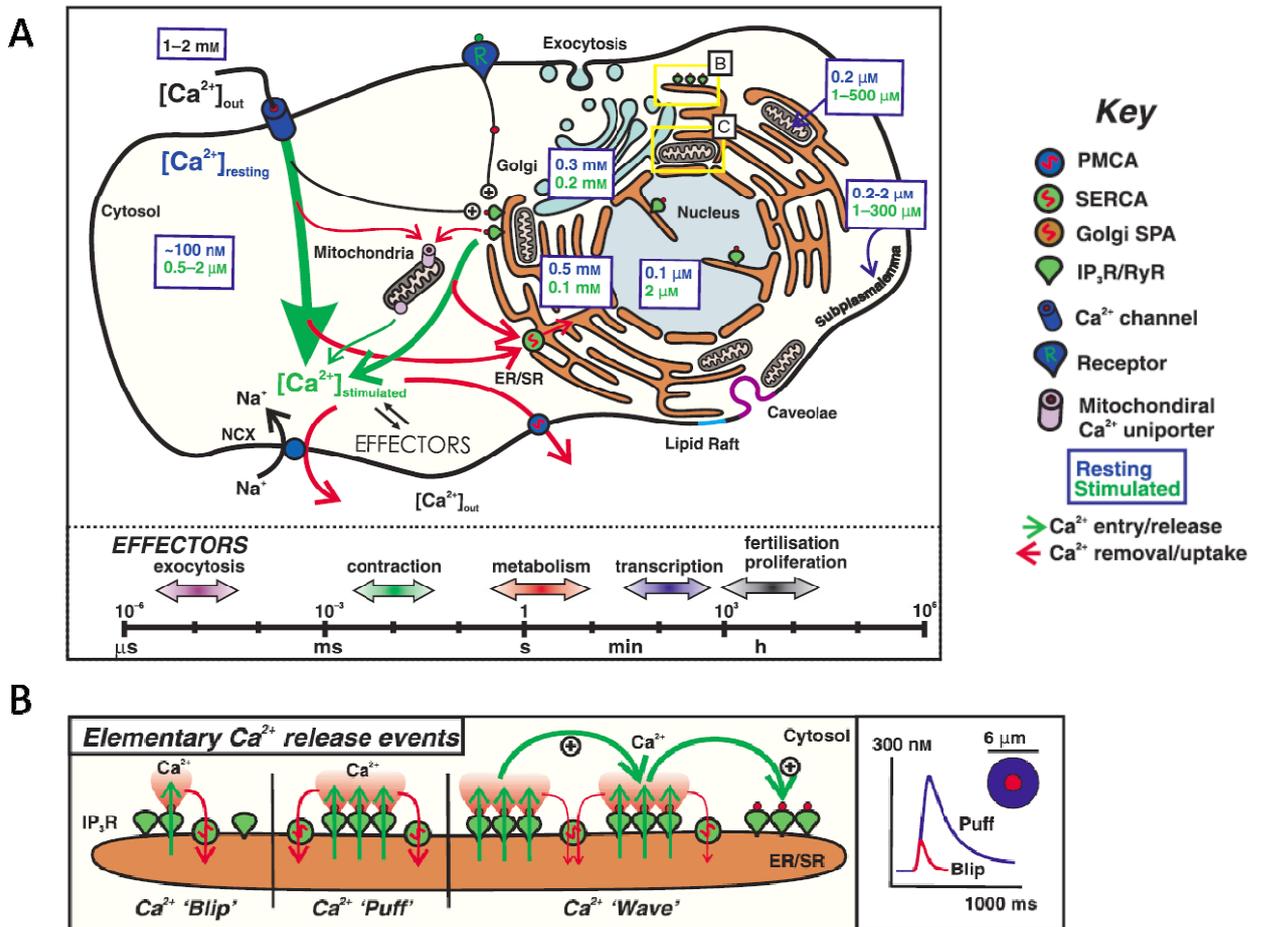


Abb. 1.2.: von Laude und Simpson (2009): räumliche wie zeitliche Entwicklung (A) eines Calcium Signals als auch Freilassungsereignisse (B).

Calcium-Signale erfolgen in Form von lokalen Ausschüttungsereignissen, die sich ausbreiten und ab einer bestimmten Schwelle zu einer Calcium-Welle und somit zu einem Signal in der Zelle führen. Gezeigt in Abb. 1.2.B. ist das Beispiel eines Ausschüttungsereignisses für den Inositol-2,3-triphosphat-Rezeptor (IP₃R), das auch für den Ryanodin-Rezeptor (RyR) gilt. Hierbei hydrolysiert Phospholipase C Phosphatidyl-Inositolbisphosphat nach Stimulierung eines Zellmembran-Rezeptors wie z.B. NMDA-, Ca_v-, TRP-Rezeptoren, aber auch durch CRAC (STIM / ORAi System), zu IP₃. Bei dem RyR System hingegen wird auf die Stimulation eines Zellmembran-Rezeptores cADP-R durch die ADP Ribosylzyklase CD38 freigesetzt (Berridge *et al.*, 2003; Clapham 2007). Nach Laude und Simpson (2009) bindet daraufhin IP₃ an die IP₃Rs in der ER-Membran und öffnet einen Kanal abhängig von der Konzentration an Calcium und IP₃. Die kleinste Einheit hierbei ist die Öffnung eines IP₃R, ein „blip“ (oder „quark“ bei RYR) für 200 ms mit einer Amplitude von weniger als 30 nM sowie einer geringen Reichweite (µm). Die folgende Gruppe entspricht dann einem „puff“ (oder „spark“) bei dem mehrere Rezeptoren beteiligt sind. Hierbei umfasst das Ereignis einen Zeitraum von ca. 500 ms, eine Amplitude von 200 nM sowie eine Reichweite von 6 µm. Bei der räumlichen und zeitlichen Summierung mehrerer „puffs“ ergibt sich eine Calcium-Welle, die sich schnell über die Zelle bewegt. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem saltatorischen Mechanismus der Signalweiterleitung. Die Kombination von cytosolischen Puffern und Rückführungsmechanismen erlaubt der Zelle dabei eine Steuerung der Signalrichtung. Die transiente Form sowie die Frequenz der Calcium-Welle (Calcium-Oszillation) stellen hierbei den Informationsgehalt des Signales dar (Berridge *et al.*, 2003; Berridge, 2006). Die beiden Rezeptortypen IP₃R und RyR sind Beispiele für Calcium entlassende Rezeptoren im endoplasmatischen Reticulum. Für die Rückführung von Calcium in das endoplasmatische Retikulum als Calciumspeicher, dient ein ATP verbrauchender Transporter, die Sarco/Endoplasmatische Calcium ATPase (SERCA) Pumpe. Der vorab genannte Calcium-Gradient wird durch ein ununterbrochenes Wechselspiel von SERCA und einem basalen Leckstrom im Ruhezustand der Zelle aufrecht erhalten (Camello, 2002; Wytach, 2002). Für den Leckstrom von Calcium aus dem ER werden verschiedene Proteine verantwortlich gemacht: Tu (2006) sieht Presenilin als Auslöser des Leckstroms, Vanden Abeele (2006) Pannexin 1, Verbert (2008) eine trunkierte Form des IP₃R Typ 1, Chami (2008) SERCA 1, Pinton und Rizzuto (2006) das anti-apoptotisch wirkende Bcl2, Guinti (2007) einen Kationenkanal und verschiedene Arbeitsgruppen den Sec61p-Translokation-Komplex des ERs (vgl. 1.1.4.).

1.1.2. Calcium-Homeostase und neuronale Erkrankungen

Da das ER verantwortlich ist für die posttranslationale Modifizierung von Proteinen, hat es ein hochentwickeltes, qualitatives Kontrollsystem entwickelt. Die Anhäufung von ungefaltetem Protein oder die Überexpression von Proteinen führen zu einer Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums: der „unfolded protein response“ (UPR; Austin, 2009) bzw. die „endoplasmic reticulum overload response“ (EOR). Die UPR verfolgt zwei Ziele: 1. Den Stop der Proteinsynthese durch Anhaltung der Proteinsynthese über die Translokon-Pore sowie die Aktivierung der Signalwege, die zu einer Erhöhung der molekularen Chaperone führen und 2. bei Nichterreichen eines neuen Equilibriums bei der Rückfaltung der entfaltenen Proteine die Einleitung der Apoptose. Wie vorab schon erwähnt hängen viele Enzymkaskaden im Cytosol wie auch im Lumen des endoplasmatischen Retikulums letztendlich von der Konzentration an Calcium ab. Es wurde daher ein Zusammenhang zwischen Calcium-Homeostase, dem Stress des endoplasmatischen Retikulums und neurodegenerativen Erkrankungen impliziert (Verkhatsky, 2005). Es konnte durch Paschen *et al.* (1996, 2001, 2003) gezeigt werden, dass eine Depletion der Calcium-Speicher des endoplasmatischen Retikulums die Hochregulierung von ER-Stressmarkern hervorruft, neuronalen Zelltod einleitet und, dass die Inhibition einer Calcium-Freisetzung aus dem ER-Lumen gegen Neurotoxizität schützt.

Der Ausstrom von Calcium aus dem ER scheint ebenfalls eine Rolle bei der Ischämie der weißen Masse des Gehirns zu spielen (Ouardouz *et al.*, 2003). Es konnte bei Experimenten mit Zellen der „dorsal columns“ aus Ratte gezeigt werden, dass ischämischer Schaden nur bei einem Ausstrom von Calcium aus dem Lumen des ER auftrat. Weiterhin konnte der Schaden durch einen Anstieg der Calcium-Konzentration unter Nutzung von Thapsigargin oder durch Hemmung des Calcium induzierten Calcium Austritts (CICR) durch Ryanodin gesteigert werden (Ouardouz *et al.*, 2003). Kawai *et al.* (2000) zeigten in *in vivo* Experimenten, dass die Fomalin induzierte nozizeptive Antwort bei diabetischen Mäusen durch Ryanodin und Thapsigargin modifiziert werden kann. Dies spricht für eine Beteiligung des ER-luminalen Calciums an Diabetes.

Die Anhäufung von Glycosylceramid aufgrund einer Mutation des Gens für Glucocerebrosidase, welche zu einer verringerten Aktivität des Enzyms führt, fördert die Neurodegeneration im ZNS. Diese Erkrankung ist unter Gaucher Krankheit bekannt (Bardo *et al.*, 2002). Im Verlauf dieser Gangliosidose erhöht sich die Anzahl der tubulären Elemente des ER und zeigt sich ein erhöhter Ausstrom an Calcium aus dem ER infolge von Koffein oder metatroper Stimulierung (Korkotian *et al.*, 1999). Zudem zeigten sich hippocampale Neuronen mit reduzierter Glucocerebrosidase verwundbarer gegenüber excitotoxischem Schock, was durch Zugabe von Ryanodin gestoppt werden konnte. Daher kann eine Umgestaltung der ER-Calcium-Homeostase und damit einer Erhöhung der Calcium-Konzentration im ER als Schlüsselement dieser Erkrankung betrachtet werden.

Eine weitere Erkrankung bei der die Calcium-Homeostase des ER eine Rolle spielt, ist die Alzheimer-Krankheit (Khachaturian, 1987). Die Alzheimer-Krankheit, als Form einer senilen Demenz, ist gekennzeichnet durch das Entstehen von Plaques durch Aggregate des Amyloid β -Peptides in der Hirnmasse und dem Auftauchen von fibrillösen Strukturen des Protein Tau im neuronalen Cytoplasma. Es konnte durch Murray *et al.* (1992) gezeigt werden, dass Neuronen mit fibrillösen Strukturen über erhöhte Mengen an freiem wie gebundenem Calcium verfügen. Gleichzeitig erhöhte sich auch die Aktivität Calcium-abhängiger Proteasen (Nixon *et al.*, 1994). Eine Erhöhung des Calcium-Ausstroms aus dem ER, infolge der Aktivierung von IP₃R und RyR wie auch eine Erhöhung der Proteinmenge an GRP78, konnte ebenfalls in Verbindung mit der Alzheimer-Erkrankung gebracht werden (Guo *et al.*, 1996, 1999; Chan *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002; Herms *et al.*, 2003; Stutzmann *et al.*, 2004; Verkhratsky, 2005). Die Änderung der Calcium-Homeostase des ER scheint daher eine direkte Auswirkung auf die Alzheimer Krankheit zu haben. Allerdings verbleibt die Frage: Erfolgen die Änderungen der ER-Calcium-Homeostase vor Bildung der A β -Peptide oder ist die A β -Fehlsynthese die Ursache der ER-Dysfunktion?

Weitere Erkrankungen mit einer gestörten Calcium-Homeostase sind u.a. neuronale Traumata, bei denen die Homeostase durch mechanische Beanspruchung gestört wird (Weber *et al.*, 2002); die Parkinson-Krankheit, für die gezeigt werden konnte, durch 6-Hydroxydopamine oder 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium, Verursacher einer neuronalen Schädigung wie die der Parkinson-Krankheit, eine UPR einleiteten (Ryu *et al.*, 2002; Takahashi und Imai, 2003); wie auch die Huntington-Krankheit, deren Neuropathologie auf einer Mutation im Protein Huntingtin herrührt, welches den IP₃R gegenüber IP₃ stärker sensitiviert (Tang *et al.*, 2003).

Das Wolfram-Syndrom, eine Krankheit, die auf Mutationen des Wolfram-Syndrom-Gens (WFS1) beruht (Ala127Thr, Ala134Thr und Arg178Pro), scheint ebenfalls eine Störung der Calcium-Homeostase hervorzurufen (Yurimoto *et al.*, 2009). Wolframin, das durch WFS1 codierte Protein konnte mit Calmodulin, einem Calcium bindenden Protein des Cytosols, chromatographisch aufgereinigt werden. Die Mutationen des WFS1 Gens inhibieren dabei die Bindung von Calmodulin an Wolframin. Da diese Bindung Calcium-abhängig ist, scheint Wolframin durch Calmodulin reguliert zu werden. Osman *et al.* (2003) konnten zeigen, dass eine Überexpression von Wolframin die cytosolischen Konzentration an Calcium erhöhen. Wolframin scheint daher mit der Calcium-Kanal-Aktivität der ER-Membran verbunden zu sein, ob als neuartiger Calcium-Kanal oder als Regulator der Aktivität der vorhandenen ER-Kanäle in Bezug auf Erhaltung der intrazellulären Calcium-Homeostase.

Die Erhaltung der Calcium-Homeostase und vor allem die strigente Kontrolle der cytosolischen Calcium Konzentration spielt in Blick auf die vorab genannten Erkrankungen eine wichtige Rolle. Der in 1.1.4. vorgestellte Leckstrom spielt in diesem Zusammenhang eine große Rolle, da er eine wichtige Teilkomponente der Calcium-Homeostase darstellt. Jede Störung des Leckstroms führt daher zu schweren Folgen für die Zelle. Daher wird auch eine enge Regulierung des passiven Ausstroms von Calcium aus dem ER gefordert. An dieser Regulierung scheinen Proteine der CREC-Protein-Familie beteiligt zu sein (1.1.5. und 1.1.5.1.).

1.1.3. Das endoplasmatische Retikulum und der Sec61p-Translokon-Komplex

Zellen werden definiert durch membranöse Grenzen, die einen selektiven Austausch von Molekülen und Information zwischen wässrigen Umgebungen regulieren (Schnell und Hebert, 2003). Die Plasmamembran der Zelle, aber auch die Membranen der zellulären Kompartimente, wie das ER, besitzen eine Vielzahl an komplexen Transportsystemen, die eine gerichtete Bewegung von Molekülen und Information gewährleisten. Diese Transportsysteme werden häufig als Translokon-Komplexe bezeichnet, da sie sich aus verschiedenen Proteinen zusammensetzen, die innerhalb des Komplexes verschiedene Aufgaben übernehmen. Alle Translokon-Komplexe verfügen über eine intrinsische Signalerkennung, welche als Bindungsstelle für die Signale der zu transportierenden Substrate dient (Schatz und Dobberstein, 1996). Zudem bilden die Komplexe selektiv permeable, proteindurchlässige Kanäle aus, die den Transport der Substrate zu ihrem Ziel vermitteln. Schließlich muss eine „treibende“ Kraft mit dem Komplex verknüpft sein, um die Substrate durch den Kanal zu translozieren. Dies wird meist durch eine Assoziierung mit molekularen Chaperonen erreicht.

Das endoplasmatische Retikulum ist für die posttranslationale Modifizierung von Proteinen, sowie den selektiven Transport von Proteinen zu verschiedenen Zielpunkten verantwortlich. Der co- oder posttranslationalen Transport von Proteinen in das ER erfolgt hierbei durch den Sec61p-Translokon-Komplex (Johnson und van Weas, 1999). Der Komplex wird gebildet von den Untereinheiten Sec61 α p, Sec61 β p, Sec61 γ p und TRAMP („translocating chain-associated membrane protein“) (Panzner et al., 1995; Rapoport et al., 1996). Weiterhin sind die Proteine Sec62p, Sec63p und ERj1p mit dem Translokon-Komplex assoziiert. Sec63p (Skowronek et al., 1999; Meyer et al., 2000; Tyedmers et al., 2000) und ERj1p (Dudek et al., 2002) stellen dabei J-Domänen-Proteine dar, die auf der luminalen Seite des ERs mit BiP, dem Säugerhomolog des Hefeproteins Kar2p, einem Chaperon aus der HSP70-Familie, interagieren. BiP wurde als treibende Kraft beim post-translationalen Transport nachgewiesen und versiegelt beim co-translationalen Transport das Translokon von der luminalen Seite (Haigh und Johnson, 2002; Alder *et al.*, 2005). Abbildung 1.3. zeigt den Translokon-Komplex für den co- bzw. posttranslationalen Proteintransport (Zimmermann und Blatch, 2009).

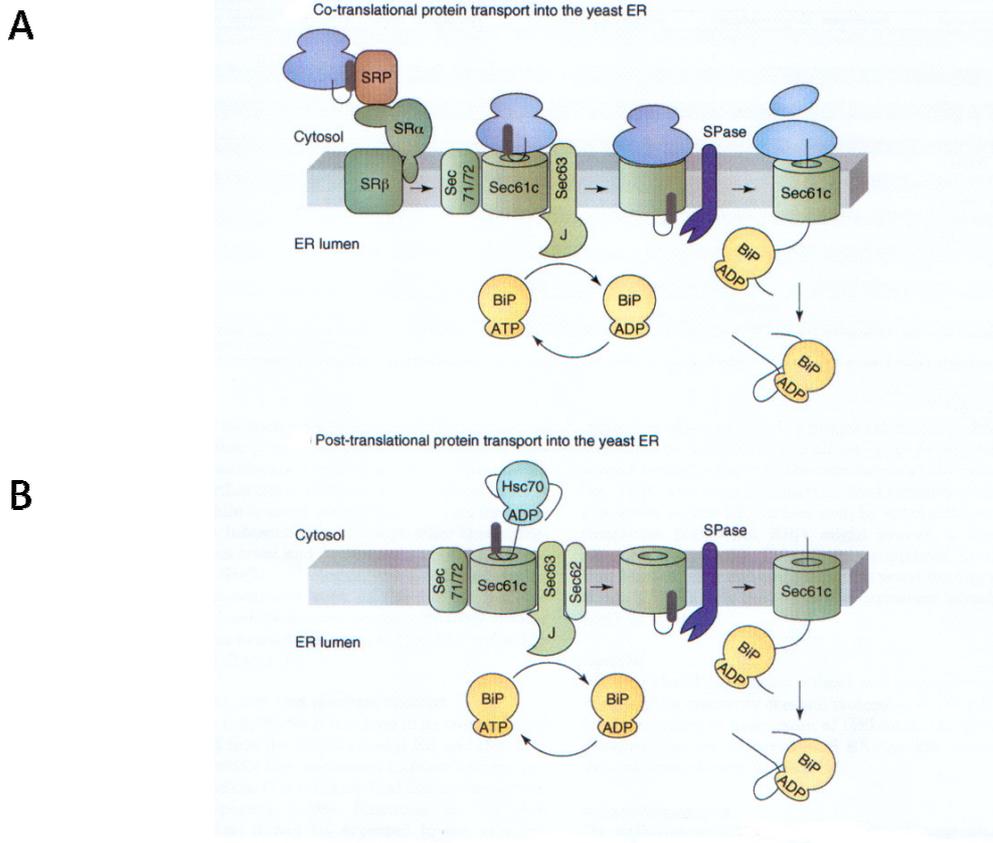


Abb. 1.3.: von Zimmermann und Blatch (2009): Translokon Komplex
 A) co-translationaler Transport.
 B) post-translationaler Transport.

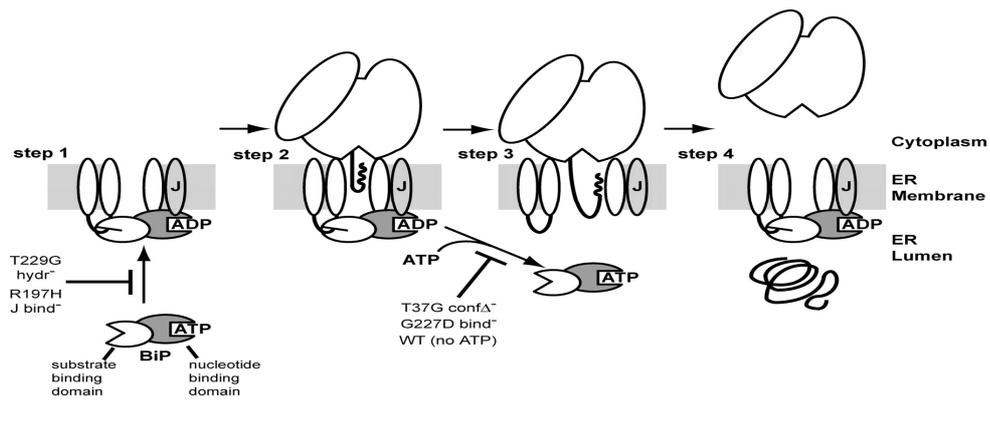


Abb. 1.4.: von Alder *et al.* (2009): Verschluss des Sec61p-Translokon-Komplexes durch BiP. Schritt 1 zeigt wie ADP gebundenes BiP das lumenale Ende des Translokons durch eine Interaktion mit dem SBD und einer Translokon-assoziierten Komponente bzw. durch eine Interaktion mit einem J-Domänen-Protein verschließt. Schritt 2 zeigt, dass BiP selbst nach einer SRP-abhängigen Bindung eines Ribosoms an das Translokon, diese verschließt. Schritt 3 zeigt die Öffnung des Translokons durch BiP, nachdem die naszierende Kette eine Länge von ~70 Aminosäuren erreicht und BiP eine ATP-gebundene Konfiguration angenommen hat. Schritt 4 zeigt, dass nach dem Ende der Translation des Substrates das Ribosomfreie Translokon wieder durch BiP verschlossen wird. Schritte, die durch BiP-Mutanten blockiert wurden, sind markiert.

Alder *et al.* (2005) konnten zeigen, dass BiP während seines ATPase-Zyklus den Sec61p-Translokation-Komplex verschließt. Für den Verschluss der Translokationspore muss BiP eine ADP-gebundene Konformation einnehmen. Eine anschließende Öffnung der Pore erfordert eine ATP-gebundene Form des BiP, welche eine erneute Änderung der Konformation von BiP einleitet. Weiterhin benötigt BiP für den Verschluss der Translokationspore neben seiner ADP-gebundenen Konformation auch die Interaktion mit den J-Domänen-Proteinen des Sec61p-Translokation-Komplexes. Daher beruht nach Alder *et al.* (2005) der Verschlussmechanismus auf dem Prinzip der Assoziation und Dissoziation eines HSP70 Chaperons zu seinem Substrat (vgl. Abb. 1.4.). Haigh und Johnson (2002) kommen zu einem ähnlichen Modell für den Verschluss der Translokation-Pore durch BiP.

1.1.4. Der Calcium-Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums

Wie schon unter 1.1.1. angesprochen wird der Calcium-Gradient im Ruhezustand der Zelle durch SERCA und einen basalem Leckstrom aufrecht erhalten (Camello, 2002; Wytach, 2002). Für den Leckstrom von Calcium aus dem ER wurden dabei verschiedene Proteine verantwortlich gemacht wie Presenilin, die Pore des Sec61p-Translokation-Komplexes u.a. (Pinton und Rizzuto, 2006; Vanden Abeele *et al.*, 2006; Guinti *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007; Verbert *et al.*, 2008; Chami *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2009). Bereits 2001 konnte jedoch von Heritage und Wonderlin gezeigt werden, dass der Sec61p-Translokation-Komplex durchlässig für neutrale und polare Moleküle ist. Die Pore des Translokation-Komplexes ist dabei in einem nicht translozierenden Zustand, jedoch an ein Ribosom gekoppelt. In diesem Zustand besitzt die Pore einen Durchmesser von ca. 20 Å. In diesem Zustand konnten Heritage und Wonderlin (2001) den Farbstoff 4-Methyl-Umbelliferyl- α -D-Glucopyranosid (4M α G) in das ER über das mit einem Ribosom besetzte Translokation einschleusen. Der Farbstoff selbst wird nur durch die ER-lumenale α -Glucosidase II aktiviert. Wie auch Johnson und van Weas (1999) sowie Johnson (2003) fordern Sie einen Verschluss der Pore durch BiP zum Erhalt der Permeabilitätsbarriere. In ihrem Versuch verweisen sie jedoch darauf, dass Ionen oder geladenen Moleküle unabhängig von BiP durch die Pore diffundieren können. Dass die Permeabilität des ER dynamisch an die Protein-Synthese gekoppelt ist, konnte 2003 durch Roy und Wonderlin bestätigt werden: wenn die naszierende Kette durch Puromycin oder Pactamycin vorzeitig von dem Ribosom-Translokation-Komplex entlassen wird, erhöht sich die Permeabilität für 4M α G um 20 – 30%.

Der Einsatz von Cycloheximid hingegen hemmte die Permeabilität. Roy und Wonderlin (2003) folgerten daher, dass kleine Moleküle nach Entlassung der naszierenden Kette durch den noch offenen Ribosom-Translokon-Komplex diffundieren können. Diese Erkenntnisse konnten 2003 durch Le Gall *et al.* bestätigt werden.

Dass der Ribosom-Translokon-Komplex den Calcium-Leckstrom aus dem ER vermittelt, konnte 2004 durch Van Coppenolle *et al.* durch Messung der Fluktuationen der cytosolischen wie lumenalen Calcium-Konzentrationen durch „fura-2“ und „mag-fura-2“ (Calcium bindende, fluoreszierende Farbstoffe) nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit Puromycin reduzierte die lumenale Calcium-Konzentration, auch in Anwesenheit von Heparin und Ryanodin. Bei Vorbehandlung durch Anisomycin (einem Inhibitor der Peptidyl-Transferase) konnte die Wirkung von Puromycin aufgehoben werden. Da der Effekt von Puromycin spezifisch für den Sec61p-Translokon-Komplex ist, folgerten Van Coppenolle *et al.* (2004), dass das Translokon die Hauptkomponente des Calcium-Leckstroms darstellt. Kopach *et al.* (2005) konnten in Acinar-Zellen zeigen, dass der Calcium-Leckstrom in Anwesenheit von Thapsargin, Heparin und Ruthenium Rot unverändert bleibt. D.h., dass der Leckstrom nicht über SERCA, IP₃R oder RYR vermittelt wird. Bei Zugabe von Puromycin hingegen ergab sich eine Intensivierung des Calcium-Leckstroms. Dies weist, wie die Erkenntnisse von Roy und Wonderlin (2003), Le Gall (2003) und Van Coppenolle (2004), auf eine Beteiligung des Sec61p-Translokon-Komplexes hin. In neuerer Zeit konnten Giunti *et al.* (2007) und Amer *et al.* (2009) eine Beteiligung des Sec61p-Translokon-Komplexes bei Calcium-Leckstrom aus dem ER direkt nachweisen.

Damit wird übereinstimmend ein System aufgestellt, indem der Calcium-Leckstrom über den einen substratfreien Ribosom-Translokon-Komplex vermittelt wird. Es konnte in den letzten Jahren zudem nachgewiesen werden, dass nach dem Ende der Translokation einer naszierenden Proteinkette die Ribosomen teilweise mit dem Translokon assoziiert blieben (Borgese *et al.*, 1973; Seiser und Nicchitta, 2000; Potter und Nicchitta, 2002; Schaletzky und Rapoport, 2006). Flourakis *et al.* (2006) bzw. Ong *et al.* (2007) konnten im Zusammenhang mit den Erkenntnissen aus 1.1.2. eine physiologische Beziehung zwischen dem Calcium-Leckstrom und der Induzierung von „store operated calcium entry“ (SOCE) Prozessen aufzeigen.

Es konnte durch Erdmann (2009) *via* elektrophysiologischen Messungen gezeigt werden, dass der Sec61p-Translokon-Komplex Calcium-Ionen über eine Membran leitet. Zudem blockiert Calcium-Calmodulin den Sec61p Kanal unter co-translationalen Bedingungen. Bei Zugabe von EGTA zu dem Versuchsaufbau konnte kein Calmodulin-Effekt beobachtet werden. Calmodulin scheint daher ein Modulator des Calcium-Leckstroms des Sec61p-Translokon-Komplexes zu sein. Calmodulin ist ein Calcium-bindendes regulatorisches Protein des Cytosols, welches in allen Eukaryonten hochkonserviert vorliegt (Copley *et al.*, 1999). Es spielt dabei vor allem in Calcium-abhängigen Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Calmodulin gehört zur Familie der EF-Hand-Proteine, die durch ein „helix-loop-helix“ Motiv gekennzeichnet sind über das Calcium-Ionen gebunden werden (vgl. Strynadka und James, 1989). Im Rahmen eines Co-Immunpräzipitationsversuches mit rauen Mikrosomen des Pankreas für Sec63p, ein J-Domänen-Protein, welches mit dem Sec61p-Translokon-Komplex assoziiert, fanden Tyedmers *et al.* (2005) eine Assoziation von Sec63p mit Calumenin, einem ER-luminalen EF-Hand-Protein.

1.1.5. Die Familie der CRECs

Wie schon unter 1.1. erwähnt, spielt Calcium eine sehr wichtige Rolle als sekundärer Botenstoff. Eine Regulierung der Calcium-Konzentration im Lumen des ERs oder im Cytosol findet über hoch affine Calcium bindende Proteine wie Troponin C, Calmodulin oder Parvalbumin statt (Honoré und Vorum, 2000). Eine gemeinsame Eigenschaft all dieser Proteine ist das EF-Hand-Motiv, ein „helix-loop-helix“ Motiv aus ca. 12 Aminosäuren, die koordiniert Calcium mittels den Sauerstoffatomen mehrerer saurer Seitenketten wie auch einem Carbonyl-Sauerstoffatom einer Peptidbindung in dem „loop“ komplexieren (Kretsinger *et al.*, 1973 und 1987). Die zur Bindung wichtigen Aminosäuren des Motivs entsprechen dem folgenden Schema: X (1) = D, Y (3) = D oder N, Z (5) = D, N oder S, -Y (7) = G, -X (9) = n* und -Z (12) = E; wobei n* eine beliebige nicht aromatische, Sauerstoff bindende Aminosäure wie z.B. Glu, Gln, oder Asp sein sollte (Honoré und Vorum, 2000). Abbildung 1.5. verdeutlicht die Komplexierung eines Calcium-Atoms mittels einer EF-Hand. Im Gegensatz zu den hoch affinen Proteinen des Cytosols besitzen die Calcium bindenden Proteine des ERs eine geringere Affinität zu Calcium bei einer höheren Kapazität. Beispiele hierfür bieten BiP, PDI und Calnexin (Meldolesi und Pozzan, 1998).

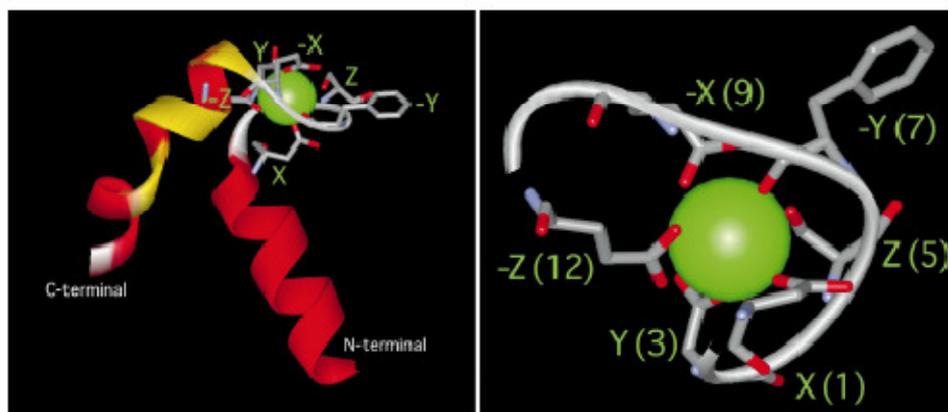


Abb. 1.5.: von Honoré und Vorum (2000): 3D Struktur des EF-Hand-Motives aus Parvalbumin. „helix-loop-Helix“ Struktur des EF-Hand-Motivs. Die zur Bindung wichtigen Aminosäuren des Motivs entsprechen dem folgenden Schema: X (1) = D, Y (3) = D oder N, Z (5) = D, N oder S, -Y (7) = G, -X (9) = n* und -Z (12) = E; wobei n* eine beliebige nicht aromatische, Sauerstoff bindendes Peptid wie z.B. Glu, Gln, oder Asp sein sollte.

Um 1990 wurden weitere EF-Hand-Proteine im sekretorischen Signalweg gefunden: Reticulocalbin (Ozawa und Muramutsu, 1993), Taipoxin assoziiertes Calcium-Bindeprotein 49 (TCBP-49, Weis *et al.*, 1994), ER-Calcium-bindendes Protein 55 (ERC-55) oder E6-Bindeprotein (E6BP, Chen *et al.*, 1995), Crocalbin (Hseu *et al.*, 1999), Cab45 (Scherer *et al.*, 1996; Koivu *et al.*, 1997) und Calumenin (Yabe *et al.*, 1997; Vorum *et al.*, 1998; Vorum *et al.*, 1999). Yabe *et al.* (1998) schlugen als Kennzeichnung dieser Proteinfamilie den Namen „CREC“ (Cab45, Reticulocalbin, ERC-55 und Calumenin) vor. Alle Proteine in dieser Familie verfügen über ER-Signalsequenzen (von Heijne, 1981; Nielsen *et al.*, 1997) wie auch ER-Rückhaltesignale in Form der Peptide HDEF, HDEL und HEEF (Pelham, 1990; Vorum *et al.*, 1999). Sie lokalisieren daher in den sekretorischen Kompartimenten der Zelle. Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Proteinfamilie ist der Besitz von bis zu 7 EF-Hand-Motiven. Die Funktion der „CREC“ ist noch nicht genau geklärt, da sie aber hoch konserviert sind in *Vertebrata* und *Invertebrata*, sowie eine homozygote Deletion des Reticulocalbin Gens tödlich ist, scheint die Proteinfamilie eine Rolle in der Erhaltung des normalen Zellverhaltens zu spielen (Kent *et al.*, 1997). Honoré (2009) sieht die Proteine der CREC-Familie als viel versprechende Biomarker und therapeutische Ziele für eine Vielzahl an Krankheiten.

1.1.5.1. Calumenin

Calumenin ist ein Mitglied der vorab vorgestellten Familie der CREC-Proteine und wurde erstmalig aus der Maus geklont (Yabe *et al.*, 1997) und im folgenden Jahr aus dem Menschen (Yabe *et al.*, 1998; Vorum *et al.*, 1998). Das Gen für Calumenin findet sich in der Maus wie bei dem Menschen auf Chromosom 7 und codiert für ein 315 Aminosäuren langes Protein (37 kDa) mit einer ER-Signalsequenz und einem HDEF ER-Rückhaltmotiv. Calumenin verteilt sich nach Vorum *et al.* (1998) ubiquitär auf alle Zelltypen. Der Unterschied zwischen dem Calumenin aus der Maus und dem Menschen liegt in der Anzahl der EF- Hand-Motive: Maus = 6 und Mensch = 7. Vorum *et al.* (1999) konnten zudem zeigen, dass entgegen des HDEF Motives Calumenin über den gesamten sekretorischen Weg verteilt ist, sowie in das umgebene Medium sezerniert werden kann.

Eine Funktion von Calumenin im extrazellulären Raum ist nach Vorum *et al.* (2000) eine Interaktion mit der Serumamyloid P Komponente (SAP) in Anwesenheit von Calcium. Dies konnte mittels Oberflächenplasmonenresonanz genauer bestimmt werden. Calumenin scheint daher an der immunologischen Abwehr des pathologischen Prozesses der Amyloidosis beteiligt zu sein, die durch eine Bildung von amyloiden Ablagerungen gekennzeichnet ist. SAP, das in der Leber synthetisiert und in den Blutstrom sezerniert wird, gehört zur Pentraxin Familie der Plasmaproteine und hat eine Funktion in der nichtspezifischen Abwehr (Steel und Whitehead, 1994). SAP wird durch Inflammation induziert und bietet einen erhöhten Schutz gegenüber Mikroorganismen sowie Gewebeschäden (Steel und Whitehead, 1994). Zudem wird SAP lokal oder systemisch durch Zytokine aktiviert. Calumenin, als neuer Interaktionspartner von SAP kann daher ebenfalls an der Wirtsverteidigung beteiligt sein. Calumenin wie SAP haben eine Tendenz Calcium abhängig zu aggregieren (Pepys und Baltz, 1983; Pepys *et al.*, 1985). Beide können deshalb eine Rolle bei der Amyloidose spielen.

Eine weitere Rolle scheint Calumenin bei der Blutgerinnung zu spielen (Wajih *et al.*, 2004). Bei der Blutgerinnung sind Vitamin K-abhängige Proteine beteiligt, die post-translational durch das Vitamin K-abhängige γ -Carboxylationsystem in Matrix Gla-Proteine (MGP) umgewandelt werden. Das System lokalisiert in der ER-Membran und beinhaltet die γ -Carboxylase und das Warfarin-sensitive Enzym Vitamin K₁ 2,3-Epoxidreductase (VKOR). Nach Wajih *et al.* (2004) interagiert Calumenin inhibierend mit der γ -Carboxylase; eine Regulierung von Calumenin mit siRNA führte zu einer 5-fachen Erhöhung der γ -Carboxylase-Aktivität. So konnten Wajih *et al.* (2004) zeigen, dass das „silencing“ von Calumenin mittels siRNA die Produktion von funktionellem, rekombinantem humanem Faktor IX der Blutgerinnung stark erhöht wird. Ähnliche Beobachtungen für Annexine und Pentraxine finden sich bei Nelsestuen und Ostrowski (1999). Wallin *et al.* (2001) konnten zudem zeigen, dass die Konzentration von Calumenin in der Leberzelle die Enzymaktivität von VKOR und die Inhibition von VKOR durch Warefarin beeinflusst. Weiterhin hat Calumenin durch die obengenannten Mechanismen einen Einfluß auf die Bildung von atherosklerotischen Läsionen (Coppinger *et al.*, 2004), was durch den Fund von Hansen *et al.* (2008) bekräftigt werden konnte. Es wurde gezeigt, dass Calumenin Calcium-abhängig mit Thrombospondin-1 interagiert und daher einen Einfluß auf die Haemostase und die Pathophysiologie der Thrombosis hat.

Ostergaard *et al.* (2006) hingegen konnten nachweisen, dass extrazelluläres Calumenin die Pegel an n- wie c-terminalem Aktin reduziert, als auch die Expressionspegel von Septin 2, welches mit dem Aktin-Cytoskelett interagiert und in die Cytokinese involviert ist. Calumenin kann also autokrin oder parakrin auf Zellen in seiner direkten Nähe einwirken.

Calumenin wird bei pleuraler Mesotheliomie (Pass *et al.*, 2004) und dem Plattenepithelkrebs der Lunge (Shen *et al.*, 2002) hochreguliert. Weiterhin fand sich eine Hochregulierung von Calumenin bei der Heilung von Brüchen (Nakazawa *et al.*, 2004), Cardiomyopathie (Grzeskowiak *et al.*, 2003), Verletzung der Nerven (Jiménez *et al.*, 2005), Lipopolysaccharid-induzierte Apoptose (Huang *et al.*, 2002), und Gebärmutterhalskrebs (Castagna *et al.*, 2004).

Neben den oben erwähnten Rollen von Calumenin fanden Tyedmers *et al.* (2005), dass Calumenin mit der Proteintranslokase, bestehend aus Sec61p Trimer und den assoziierten Proteinen Sec62p und Sec63p, interagiert. Es wird angenommen, dass die gebildete Translokationspore Ionenkanal-Charakter besitzt (Simon *et al.*, 1989 und 1991; Wirth *et al.*, 2003). Kapitel 1.1.4. geht näher auf das Thema ein. Es konnte von Tyedmers *et al.* (2005) eine Interaktion von Calumenin mit Sec63p innerhalb eines Co-Immunitätsversuch nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, dass Calumenin einen Einfluß auf den Calcium-Leckstrom des ERs besitzt. Dass Calumenin mit einem Calcium-Transporter interagiert, konnte von Jung *et al.* (2006) im Falle der Calumenin-Interaktion mit dem Ryanodin-Rezeptor-1 sowie von Sahoo und Kim (2008) im Falle der SERCA gezeigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression an Calumenin in C2C12 Myotblasten zu einem erhöhten Koffein-induzierten Calciumausstrom führt, jedoch auch zu einer Reduzierung des Depolarisations induzierten Calcium-Ausstroms. Calumenin scheint also in der Calcium-Homestase der Zelle eine nicht geringe Rolle zu spielen.

1.2. Die Chaperone des endoplasmatischen Retikulums

Das endoplasmatische Retikulum ist eines der wichtigsten Kompartiment der eukaryontischen Zelle. Alle sekretorische Proteine, Proteine der Plasmamembran sowie Proteine, die entweder im ER oder im Golgi-Komplex lokalisiert sind, müssen in das Lumen des ER transportiert werden, wo sie gefaltet und gegebenenfalls modifiziert werden. Zu den molekularen Chaperonen des endoplasmatischen Retikulums gehören Proteine der Familien HSP40, HSP70, HSP90 sowie der Lectine (siehe Tab. 1. nach Weitzmann, 2007).

Tab 1.: Vertreter der Chaperonfamilien im ER von Säugern.

Chaperonfamilie	Säuger
HSP70/ HSP70-verwandt	BiP (Grp78) Grp170
HSP40	ERj1p (Mtj1p) ERj2p (Sec63p) ERj3p (HEDJ, Dj9) ERj4p (ERdj4p, MDG1) ERj5p (ERdj5p, JPDI) ERj6p (IPK, P58)
Nukleotidaustauschfaktor	Sil1 (BAP) GRP170
HSP90	Grp94
Lektine	Calnexin Calretikulin

Als Hauptvertreter der HSP70 Familie des Säuger ERs wurde BiP zuerst als Glucose-reguliertes Protein von 78kDa (Grp78) und später als Immunglobulin schwere Kette bindendes Protein (BiP) beschrieben (Pouysségur et al., 1977; Haas und Wabl, 1983). Grp170 (170 kDa glucose-regulated protein) ist ein HSP70 verwandtes Glykoprotein im ER. Es besitzt eine N-terminale ATPase-Domäne mit großer Ähnlichkeit zu HSP70-Proteinen, sowie eine N-terminale peptidbindende-Domäne, die Ähnlichkeiten zur HSP110-Familie aufweist (Chen et al., 1996). Grp170 stellt jedoch den Vertreter einer neuen HSP70-Unterfamilie dar (Park et al., 2003). Die folgende Abbildung 1.6. von Dudek *et al.* (2009) zeigt das Netzwerk aus HSP70-Chaperonen und Co-Chaperonen im ER von Säugern.

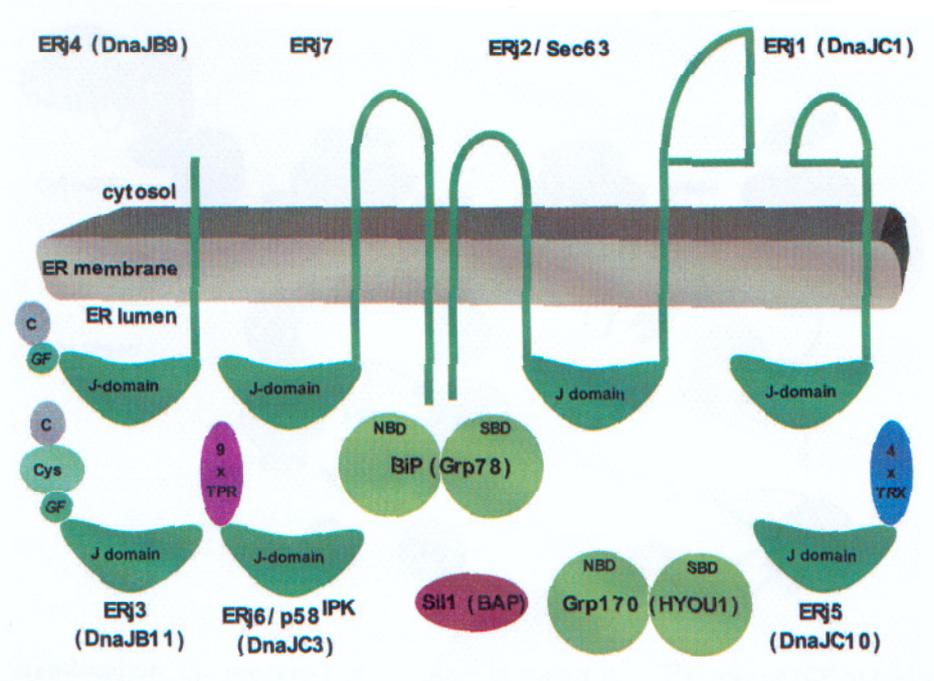


Abb. 1.6.: von Dudek *et al.* (2009), Netzwerk von HSP70-Chaperonen und Cochaperonen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums von Säugern. PBD: Peptidbindungsdomäne, J: J-Domäne, G/F: Gly/Phe-reiche Region, Cys: Cystein-reiche Region, TRX: Thioredoxin-Domäne, C: Carboxy-Terminus, N: Amino-Terminus.

1.2.1. Das Chaperon-Netzwerk und ER-Stress

Das ER ist das Kompartiment der eukaryontischen Zelle in das Proteine transportiert werden, die posttranslational modifiziert werden oder selektiv zu bestimmten Orten der Zelle, wie der Plasmamembran, transportiert werden. Um diese Vorgänge zu regulieren und aufrecht zu erhalten, verfügt das ER über hochentwickelte, qualitative Kontrollsysteme. So führt die Anhäufung von ungefaltetem Protein zur UPR oder die Überexpression eines Proteins zur EOR als Stressantwort der Zelle. Bei der „unfolded protein response“ (UPR) werden Proteine, die nicht in der Lage sind korrekt zu falten, im ER zurückgehalten und bilden stabile Komplexe mit BiP und anderen molekularen Chaperonen. Eine Erhöhung der Menge an fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen führt ebenfalls zu einer Hochregulierung der Transkription vieler Gene, die für weitere Chaperone und Faltungskatalysatoren des ERs kodieren (McMillan *et al.*, 1994; Shamu *et al.*, 1994). Es wird also bei Stress aufgrund der Anhäufung fehlgefalteter Proteine die Kapazität des Chaperonsystems erhöht. Lang anhaltender ER-Stress führt schließlich zur Auslösung der Apoptose der Zelle.

Das Signal für die Induktion der UPR ist hierbei nicht die Akkumulation fehlgefalteter Proteine, sondern eine Abnahme der Konzentration von freiem BiP im ER, die durch eine Komplexbildung von BiP mit ungefalteten Proteinen zustande kommt (Kohno et al., 1993). Die an den Signalketten der UPR beteiligten ER-Membranproteine ATF6, IRE1 und PERK besitzen Domänen im ER-Lumen, die mit BiP interagieren. Eine Assoziation von BiP an diese Faktoren inaktiviert diese. Bei einem Stress aufgrund fehlgefalteter Proteine dissoziiert BiP von den Faktoren und bindet an die fehlgefalteten Proteine, wodurch IRE1 und PERK durch Dimerisierung und ATF6 durch Transport zum Golgi-Apparat aktiviert werden (Bertolotti et al., 2000; Shen et al., 2002). Der die UPR-Gene aktivierende Transkriptionsfaktor ATF6 wird im Golgi-Apparat von den Proteasen S1P und S2P gespalten (Ye et al., 2000) und die Fragmente anschließend in den Zellkern transportiert, wo sie als Transkriptionsfaktoren agieren (Yoshida et al., 2000). Viele UPR-Gene enthalten ein ER-Stress-Element (ERSE) in ihrer Promotorregion. An dieses binden Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ATF6, die über eine Steigerung der Transkription die Synthese von Chaperonen und anderen Faltungsfaktoren erhöhen (Yoshida et al., 1998; Roy und Lee, 1999).

Ein weiteres UPR-Signalprotein der ER-Membran ist IRE1, das bei ER-Stress autophosphoryliert wird und dadurch eine RNase Aktivität entwickelt. Dies führt zu einem Spleißen der mRNA von XBP1, wodurch ein weiterer Transkriptionsfaktor der UPR entsteht (Yoshida et al., 2001). Zudem wird bei der UPR die globale Proteinsynthese reduziert. Dabei spielt das Protein PERK eine zentrale Rolle (Shi et al., 1998). PERK ist eine Kinase, die bei ER-Stress die α -Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors 2 (eIF2 α) phosphoryliert, was die Inhibierung von Translations-Initiationskomplexen zur Folge hat, die für die Erkennung von AUG-Startkodons notwendig sind (Harding et al., 1999).

ERj1p ist ein HSP40-Chaperon dessen Rolle bei der UPR von Dudek *et al.* (2005) untersucht wurde. Da die cytosolische Domäne von ERj1p durch Interaktion mit Ribosomen die Translation hemmt und dieser Effekt durch die Bindung von BiP an die luminale J-Domäne aufgehoben wird, ist eine Regulation wie bei ATF6, IRE1 und PERK denkbar. Bei einem Stress aufgrund fehlgefalteter Proteine arretiert ERj1p die Translation. Dieser Arrest kann erst wieder durch die Bindung von BiP an ERj1p aufgehoben werden. Durch dieses System wird die Synthese neuer Proteine im Falle der UPR reduziert.

Durch eine Analyse von ERj1p *via* Computer, konnte ERj1p als potentieller, Membran verankerter Transkriptionsfaktor identifiziert werden (Zupicich et al., 2001). Die cytosolische Domäne des ERj1p kann mit dem Kernimport Faktor Importin- β interagieren und konnte auch im Kern nachgewiesen werden, daher könnte der c-Terminus von ERj1p eine weitere Rolle bei der UPR spielen. So besteht die Möglichkeit, dass durch eine regulierte Intramembranproteolyse der cytosolische Teil von ERj1p abgespalten wird und als Transkriptionsfaktor in den Kern gelangt, wo er selektiv die Transkription bestimmter Gene induzieren könnte (Dudek *et al.*, 2005). Es lässt sich somit grundsätzlich sagen, dass das Chaperon-Netzwerk des ER stark in die Stressantwort wie Qualitätskontrolle eingebunden ist (Faitova *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Oyadomari *et al.*, 2006; Bukau *et al.*, 2006; Weitzmann *et al.*, 2007).

1.2.2. Chaperone und Krankheiten

Der Transport von Proteinen in das ER ist der erste Schritt in der Biosynthese von sekretorischen - wie Membranproteinen. Die am ER-Transport beteiligten Proteine wie der Translokon-Komplex und das Chaperonnetzwerk wie auch das ER als Calcium-Speicher sind in diverse Erkrankungen involviert. Dies kann ein Defekt im Transport oder in der Antwort auf die UPR sein, als auch ein Defekt in der Calcium-Homeostase.

So konnte Zimmermann *et al.* (2006) zeigen, dass Defekte der am ER-Transport beteiligten Proteine Sil1p, Sec62p und Sec63p Krankheiten auslösen können. Defekte im Gen SIL1 führen dabei zu einer neurodegenerativen Erkrankung (Marinesco-Sjörgen Syndrom), wohingegen Defekte im Gen SEC63 die polycystische Lebererkrankung ausbilden. Eine Erhöhung der Expression von Sec62p (Prostatakrebs) und Sec63p wird mit verschiedenen humanen Krebserkrankungen assoziiert.

Defekte innerhalb des Chaperon-Netzwerks führen ebenfalls zu bestimmten Krankheiten (Ni und Lee, 2007): so hat BiP eine Relevanz in Bezug auf Krebs, Alzheimer, Parkinson, Prion Erkrankungen und Arteriosklerose (Kokame *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 2001; Reddy *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2005; Hetz *et al.*, 2005; Fu und Lee, 2006; Li und Lee, 2006; Luo *et al.*, 2006; Hoshino *et al.*, 2007; Dudek *et al.*, 2009);

Defekte bei Sll1p haben einen Einfluß auf neurodegenerative Erkrankungen (Anttonen *et al.*, 2005; Senderek *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Zimmermann *et al.*, 2006); GRP94 wird mit Krebs -, Prion – und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Reddy *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003; Hetz *et al.*, 2005; Fu und Lee, 2006; Srivasta, 2006); GRP170 (Easton *et al.*, 2000; Weitzmann *et al.*, 2006; Hoshino *et al.*, 2007), GRP58 (Turano *et al.*, 2002; Erickson *et al.*, 2005; Hetz *et al.*, 2005; Garbi *et al.*, 2006) und PDI (Turano *et al.*, 2002; Ellgaard und Ruddock, 2005; Uehara *et al.*, 2006) spielen jeweils eine Rolle bei der Alzheimer oder Parkinson Erkrankung. Alle diese Defekte, die zu einer Störung der Chaperonaktivität, Aggregation und Stress führen, bezeichnen Macario und Conway de Macario (2007) daher als sogenannte Chaperonopathien.

Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des putativen ER-HSP40-Chaperon ERj7p. ERj7p wurde in einer Proteomanalyse der Arbeitsgruppe entdeckt. Hier sollte die Interaktion von ERj7p mit BiP hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht werden. Von Weitzmann (2007) ist bekannt, dass ERj-Proteine ein Netzwerk mit BiP und Nukleotid austauschfaktoren wie GRP170 und Sil1p bilden. Die Frage war daher: Ist ERj7p auch Teil dieses Netzwerkes?

Die für ERj7p erarbeiteten Methoden sollten dann für die Untersuchung der Interaktion von Calumenin mit der Sec63p-Einheit des Sec61p-Translokon-Komplexes benutzt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung, des in Säugerzellen vorkommenden, ER-luminalen EF-Hand-Proteins Calumenin. Die EF-Hand-Motive verweisen dabei auf Calcium-bindende Eigenschaften (Vorum *et al.*, 1998 und 1999). Es ist bekannt, dass Calumenin mit der Sec63p-Untereinheit des Translokon-Komplexes assoziiert (Tyedmers *et al.*, 2005). Für Calmodulin, ein cytosolisches, Calcium-bindendes Protein, konnte bereits eine Interaktion mit der Sec61p-Untereinheit des Translokon-Komplexes (Erdmann, Dissertation, 2009) gezeigt werden. Daher sollte im Rahmen der Arbeit die Interaktion von Calumenin mit dem J-Domänen-Protein Sec63p genauer untersucht werden. Dabei ging es um die Fragen, ob es sich um eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen handelt und ob diese Interaktion Calcium-abhängig ist. Ferner sollten die für die Interaktion der beiden Proteine wichtigen Bindemotive innerhalb des Sec63p bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Düsseldorf: Gilson-Pipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevomatic 60

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: Photometer Ultrospec 3000, Spannungsgeräte EPS 3500 und ESP 600, Image Master[®]VDS,

Beckman, München: GS-6KR Zentrifuge, J2-MC Zentrifuge mit JA-10 und JA-20 Rotor, L-80 Ultrazentrifuge mit Ti 70 und SW55TI Rotor, Optima[™] TLX Ultrazentrifuge mit TLA 100.3 und TLA 100 Rotor

Biacore, Uppsala, Schweden: BiacoreX und Software

BioRad, München: Chromatographiesäulen (20 ml), Trans-Blot[®]Electrophoretic Transfer Cell (Nass-Blot-Apparatur)

Eppendorf, Hamburg: Kühlzentrifuge 5402, Thermostat 5320 (Heizblock), Tischzentrifuge 5415C, Thermomixer

Fröbel, Wasserburg: Geltdrockner, Sterilbank, Wipptische, Ultraschallgerät mit VCX-Micro- und Macrotip

Greiner&Söhne, Nürtingen: Petrischalen

Heidolph: Magnetrührer MR 3000

Heraeus, Hanau: Brutschränke

Infors, Bottmingen, CH: Inkubationsschüttler

Julabo, Seelbach: Wasserbäder

Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat AR

Merck, Darmstadt: PEI-Cellulose Dünnschichtchromatographie-Platten

Millipore Co., Bedford, USA: Centricon[®]-Centrifugal Filter Devices (2 ml, YM-30 MW), Immobilon-P Transfermembran (Dicke 0,45 µm) (PVDF), Semi-Dry-Blotapparatur

Molecular Dynamics: Phosphoimager[™]-SF mit Exponierplatten, -Kammer und Belichter, Personal Densitometer

Oncogene, San Diego, USA: Multiple Tissue Blot, Mouse

Sartorius, Göttingen: Feinwaagen, Membrane Adsorbers Q5F

Schleicher & Schuell, Dassel: Filterpapiere, Sterilfilter (0,2 µm)

Schütt, Göttingen: Autoklav

Scientific Industries, Bohemia N.Y., USA: Vortex-Mixer Genie 2™

Waters-Millipore, Milford, USA: Milliporewasseranlage Milli-Q

WTW, Weilheim: pH-Meter pH 537

Elektrophoresekammern (Eigenbau der Werkstatt Biochemie 1, Göttingen)

2.1.2. Chemikalien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg: ECL-Western Blot Detektionssystem, Glutathion Sepharose® 4B, ³⁵S Methionin (1000 Ci/mmol)

BioRad, München: BioRad Protein Assay, „Kaleidoscope prestained SDS-PAGE standards“, Hydroxylapatit

Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, USA: CHAPS

Difco Laboratories, Detroit, USA: Bacto Agar, Bacto Trypton, Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)

Genomed, Bad Oeyenhausen: Midi-Präparation Jetstar

GibcoBRL, Heidelberg: Agarose, 10 kDa Proteinmarker, 1 kb DNA-Leiter

ICN, Eschwege: γ -³²P-ATP (4500 Ci/mmol)

Promega Biotec, Madison, USA: RNasin® Ribonuklease-Inhibitor, T7 RNA-Polymerase

Riedel de Haen, Hannover: Aceton, Essigsäure, Trichloressigsäure

Roche, Mannheim: ATP, DTT, Translation Kit (TnT T7 Retikulozytenlysat), Restriktionsendonukleasen

Serva, Heidelberg: Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Bromphenol-blau, Coomassie-Brilliant-Blue R250 und G250, Ethanol, Hepes, MOPS, Saccharose, SDS, TEMED, TritonX-100

Sigma-Aldrich, München: β -Mercaptoethanol, Ampicillin, BSA, DMSO, EGTA, Glucose, Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG), Peroxidase-gekoppelte Anti-IgG-Antikörper

Whatman, Maidstone, England: DE52-Cellulose

Alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.2. Verwendete Antikörper, Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1. Antikörper

Die verwandten Antikörper sind Peptidantikörper und wurden aus dem Blut von Kaninchen gewonnen. Die Immunisierung der Kaninchen mit Protein sowie die Gewinnung der Antisera wurden im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes durchgeführt.

Tabelle 2.1. Übersicht der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Interne Nummer	Beschreibung	Verdünnung	Typ	Sequenz
BiP	950	-	1 : 500	polyklonaler Antikörper	-
Calumenin	344	-	1 : 500	polyklonaler Antikörper	-
ERj7p	1026/27	n-Terminus	1 : 500	polyklonaler Antikörper	LVEGLYC oder CNEGPGGRLTFVDD
Sec62p	262	c-Terminus	1 : 500	polyklonaler Antikörper	-
Sec63p	286 S	c-Terminus	1 : 500	polyklonaler Antikörper	-

Ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper, an den die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, sowie ECL Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und ECL Plex Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5 wurden als Sekundärantikörper in Western Blot Analysen benutzt. Um einen Vergleich innerhalb von Zellproben zu erhalten, wurde ein Maus-anti- β -Aktin Antikörper (Sigma) als Standardmarker verwendet. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde ein Kaninchen-anti-Glutathion-S-Transferase Antikörper (Sigma) herangezogen. Ein Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-488 Fluor-IgG Antikörper (Sigma) wurde in den Immunfluoreszenz-Analysen benutzt.

2.2.2. Bakterielle Stämme

Tabelle 2.2. Übersicht der verwendeten *E. coli* Stämme.

Bakterielle Stamm	Beschreibung
<i>E. coli</i> JM101	-
<i>E. coli</i> Rosetta pLysS	Laktose-Permease (<i>lacY</i>) Mutant, Mangel an <i>lon</i> und <i>ompT</i> Proteasen; enthält ein Plasmid mit <i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>glyT</i> , <i>IleX</i> , <i>leuW</i> , <i>metT</i> , <i>proL</i> , <i>thrT</i> , <i>thrU</i> , and <i>tyrU</i> ; <i>pLysS Cam^R</i>
<i>E. coli</i> Rosetta Star	Laktose-Permease (<i>lacY</i>) Mutant, Mangel an <i>lon</i> und <i>ompT</i> Proteasen; enthält ein Plasmid mit <i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>glyT</i> , <i>IleX</i> , <i>leuW</i> , <i>metT</i> , <i>proL</i> , <i>thrT</i> , <i>thrU</i> , and <i>tyrU</i> ; <i>Cam^R</i>

2.2.3. Plasmide

Tabelle 2.3. Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Firma
pCDNA3-Calumenin	Gesamtsequenz von Calumenin (RPZD-Klon: IRAUp96F0847D) mit Signalsequenz	Invitrogen
pGEX-4T-TEV-804-Calumenin	Gesamtsequenz von Calumenin (RPZD-Klon: IRAUp96F0847D) ohne Signalsequenz; n-terminaler GST-„tag“	GE Healthcare
pGEX-4T-TEV-804-ERj7-J-Domäne	J-Domäne von ERj7p (RPZD-Klon: EX-E1345-B02); n-terminaler GST-„tag“	GE Healthcare
pIVEX-2.3-MCS-Calumenin	Gesamtsequenz von Calumenin (RPZD-Klon: IRAUp96F0847D) ohne Signalsequenz; c-terminaler His ₆ -„tag“	Roche Applied Science

2.2.4. Oligonukleotide

Tabelle 2.4. Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer.

Primer	Beschreibung	Sequenz	Produkt
RZ126 Calumenin fw.	<i>EcoRI</i> , ATG, Signalsequenz	5'-GGAATTCATGGACCTGCGACAGTTTC-3'	pCDNA3; Calumenin <i>in vitro</i> Translation
RZ127 Calumenin rev.	<i>XhoI</i> , TGA	5'-CGGCTCGAGTCAGAACTCATCATGCCG-3'	pCDNA3; Calumenin <i>in vitro</i> Translation
RZ165 Calumein fw.	<i>XhoI</i> , ohne ATG	5'-CCGCTCGAGAAACCCACAGAAAAGAAGGAC-3'	pGEX-4T- TEV-804; GST- Calumenin
NotICALUrev	<i>NotI</i> , TGA	5'- CCCGGCGGCCGCTCAGAACTCATCATGCCGTACTAA GGC-3'	pGEX-4T- TEV-804; GST- Calumenin
RZ167 ERj7-J- Domäne fw.	<i>NdeI</i> , ATG, ohne Signalsequenz	5'-GGAATTCATATGCTGGTGGAGGGGCTCTAC-3'	pGEX-4T- TEV-804; GST- ERj7-J- Domäne
RZ168 ERj7-J- Domäne rev.	<i>BamHI</i> , ohne TGA	5'-CGGGATCCTCTAACATCCACCTTAGG-3'	pGEX-4T- TEV-804; GST- ERj7-J- Domäne
RZ157 Calumenin fw.	<i>NdeI</i> , ATG	5'-GGGAATTCATATGAAACCCACAGAAAAGAA-3'	pIVEX 2.3 MCS; Calumenin -His ₆
RZ160 Calumenin rev.	<i>XhoI</i> , ohne TGA	5'-CCGCTCGAGGAACTCATCATGCCGTAC-3'	pIVEX 2.3 MCS; Calumenin -His ₆

2.3. Präparative Methoden

2.3.1. Solubilisierung von rauen Mikrosomen

Raue Mikrosomen des Hundepankreas wurden bei 14.000 rpm bei 4°C für 10 min in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Danach wurde das resultierende Sediment in Chromatographiepuffer 400 Puffer aufgenommen und entweder 20 min auf Eis inkubiert und auf dem Vortexer gemischt oder 30 min bei 4°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die nicht gelösten Bestandteile wurden mittels einer Ultrazentrifugation bei 68.000 rpm bei 2°C für 20 min in einem TLA 100.3 Rotor abgetrennt. Der Überstand wurde als RM-Extrakt in den „pull down“ Versuchen eingesetzt.

Chromatographiepuffer 400:

20 mM HEPES/KOH pH 7,5

400 mM KCl

2 mM MgCl₂

1 mM EDTA

0,65% (w/v) CHAPS

1 : 1000 Protease-Inhibitor Mix (PLAC):

12 mg Pepstatin A

12 mg Leupeptin

12 mg Antipain

12 mg Chymastatin

alle in je 1 ml DMSO gelöst und
vereinigt

2.3.2. Expression und chromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine

2.3.2.1. Reinigung von Proteinen mit GST-„tag“

Um eine spezifische Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* zu ermöglichen, wurden die Proteine als Fusionsproteine mit einer n-terminalen Gluthathion-S-Transferase (GST) synthetisiert. Dieser „tag“ vermittelt die Bindung der zu reinigenden Proteine an eine GSH-Sepharose. Durch anschließendes Waschen der Matrix zur Beseitigung von unspezifisch gebundenem Protein und Elution mit GSH wird so gezielt das gewünschte Protein gereinigt. Nach der Reinigung wurde des GST, je nach Verwendung, am Protein belassen oder enzymatisch abgespalten.

PBS/KMT-Puffer:
150 mM NaCl
5 mM NaH₂PO₄
20 mM Na₂HPO₄
1 mM MgCl₂
3 mM KCl
0,1% Tween 20 (v/v)
pH 7,4, sterilfiltriert

GSH-Elutionspuffer:
50 mM Tris / HCl
10 mM Glutathion (reduzierte Form)
pH 8,0, sterilfiltriert

2.3.2.2. Synthese rekombinanter Proteine

Das Plasmid (2.2.3.), welches das Gen enthält, wurde in *E. coli* eingebracht (2.2.2.). Es wurden entweder Rosetta pLysS oder Rosetta Star Stämme von *E. coli* verwendet. Es wurde für Calumenin der Rosetta Star und für ERj7p der Rosetta pLysS Stamm verwendet. Der Rosetta pLysS hat die Vorteile, dass er Protease defizient ist und ein Plasmid pLysS enthält, das für ein Lysozym-ähnliches Protein codiert. Dieses Protein wird durch Einfrieren und Auftauen der Zellen aktiviert, was zur Folge hat, dass die Zellen selbstständig lysieren.

Mit einem Transformationsansatz wurde eine Übernacht-Kultur in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 250 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Übernacht-Kultur des Transformationsansatzes wurde am Tag darauf benutzt, um ca. 3 l LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika anzupflegen. Alle benutzten Plasmide trugen eine Ampicillinresistenz. Daher musste den *E. coli* Rosetta Stämmen neben Chloramphenicol zusätzlich Ampicillin zugegeben werden, um eine Anreicherung der transformierten Zellen zu erreichen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,9 - 1 wurde mit Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG, 72 mg/l) die Synthese der Fusionsproteine induziert. Die Zugabe von IPTG inaktiviert den lac-Repressor, der auf dem Plasmid codiert ist und die Expression des einklonierten Proteins unterdrückt. Entsprechend den optimalen Induktionsbedingungen für das jeweilige Protein (GST-Calumenin bei 15 – 20°C über Nacht und GST-ERj7p 20°C 5h bis über Nacht), wurde die Kultur weiter inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 rpm und 2°C für 10 min im JA-10 Rotor geerntet. Die Zellen wurden anschließend in 35 ml PBS-KMT Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

2.3.2.3. Zellaufschluss der transformierten *E. coli* Zellen

Die Lyse der Rosetta pLysS Zellen erfolgte durch Einfrieren bei -80°C für mindestens 3 h und anschließendes Wiederauftauen. Durch Zentrifugation bei 50.000 rpm und 2°C für 60 min mit dem Ti70-Rotor wurden die Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen getrennt.

Die Rosetta Star Zellen wurden mittels Ultraschall für 3 x 1 min mit jeweils 1 min Pause bei 50% Amplitude (VCX-Macrotip) im Eisbad lysiert und die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 20.000 rpm und 4°C für 30 min im JA-20 Rotor von unlöslichen Bestandteilen getrennt.

2.3.2.4. Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die GST-Fusionsproteine wurden über GSH-Sepharose Säulen gereinigt. Die Glutathion-S-Transferase, die als „tag“ für diese Affinitätsreinigung verwendet wird, ist ein cytoplasmatisches Enzym aus *Schistosoma japonicum* mit einem Molekulargewicht von 26 kDa, das hochspezifisch an den GSH-Anteil der verwendeten Sepharose bindet.

In einem ersten Schritt wurden 3 ml des Säulenmaterials zunächst 3 x mit jeweils 20 ml PBS-KMT äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation der lysierten Zellen wurde zu dem Säulenmaterial gegeben und mindestens 1 h bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine 20 ml Chromatographie-Säule überführt, diese mit einer Fritte oben verschlossen und mit 20 Bettvolumen PBS-KMT gewaschen. Eluiert wurde mit 8 ml GSH-Elutionspuffer in 1 ml Fraktionen, die im Anschluß bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurden. Von den Fraktionen wurden 5 μl zusammen mit 5 μl 2x Laemmli Probenpuffer und 40 μl 1x Laemmli Probenpuffer bei 95°C für 5 min inkubiert, 10 μl zusammen mit einem BSA Standard auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteinmenge nach 2.4.8. quantifiziert.

2.3.2.5. Verdau von Proteinen mit GST-„tag“ mittels TEV-Protease

Das pGEX-4T-TEV-Vektor-System bietet für das heterolog in *E. coli* als GST-Fusion synthetisierte Calumenin die Möglichkeit, den GST-„tag“ mittels einer TEV („tobacco etch virus“) Protease abzuspalten. Diese Vorgehensweise war nötig, da Calumenin in Proteininteraktionsstudien eingesetzt werden sollte, bei denen Sec63p ebenfalls als GST-Fusionsproteine (J-Domäne und C-Terminus; Labor intern hergestellt) eingesetzt werden sollte.

Die TEV-Protease wurde 1995 von Parks *et al.* kloniert und charakterisiert. Es handelt sich dabei um ein ~ 49 kDa großes Protein aus dem „tobacco etch virus“, welches ein 345 kDa Polypeptid des Virus zu aktiven Proteinen prozessiert. In diversen Arbeiten (Carrington *et al.*, 1988; Dougherty *et al.*, 1988 und 1989) konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Glu, Tyr, Gln und Gly für eine Spaltung nötig sind (Erkennungstelle der Protease: Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly). Die TEV-Protease lag als His₆ Fusion im Labor vor.

Präparativ wurde das GST-Fusionsprotein über Nacht bei 4°C unter Rollen gespalten. Hierfür wurde GST-Calumenin an GSH-Sepharose gekoppelt, allerdings nicht eluiert, sondern in TEV-Reaktionspuffer mit der Protease (1/40 von 250 µg) inkubiert. Das gespaltene Protein wurde im Anschluß in PBS umgepuffert und das gebundene GST eluiert. Abbildung 2.1. zeigt den Verdau von GST-Calumenin durch die TEV-Protease (Spuren 1,2 im Vergleich zu Spuren 3,4).

10-fach Reaktionspuffer für TEV-Protease:
500 mM Tris / HCl
5 mM EDTA
in H₂O bidest.
pH 8,0
sterilfiltriert

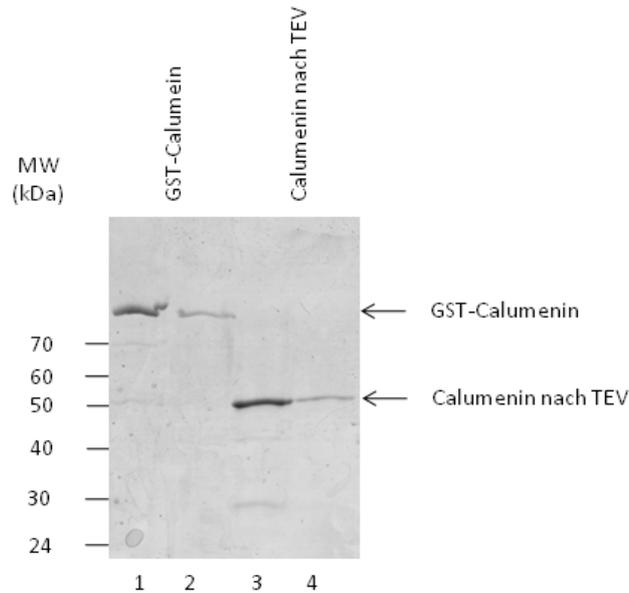


Abb. 2.1.: Spaltung von GST-Calumenin mittels TEV Protease.

Gereinigtes GST-Calumein mit einer TEV-Spaltstelle wurde an GSH-Sepharose gebunden und mit TEV-Reaktionspuffer gewaschen. Der Ansatz wurde über nacht mit der TEV Protease bei 4°C inkubiert und anschließend der Überstand in PBS umgepuffert. Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Spuren 1 und 2 zeigen GST-Calumenin, Spuren 3 und 4 das Fusionsprotein nach dem Verdau. Spur 1 zeigt GST-Calumenin vor dem Verdau und Spur 2 den dazu gehörigen Waschschritt; Spur 3 zeigt den Durchlauf des TEV Verdau und Spur 4 das verbleibende Protein im Waschschritt.

2.3.3. *In vitro* Synthese und radioaktive Markierung von Proteinen / Calumenin in *E. coli* Lysaten: Rapid Translation System RTS 100 *E. coli* High Yield

Zur Herstellung von Proteinen in einem zellfreien System wurde das Rapid Translation System 100 der Firma Roche verwendet. Das System zeichnet sich durch eine hohe Proteinsyntheserate aus (Maurer *et al.*, 2003). Für eine Proteinsynthese im RTS-System wurde zunächst die entsprechende DNA in einen für das System optimierten Vektor (pIVEX2.3MCS) kloniert. Dann wurde eine Synthese im RTS 100-System durchgeführt. Im RTS 100 System findet eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation statt. Dabei werden die Proteine durch Einbau von [³⁵S] Methionin radioaktiv markiert. Die Reaktionen laufen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen ab und wurden wie folgt zusammengestellt:

3 µl *E. coli*-Lysat
2,5 µl Reaktions-Mix
3 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin
0 µl 1 mM Methionin-Lösung
1 µl [³⁵S] Methionin, 15 mCi/ml
1,25 µl Rekonstitutions-Puffer
0,5 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl)
1,25 µl steriles Millipore-Wasser

Die Ansätze wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Aufnahme der Proben in Laemmli-Puffer, Auftrennung über SDS-PAGE und abschließende Autoradiographie bzw. Fluorographie.

Das Protein Calumenin wurde mit c-terminalen His₆-„tag“ unter radioaktiver Markierung im RTS 100 synthetisiert. Die Synthese wurde durch Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie kontrolliert.

2.3.4. Co-translationaler Transport von *in vitro* synthetisiertem Calumenin in Hundepankreasmikrosomen

Die *in vitro* Synthese und radioaktive Markierung von Calumenin wurde im TnT T7 gekoppelten Retikulozytenlysat-System (Roche) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das nukleasebehandelte Lysat besitzt keine endogene mRNA, so dass eine gezielte Synthese einzelner Proteine durch Zugabe der entsprechenden DNA oder mRNA möglich ist. Neben der gekoppelten *in vitro*-Transkription kann in dem TnT T7 System auch eine *in vitro*-Translation durchgeführt werden.

Die Synthese und radioaktive Markierung von Proteinen erfolgten unter Einsatz eines für *in vitro* Versuche geeigneten Plasmids, das für Calumenin codiert (2.2.3.). Zur radioaktiven Markierung wurde [³⁵S] Methionin (1000 Ci/mmol) eingesetzt.

Um einen cotranslationalen Transport von Calumenin in Hundepankreasmikrosomen zu erhalten, wurde vor Synthesebeginn dem *in vitro* Ansatz Hundepankreasmikrosomen in einer Endkonzentration von 2 % (v/v) zugesetzt. Auf diese Weise konnten die Proteine während ihrer Synthese in die Mikrosomen transportiert werden.

2. Material und Methoden

Der gesamte Ansatz wurde zusammenpipettiert und bei 30°C für 30 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz in drei Teile aufgeteilt und je 10 µl Sucrose, 10 µl Sucrose plus Proteinase K oder Sucrose plus Proteinase K plus Triton X-100 zugeführt. Die drei Ansätze wurden dann 1 h auf Eis inkubiert und die Reaktion mit 4 µl PMSF gestoppt. Nach weiteren 5 min auf Eis, wurde 6 µl 5x Laemmli Probenpuffer zugegeben und die Ansätze für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Ansätze wurden dann über ein 12%-iges SDS-Gel aufgetrennt. Zum Nachweis von ³²S markierten Proteinen in dem SDS-Gel, wurde dieses nach der Elektrophorese für 15 min in Entfärber-Lösung und für 30 min in Neutralisationslösung inkubiert. Danach wurde es auf Filterpapier unter Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gele wurden auf Phosphor-Screen-Platten exponiert und mit Hilfe des PhosphoImagers analysiert. Eine Quantifizierung der Bandenschwärzung erfolgte mit Hilfe der Software Image-Quant (Version 3.3).

50 % TnT T7 Lysat
2 % Aminosäuregemisch ohne Methionin (1 mM jeder Aminosäure)
4 % TnT Reaktionspuffer
8 % [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol)
2 % RNA-Polymerase (T7)
2 % RNasin-Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)
0,2 µg Plasmid-DNA/µl Ansatz
auf 100 % auffüllen sterilem Millipore-Wasser

Entfärber-Lösung:
50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Neutralisationslösung:
50 % (v/v) Methanol
1 % (v/v) Glycerin

2.4. Analytische Methoden

2.4.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

2.4.1.1. Biorad-Gele

Um Proteine aufzutrennen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Laemmli (1970) benutzt. Hier werden Proteine ihrer Masse entsprechend in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Natriumdodecylsulfate (SDS) ist ein anionisches Detergenz, welches die hydrophoben Reste von Proteinen mittels seiner lipophilen Kohlenwasserstoffkette bindet und die Proteine negativ lädt. So wird die wahre Ladung der Proteine maskiert und die SDS beladenen Proteine werden aufgrund ihrer Masse getrennt.

Die benutzten SDS-Gele bestanden aus einem kleinen Sammelgel und einem größeren Trenngel. Das gering prozentige Sammelgel diente der Fokussierung der Proteine. Im Trenngel wurden die Proteine dann nach ihrem molekularen Gewicht getrennt. Als Größenindikator wurde ein 10 kDa Standard für Coomassie Färbungen („bench marker“) bzw. ein vorgefärbter Marker für Western Blots („page ruler“) benutzt.

Um die getrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden sie entweder mit Coomassie brilliant Blau gefärbt (2.4.2.) oder auf eine PVDF-Membran geblottet (2.4.3.) und das gesuchte Proteine mittels einer Antikörper-Detektion identifiziert (2.4.5.).

Die folgende Tabelle zeigt das Pipettierschema für vertikale Gele der Größe 11 cm x 14 cm x 1 mm mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen. Die Acrylamidkonzentration bestimmt die Porengröße des Gels und variiert aufgrund der Proteingröße. Als Standard wurden 12,5% Gele genutzt. Die Auftrennung der Proteine innerhalb der Gele erfolgte bei 250 mV für 1 h bei RT.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.5. Übersicht Biorad-Gele. Rezepte für je 2 Gele.

	Trenngel		Sammelgel
	12,5	16	5
AA conc. (%)			
Lösungen			
30% (w/v) AA (ml)	4,10	5,34	1,007
H ₂ O bidest (ml)	3,20	2,00	2,693
1,5 M Tris / HCl, pH 8,8 (ml)	2,5		-
0,5 M Tris / HCl, pH 6,8 (ml)	-		1,250
10% (w/v) SDS (μl)	100		50
TEMED (μl)	5		10
20% (w/v) AMPS (μl)	50		25
Gesamtvolumen	15		4,8

Laemmli Probenpuffer:

Tabelle 2.6. Rezept Laemmli Probenpuffer.

Stammlösung	1x	2x	5x	
2 M Tris / HCl ph 6,8	3	6	15	ml
10% SDS	20	40	10 g	ml / g
87% Glycerol	11,5	23	57,5	ml
ad H ₂ O	95	90	75	
Gebrauchslösung	1x	2x	5x	
Stammlösung	9,5	9	7,5	ml
β-Mercaptoethanol	0,5	1	2,5	ml
Bromphenolblau	2	2	2	Kristalle

Laempuffer:
384 mM Glycine
50 mM Tris
0,1% (w/v) SDS

2.4.1.2. High-Tris-Gele

Eine Alternative zu den Biorad Gelen stellen sogenannte High-Tris Gele (HT-Gele) dar. Diese unterscheiden sich von den Gelen aus 2.4.1.1. in ihrer Größe, Dicke und dem Gehalt an Tris.

Die folgende Tabelle zeigt das Pipettierschema für vertikale Gele der Größe 11 cm x 14 cm x 1 mm mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen. Als Standard wurden 12,5% Gele genutzt. Die Auftrennung der Proteine innerhalb der Gele erfolgte bei 45 mA für 2,5 h.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.7. Übersicht High-Tris-Gele. Rezepte für je 2 Gele.

AA conc. (%)	Trenngel			Sammelgel
	12,5	15	17,5	5
Solutions				
40% (w/v) AA (ml)	9,38	11,26	13,12	1,8
2% (w/v) BAA (ml)	2,5	3	3,52	0,24
H ₂ O bidest (ml)	5,72	3,34	2,78	10,02
1,875 M Tris / HCl, pH 8,8 (ml)	12			-
1 M Tris / HCl, pH 6,8 (ml)	-			1,8
10% (w/v) SDS (µl)	300			144
TEMED (µl)	10			21
10% (w/v) AMPS (µl)	90			135
Gesamtvolumen	30			14,4

2.4.2. Protein-Färbung mit Coomassie brilliant Blau

Durch SDS-Gele aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe der Coomassie brilliant Blau Färbung sichtbar gemacht. Das Gel wurde zunächst für ca. 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Zum Entfärben wurde das Gel nacheinander für 15 min in Entfärber 1 und für 30 min oder länger in Entfärber 2 geschwenkt. Anschließend konnte das Gel getrocknet werden, indem man es in einer 10 %igen Glycerinlösung etwa 30 min lang äquilibriert, in Cellophanfolie einpackte und trocknen ließ.

Färbelösung:

0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue R 250

0,005 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue G 250

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber 1:

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

Entfärber 2:

10 % (v/v) Methanol

5 % (v/v) Essigsäure

2.4.3. Elektrotansfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blotting)

Die mittels SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden für eine immunologische Detektion auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde die „Nass-Blot“-Methode in einer Trans-Blot®Electrophoretic Transfer Cell der Firma BioRad angewendet.

Die Polyacrylamidgele wurden nach erfolgter Elektrophorese kurz in kaltem Transferpuffer äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst kurz in Methanol aktiviert, dann mit H₂O_{bidest.} abgespült, und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Schließlich wurde das „Gelsandwich“ mit zwei dünnen, auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Whatman-Papieren, so zusammengesetzt, dass sich die PVDF-Membran zwischen Gel und Anode befand und die Proteine somit auf die Membran transferiert wurden. Der Transfer erfolgte dabei für Biorad-Gele für ca. 1 h bei 200 mA auf Eis und für die HT-Gele für ca. 3h oder über Nacht bei 400 mA bei 15°C.

Transferpuffer:
7,2 g Glycin
1,5 g TRIS
ad H₂O_{bidest.} 1 Liter

2.4.4. Ablösung von Antikörpern von der PVDF-Membran

Um Antikörper von der PVDF-Membran zu lösen, gibt es zwei Möglichkeiten: das „Strippen“ der Membran mit Glycin pH 2,8 oder das „Strippen“ mit β-Mercaptoethanol. Bei beiden Verfahren werden die gebundenen Antikörper von den Proteinen abgewaschen. Somit besteht die Möglichkeit auch andere Antikörper auf derselben Membran zu nutzen.

Glycin Strippen:
100 mM Glycin pH 2,8
30 min bei RT
Mehrmals mit TBS waschen
Blockieren und Detektieren

β-Mercaptoethanol Strippen:
100 mM β-Mercaptoethanol + 2% SDS in TBS
Unter Abzug 30 min bei 50°C
mehrmals mit TBS waschen
Blockieren und Detektieren

2.4.5. Immunologische Detektion von Proteinen

Zur Detektion der auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurde die Membran zunächst für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit einer Antikörperlösung des gewünschten Primärantikörpers für mindestens 60 min inkubiert.

Danach wurde die Membran zweimal für 5 min in TBST-Puffer und zweimal für 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde dann ebenfalls für mindestens 60 min mit einer zweiten Antikörperlösung inkubiert, bei welcher der Sekundärantikörper entweder an Meerrettich-Peroxidase oder einen Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Im Anschluss wurden wiederholt die beschriebenen Waschschriffe durchgeführt, bevor die Proteine mittels Chemilumineszenz nachgewiesen wurden. Zur Detektion wurde im Falle der Meerrettich-Peroxidase das Enhanced Chemiluminescence Detection (ECL)-System in Kombination mit Röntgenfilmen verwendet und für die Cy-Fluoreszenzfarbstoffe das Typhoon-System.

Bei dem ECL-System wurde die PVDF-Membran für 2 min in einer Mischung aus gleichen Volumina ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 inkubiert und dann zwischen zwei Folien gelegt. Anschließend konnten Röntgenfilme unterschiedlich lange exponiert werden, um die entstandene Chemilumineszenz zu visualisieren.

Im Falle der Detektion *via* Cy-Fluoreszenzfarbstoffe wurde die Membran getrocknet und dann im Typhoon-System eingescannt.

TBS-Puffer:
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
0,9% (w/v) NaCl

TBST-Puffer:
0,05% (w/v) Triton X-100 in TBS-Puffer

Blocklösung:
5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer

Antikörperlösung:
Blocklösung+ Antiserum (Verdünnung 1:500 – 1:1000)

2.4.6. Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellkultur

Die Anfärbung von Proteinen *in situ*, dient dem besseren Verständnis ihrer Lokalisierung in der eukaryontischen Zelle. Dafür wurden Zellen (PC3 und HeLa) auf Deckgläsern herangezogen (2.5.12.). Diese Deckgläser wurden nach einem Waschschriff mit PBS für 8 min bei RT mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit PBS für je 10 min, wurden die Zellen mittels 0,2% Triton X-100 plus 1% BSA in PBS für 5 min auf Eis permeabilisiert. Die so vorbereiteten Deckgläser wurden in eine feuchte Kammer (Petrischale mit feuchter Papier- und Parafilm-Unterlage) übertragen und dreimal mit PBS plus 1% BSA gewaschen, was der Blockierung der unerwünschten Bindungsstellen dient.

Daraufhin wurde der erste Antikörper (anti-Kaninchen-Antikörper, Verdünnung 1:500 bzw. 1:750, siehe 2.2.1.) in PBS plus 1% BSA für 1 h bei RT auf die Deckgläser gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS plus 1% BSA, wurde der sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Alexa 488 Fluor-IgG Antikörper, Sigma, Verdünnung 1:1500) aufgetragen. Nach einer weiteren Inkubation für 1 h bei RT im Dunkeln wurde einmalig mit PBS plus 1% BSA gewaschen und DAPI (100 ng/ml in PBS plus 1% BSA) zum Gegenfärben des Kerns auf die Zellen gegeben. Nach zwei weiteren Waschschriften und einem kurzen Waschschrift mit PBS, wurden die Deckgläser getrocknet und mit 1 Tropfen Mowiol-Propylgallat umgekehrt auf einen Objektträger gesetzt. Die so aufbereiteten Zellen, konnten dann unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon) hinsichtlich des Lokalisierungssignals des Proteins untersucht werden.

2.4.7. Aceton-Methanol Fällung

Um Proteine mittels Aceton/Methanol zu fällen, müssen zu maximal 350 µl Probe zwei Probenvolumen an eiskaltem Aceton p.a. zugegeben werden. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 rpm bei 2°C für 5 min (Kühlzentrifuge) wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit 300 µl Methanol (eiskalt) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000 rpm bei 2°C für 10 min wurde das Sediment in der Speed-Vac getrocknet und in Laemmli Probenpuffer aufgenommen.

2.4.8. Quantifizierung von Proteinen

2.4.8.1. Bestimmung der OD₂₈₀

Die einfachste Methode der Proteinbestimmung ist die Messung der optischen Dichte bei 280 nm. Diese beruht auf einer Lichtabsorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin in diesem Bereich. Bei einer bekannten Proteinsequenz ergibt sich aus der Anzahl der aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsfaktor AF. Wird dieser mit der OD₂₈₀ multipliziert, erhält man die Proteinkonzentration in mg/ml. Der AF wurde mit Hilfe des DNAS_{tar}-Programms von Lasergene bestimmt.

2.4.8.2. Quantifizierung *via* Coomassie-Färbung und BSA als Proteinstandard

Das zu quantifizierende Protein wurde mit verschiedenen Mengen einer BSA-Stammlösung bekannter Konzentration auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Coomassie Färbung des Gels wurde die Blaufärbung des zu quantifizierenden Proteins mit der Färbung der unterschiedlichen Konzentrationen des Eichproteins verglichen und so die Konzentration des zu quantifizierenden Proteins abgeschätzt.

2.4.9. „pull-down“ Versuche

Der sogenannte „pulldown assay“ dient der *in vitro* Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Hierfür wurden gereinigte GST-Fusionsproteine benutzt, die an GSH-Sepharose immobilisiert wurden. Die so immobilisierten Proteine wurden mit ihren potentiellen Interaktionspartnern inkubiert, die entweder auch rekombinant in *E. coli* synthetisiert und gereinigt wurden oder in einem Protein-Gemisch in Form von Extrakten rauer Mikrosomen vorlagen.

Zur Immobilisierung der GST-Fusionsproteine wurden pro Ansatz 60 µl GSH-Sepharose in eine 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die GSH-Sepharose wurde dreimal mit Chromatographiepuffer 200 oder 400 bzw. TBS in Anwesenheit von CaCl₂ oder EGTA gewaschen. Danach wurden 30 bis 120 µg des jeweiligen GST-Fusionsproteins in Chromatographiepuffer 200 oder 400 bzw. TBS in Anwesenheit von CaCl₂ oder EGTA zu der GSH-Sepharose gegeben.

Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 1 h unter ständiger Durchmischung. Der Überstand wurde durch kurzes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge von der Sepharose getrennt und dann abgenommen. Diese wurde nachfolgend dreimal mit je 1 ml des jeweiligen Puffer gewaschen. Nach Zugabe der Proteine, die auf eine mögliche Interaktion mit dem GST-Fusionsprotein getestet werden sollten, wurde das Volumen mit Puffer auf 200 µl eingestellt. Die Ansätze wurden wieder für 1 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert und anschließend dreimal mit je 1 ml Puffer gewaschen, nachdem die Überstände abgenommen wurden. Die Elution erfolgte dann durch Zugabe von 30 µl 1x Laemmli Probenpuffer und Inkubation bei 95°C für 5 min.

Die Überständen wurden entweder mit 40 µl 5x Laemmli Probenpuffer versetzt und wie die Elutionen behandelt, oder der gesamte Überstand wurde Aceton-Methanol gefällt (vgl. 2.4.7.). Elutionen und die zugehörigen Durchflüsse wurden schließlich mittels SDS-PAGE oder Immundekoration analysiert.

2.4.10. Bestimmung der Affinitäten der BiP-ERj7-J-Domäne Interaktion *via* Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Mit dem BIACORE-System lassen sich Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit darstellen, ohne dass es notwendig ist, bestimmte Markierungen bei den Interaktionspartnern einzuführen. Einer der Interaktionspartner (Ligand) wird auf der Oberfläche eines Sensorchips gebunden, während der andere (Analyt) in Lösung über die Oberfläche fließt. Dabei werden Massenänderungen auf der Oberfläche des Sensorchips detektiert, die durch Assoziation bzw. Dissoziation zwischen Ligand und Analyt verursacht werden.

Bei dem physikalischen Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) wird der refraktive Index nahe der Oberfläche des Sensorchips gemessen. Dieser besteht aus einem dünnen Glasplättchen, das mit einem Goldfilm überzogen ist. Das Gold wird für das SPR-Detektionsprinzip benötigt. Sobald Moleküle durch Interaktionen an der Sensoroberfläche gebunden werden, kommt es zu einer Änderung des refraktiven Index. Dabei kann ein SPR-„Response“ beobachtet werden, die proportional zur gebundenen Masse ist. Der „Response“ pro Masseneinheit (gemessen in „resonance units“, RU) ist für die meisten Proteine gleich. Um die SPR zu beobachten, wird polarisiertes Licht auf der Glasseite des Sensorchips reflektiert. Das SPR-Phänomen beruht in der durch polarisiertes Licht angeregte Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche von Goldfilm zu Analyt. Dies geschieht durch Einstrahlung polarisierten Lichtes mittels eines Prismas in Totalreflexion auf der dem Analyten abgewandten Seite. Ohne gebundenen Analyt weist das Intensitätswinkelspektrum des totalreflektierten Lichtes bei einem bestimmten Winkel ein Minimum auf. Der refraktive Index des Analyten beeinflusst dabei empfindlich die Anregungsbedingungen und damit den Winkel des Minimums. Bei einer Änderung des refraktiven Index durch die Interaktion von Analyt und Ligand kommt es so zu einer Änderung des Winkels, die in einem Sensorgramm aufgezeichnet wird.

Die Analyt- bzw. Ligand-Lösungen werden über ein Flusssystem zu der Sensoroberfläche geleitet. Der Flusskanal bildet an der Sensoroberfläche zwei hintereinander geschaltete Flusszellen (Fc1 und Fc2), in denen verschiedene Liganden an die Chipoberfläche gebunden werden können. Die Flusszelle Fc2 wird in der Regel als Referenzzelle verwendet. In dieser Zelle wird die Referenzsubstanz gebunden, in der Zelle Fc1 der zu untersuchende Ligand. Für die mathematische Auswertung der Sensorgramme wird die Differenz der beiden Flusszellen verwendet ($Fc1 - Fc2$). Die Messungen erfolgten in einem BiaCoreX-Gerät mit Hilfe der BiaCoreX Control Software 2.1.

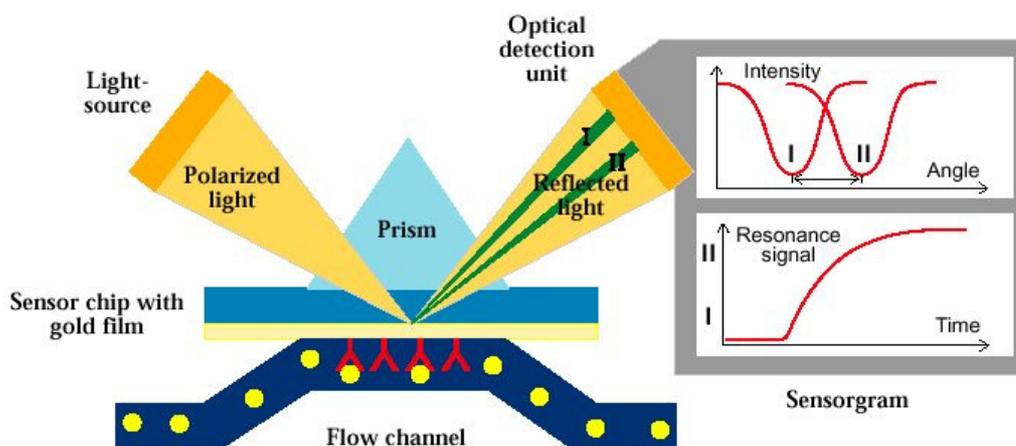


Abb.2.2.: Das Detektionsprinzip des BIACORE-Systems

(aus BIAjournal, No.1-1999) Polarisiertes Licht wird an der Goldoberfläche des Sensorchips totalreflektiert. Oberflächenplasmonresonanz in der Goldoberfläche des Chips führt zur Extinktion des reflektierten Lichts bei einem spezifischen Winkel. Dieser Winkel ist abhängig vom Brechungsindex der Lösung in unmittelbarer Nähe der Goldoberfläche, der sich wiederum mit Bindung von Molekülen aus der Lösung an die auf dem Chip immobilisierten Proteine ändert. Die Änderungen des Brechungsindex werden über die resultierenden Winkeländerungen gemessen und in einem sogenannten Sensorgramm aufgezeichnet.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten CM5-Sensorchips war auf den Goldfilm eine Dextranschicht aufgebracht, über die sich die Liganden kovalent an den Sensorchip koppeln liessen. Als Kopplungsstrategie wurde das „GST capturing“ verwendet, bei dem GST-Fusionsproteine (Ligand) über einen zuvor kovalent an die Chipoberfläche gekoppelten GST-Antikörper gebunden werden. Die Kopplung des GST-Antikörpers an die CM5-Chips wurde nach Anweisung des Herstellers mit Hilfe des GST-Kopplungs-Kits durchgeführt:

Flussrate 5 µl/min, Flusszelle 1 und 2
35 µl NHS/EDC (Aktivierung der COOH-Gruppen der Dextranmatrix)
35 µl GST-Antikörper in Kopplungspuffer
35 µl Ethanolamin (Inaktivierung ungekoppelter aktivierter COOH-Gruppen)

Über den gekoppelten Antikörper wurden zwischen 300 und 500 RU GST-Fusionsprotein vorgebunden (Flussrate: 5 µl/min, PBS-KMT-Puffer, Fc 1). In der Referenzzelle (Fc 2) wurde die gleiche Menge an GST immobilisiert.

Die eigentlichen Messungen erfolgten dann bei einer Flussrate von 15 µl/min mit PBS-KMT als Laufpuffer. Dabei wurde mit wenigstens fünf verschiedenen Konzentrationen des Analyten gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mit der Biaevaluation Software 3.1 ausgewertet und somit die Affinitäten der Protein/Protein-Interaktionen bestimmt.

2.4.11. Bestimmung der Stimulation der ATPase Aktivität von BiP durch die ERj7 J-Domäne

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität von HSP70-Proteinen wurden mehrere Versuche mit radioaktiv markiertem ATP (γ -[³²P]-ATP) durchgeführt. Die Hydrolyse-Aktivität konnte dabei anhand der freigesetzten Menge an radioaktivem P_i bestimmt werden. Um „steady state“ Bedingungen zu erreichen, enthielt der Reaktionsansatz ATP in großem Überschuss, so dass die Reaktion nicht durch das Substrat limitiert wurde.

Die zu untersuchenden Proteine wurden in einer Konzentration von 2 µM in einem 20 µl Reaktionsansatz bei 37°C auf einem Thermoblock inkubiert. Der Reaktionsansatz enthielt 40 mM HEPES/KOH (pH 7,4), 25 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 500 µM ATP sowie 0,1 µCi γ -[³²P]-ATP. Die ATP-Lösung wurde dabei als letztes zugegeben, wodurch die Reaktion gestartet wurde (Zugabe von 1 µl einer Lösung aus 10 mM ATP und 10 µCi γ -[³²P]-ATP).

Nach 2, 5, 10, 30, 45 und 60 min wurde jeweils 3 µl Probe entnommen und zu 3 µl einer vorgelegten 60 mM EDTA-Lösung pipettiert, um die Reaktion zu stoppen. Nach Ende der Probennahmen wurden jeweils 4 µl der Proben auf halbierte Dünnschichtchromatographie-Platten aus Polyethylenimin (PEI)-Cellulose 1,5 cm vom unteren Rand entfernt aufgetropft. Der Abstand zwischen den einzelnen Auftragspunkten betrug ebenfalls 1,5 cm. Die Platten wurden anschließend in 1 M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid inkubiert, bis die Lauffront ~ 1 cm vom oberen Rand entfernt war. Die Laufstrecke betrug dabei etwa 7,5 cm. Dann wurden die Platten getrocknet und in Frischhaltefolie eingepackt. Schließlich wurde für mindestens 3 h eine Phosphor-Screen-Platte aufgelegt.

Nach dem Scannen der Phosphor-Screen-Platte mit einem PhosphoImager (Molecular Dynamics) wurden die Banden des verbliebenen radioaktiv markierten ATP sowie des freigesetzten P_i mit der ImageQuant-Software (Version 3.3) quantifiziert. Mit den erhaltenen Werten konnte dann die Menge an hydrolysiertem ATP (µM) wie folgt berechnet werden:

$$\text{hydrolysiertes ATP (}\mu\text{M)} = (\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-P}_i / (\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP} + \gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-P}_i)) * 500 \mu\text{M}$$

2.4.12. Bindung von Proteinen an immobilisierte Oligopeptide

2.4.12.1. Interaktion der [¹⁴C] markierten Protein in Abhängigkeit von Ca²⁺ oder EGTA mit immobilisierten Oligopeptiden

Zur Detektion der Interaktion von Proteinen mit auf Zellulosemembran immobilisierten Oligopeptiden wurden die im Protein enthaltenen Lysine vorher mit [¹⁴C]-Formaldehyd radioaktiv markiert. Hierbei werden die Lysine mittels Natriumcyanoborhydrid (Jentoft und Dearborn, 1979) methyliert. Wichtig ist hierbei das der Trägerpuffer der Proteine keine freien Aminogruppen enthält (Hepes, Chaps, ua.).

Hierfür wurden 20 µg des zu markierenden Proteins in 180 µl 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) verdünnt. Anschließend wurde dem Ansatz 10 µl einer frischen 1%-igen Natriumcyanoborhydrid (10 mg/ml) wie 0,6 µl einer [¹⁴C]-markierter Formaldehydlösung (Amersham, 18 µCi/µl, 54,5 Ci/mol) hinzugefügt und das Gemisch für 3 h bei 30°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Zum Entfernen freier Radioaktivität wurden NAP5 Säulen (500 µl Probenvolumen) und Natriumphosphatpuffer verwendet.

Durch Szintillationsmessung konnte die Gesamtmenge an Radioaktivität der einzelnen Eluate bestimmt werden. Zur Messung wurden 2 µl der markierten Proteine mit 3 ml Szintillationslösung vermischt und im „Liquid Scintillation Analyzer“ quantifiziert (Abb. 2.3.A). Zur Kontrolle der Proteingröße und der Markierungseffizienz wurden 10 µl [¹⁴C]-markiertes Protein zusammen mit einem BSA Standard mittels SDS-Gel aufgetrennt und *via* Coomassie Färbung oder PhosphoImaging analysiert (Abb. 2.3.B, C). Die markierten Proteine wurden bis zum weiteren Gebrauch in 50 µl Fraktionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

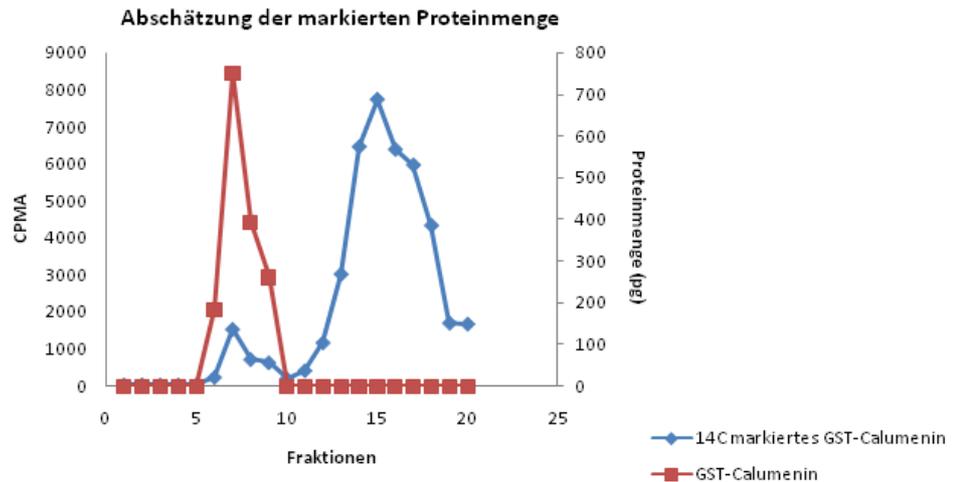
Natriumphosphatpuffer pH 7,0:
51,35 g Na₂HPO₄
29,18 g NaH₂PO₄
Ad 500 ml H₂O bidest.

Um die Interaktion von Proteinen mit auf Zellulosemembran immobilisierten Oligopeptiden zu detektieren, wurden die Zellulosemembranen mit den immobilisierten Oligopeptiden zuerst 1 min in Methanol p.a. aktiviert und dann mit H₂O dest. zweimal für 1 min gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Membranen für 3 h in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA äquilibriert. Die Membranen wurden dann 1 h mit 5% Milchpulver in TBS blockiert. Nach weiteren Waschschriften mit Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA (dreimal, 10 min), wurden die Membranen mit 10 ml Bindungspuffer mit 1 mM CaCl₂ oder 4 mM EGTA sowie 30.000 cpm des [¹⁴C] markierten Proteins über Nacht bei 4°C inkubiert.

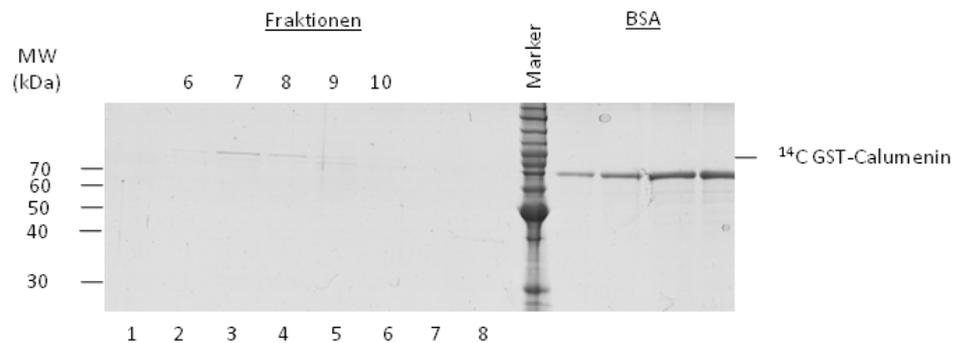
Die inkubierten Membranen wurden am nächsten Tag dreimal für 10 min in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und *via* PhosphoImager Platte und Typhoon analysiert.

Bindungspuffer:
50 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
0,1 % Triton X-100
1 mM CaCl₂ oder 4 mM EGTA
pH 7,2 bei 4°C eingestellt

A



B



C

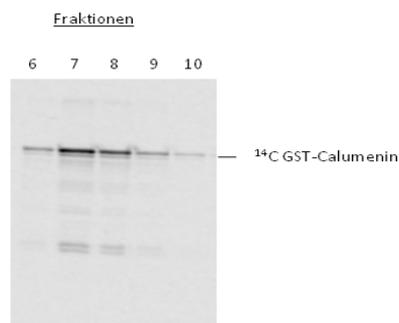


Abb. 2.3.: [^{14}C]-Markierung von Proteinen.

A) Bestimmung der Gesamtmenge an radioaktiv markiertem Protein. Die blaue Kurve zeigt das Ergebnis der Szintillationsmessung, die rote Kurve die bestimmte Proteinmenge pro Fraktion aus Teil B. Fraktionen 7 und 8 zeigen die höchste Rate der radioaktiven Markierung.

B) Radioaktiv markierte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Fraktionen 7 und 8 zeigen die größte Menge an [^{14}C] markiertem GST-Calumenin.

C) Radioaktiv markierte Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und PhosphoImaging analysiert. Spuren 7 und 8 zeigen die größte Menge an [^{14}C] markiertem GST-Calumenin.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. PCR

Die "polymerase chain reaction" (PCR) stellt eine schnelle Multiplikation von DNA Sequenzen *in vitro* dar. Start- und Endpunkt der Reaktion werden durch spezifische Oligonukleotid-Primer gesetzt, welche komplementär zu der DNA Sequenz sind. Durch das Einbringen von Restriktionsstellen für bestimmte Enzyme innerhalb des „primers“, kann die amplifizierte DNA Sequenz durch Klonierung in Expressionsplasmide eingefügt werden. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch das hitzestabile Enzym aus *Pyrococcus woesei*, die Pwo-Polymerase. Die Polymerase besitzt eine 3`-5`-Exonuclease Funktion ("proof reading") und wird durch eine sehr niedrige Fehlerrate ($3,2 \times 10^{-6}$) im Vergleich zur Taq-polymerase ($2,6 \times 10^{-6}$) charakterisiert.

In einem Thermocycler wird ein dreistufiger Zyklus mehrfach wiederholt:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 30s.
2. Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die DNA für 30s. Hier ist die Temperatur Primer abhängig und wird wie folgt berechnet (Suggs et al., 1981):

$$\text{Schmelztemperatur } T_m = \{(\text{Summe aller A} + \text{T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Summe aller G} + \text{C}) \times 4^\circ\text{C}\}$$

3. Synthese des komplementären DNA Stranges durch die Polymerase bei 72°C ("extension"). Die Zeit in diesem Schritt ist abhängig von der Länge der DNA Sequenz.

Die folgende Tabelle zeigt das Pipettierschema der PCR:

Tabelle 2.8. Pipettierschema der PCR.

10x Pwo-Puffer + 20 mM MgSO ₄	10 µl
25 mM MgSO ₄	8 µl
10 mM dNTPs	2 µl
"up stream" Primer 50µM	1 µl
"down stream" Primer 50µM	1 µl
Plasmid DNA	0,5 µl
Pwo Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O bidest.	ad 100µl

Nach dem PCR Prozess wurde ein 4 µl Aliquot der Reaktion mittels eines Agarosegels (2.5.4.) analysiert, um die Länge und Reinheit des amplifizierten Fragmentes zu testen.

Aufgrund von Unterschieden in der DNA Sequenz benötigte man neben verschiedenen Anlagerungstemperaturen auch unterschiedliche MgSO₄ Konzentrationen, um das gewünschte PCR Produkt zu erhalten.

Anschließend wurde die amplifizierte DNA mittels eines „QUIAquick PCR Purification Kit (250)“ (QUIAgen) gereinigt. Dies diente dem Entfernen von Nukleotiden, Salzen, der Polymerase und anderer Verunreinigungen.

2.5.2. DNA Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen und „calf intestine alkaline phosphatase“ (CIAP)

Der präparative Verdau von PCR Fragmenten erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Spaltung des Vektors und der analytische Verdau der präparierten DNA erfolgte für 1 h bei 37°C. Diese Parameter wurden genutzt, solange die Hersteller keine anderen Angaben zur Inkubationszeit und Temperatur machten.

Für einen präparativen Verdau wurden 2 – 4 µg DNA in einem Volumen von 50 – 60 µl mit 10 – 20 Enzymeinheiten inkubiert und für den analytischen Verdau nur 1 µg DNA in einem Volumen von 10 µl mit 2 Enzymeinheiten. Der Erfolg des Verdaus wurde mittels Agarosegel geprüft (2.5.3.).

Um eine Religation des Vektor-DNA-Fragmentes zu verhindern, wurde „calf intestine alkaline phosphatase“ (CIAP) benutzt, um die 5'-terminalen Phosphatgruppen zu entfernen. Pro Verdau wurde 0,5 µl des Enzyms (Stammlösung 1 U/µl) zugefügt und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA Fragmente nach ihrer Größe zu trennen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. DNA Probenpuffer wurde dafür gleich einem Fünftel des Probenvolumens zur Probe gegeben und der Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Das Gel wurde durch Auflösen von Agarose in TAE Puffer mittels einer Mikrowelle hergestellt. Vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben, um die DNA Fragmente zu färben. Die Separierung der Fragmente erfolgte bei 200 mA für 30 – 60 min. Zur Analyse des Gels, wurde es unter UV Licht fotografiert. Ein 1kB-DNA-Marker wurde als Standard verwendet, um die Größe der Fragmente zu bestimmen.

DNA Probenpuffer:
0,25 % (v/v) Bromphenol-Blau
0,25 % (v/v) Xylencyanol
40 % (v/v) Saccharose

TAE Puffer:
40 mM Tris-Acetate
1 mM EDTA

2.5.4. Elution von DNA aus dem Agarosegel

Die gewünschten DNA Banden wurden unter UV Licht mittels eines sterilen Skalpell aus geschnitten. Dabei wurde die Exposition zu UV Licht kurz gehalten, da eine lange Exposition zu einer geschädigten DNA und unerwünschten Mutationen führen kann. Die ausgeschnittene DNA Bande wurde in ein 2 ml Testgefäß mit einem 0,22 µm sterilen Filterelement überführt und für 15 min bei 14000 rpm RT zentrifugiert. Dieses Vorgehen trennt die Agarose von der DNA enthaltenden Flüssigkeit. Zu der Flüssigkeit wurden 3 M Natriumacetat pH 5,2 (1/10 des Volumens) und 96 % Ethanol (2,5-fache des Volumens) zugegeben. Die DNA wurde gefällt indem die Probe bei -80°C für 30 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Diesem Schritt folgte ein Waschschritt mit 200 µl 70 % Ethanol. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4°C, wurde das Sediment in einer Speed-Vac Anlage getrocknet und in 10 µl TE Puffer pH 8,0 aufgenommen.

TE Puffer:
10 mM Tris/HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

2.5.5. Ligation mit T4-DNA-Ligase

Eine T4-DNA-Ligase vermittelt eine kovalente Esterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe eines DNA Doppelstranges und einer freien 3'-OH-Gruppe. Diese Endgruppen eines DNA Doppelstranges erhält man durch den Verdau mit Restriktionendonucleasen (2.5.2.).

Die Ligation einer Vektor- und "insert"-DNA folgte diesem Schema:

Tabelle 2.9. Übersicht Vektorligation.

Reagenz	Volumen (μ l)
Vector (0,2 μ g/ μ l)	1
Insert (0,2 μ g/ μ l)	1
Ligationspuffer (10x)	1
T4-DNA-ligase (1 U/ μ l)	0,5
H ₂ O bidest.	ad 10

Der Ligationsmix wurde mindestens für 1 h bei 25°C inkubiert. Kompetente *E. coli* Zellen wurden daraufhin mit 5 μ l des Ligations-Mixes transformiert (2.5.6. and 2.5.7.).

2.5.6. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan (1983) genutzt. 2 ml LB Medium wurde über Nacht mit einer Kolonie des *E. coli* Stammes von einer LB Platte beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 200 ml LB Medium beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 inkubiert. Die Kultur wurde dann in Zentrifugenbecher überführt, auf Eis 5 min inkubiert und dann für 10 min bei 6000 rpm und 4°C in einer J2-MC-Zentrifuge (JA-10 Rotor) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 80 ml Puffer 1 aufgenommen und wieder auf Eis für 5 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde das Sediment in Puffer 2 aufgenommen. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in flüßigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer 1:	Puffer 2:
100 mM RbCl	175 mM CaCl ₂
50 mM MnCl ₂	10 mM MOPS (freie Säure)
30 mM Kaliumacetat	10 mM RbCl ₂
10 mM CaCl ₂	15 % (v/v) Glycerin
15 % (v/v) Glycerin	pH 6,5 (mit verdünnter KOH)
pH 5,8 (mit Essigsäure)	

2.5.7. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Kompetente *E. coli* Zellen (100 µl Zellsuspension pro Ansatz) wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl des Ligationsmixes oder 0,5 µl (~ 500 ng) Plasmid DNA zugegeben, sanft gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden dann einem Hitzeschock bei 42°C für 20 oder 90 s ausgesetzt, abhängig vom *E. coli* Stamm in einem Wasserbad oder Tischinkubator. Die Zellen wurden dann für 1 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB Medium, wurden Sie rollend bei 37°C für 60 min inkubiert. Sollten die Zellen auf LB Platten ausplattiert werden, wurden sie kurz zentrifugiert in einer Tischzentrifuge und das Sediment in 50 µl LB Medium resuspendiert. Für eine Übernachtskultur wurde der gesamte Ansatz inkl. Antibiotika dem benötigten Volumen zugegeben.

2.5.8. Kultivierung der Bakterien

E. coli Zellen wurden in LB Medium bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Dies geschah in Erlenmeyerkolben, die bis zu einem Viertel ihres Gesamtvolumens befüllt waren. Antibiotika wurden, falls benötigt, in einer Konzentration von 1:1000 zu dem Gesamtvolumen hinzugegeben.

Tabelle 2.10. Übersicht Antibiotika.

Antibiotika	Endkonzentration (µg/ml)	Gelöst in
Ampicillin	100	H ₂ O
Chloramphenicol	34	Ethanol

LB Medium:	Alternativ:
25 g LB Medium	10 g Trypton
ad 1 l H ₂ O <small>bidest.</small> 5 g Hefeextrakt	
Autoklavieren	10 g NaCl
	pH 7,0
	ad 1 l H ₂ O <small>bidest.</small> , autoklavieren

LB-Ampicillin Platten werden benötigt, um die transformierten *E. coli* Zellen auszustreichen. Das folgende Rezept gilt für ~ 50 Platten von 9 cm Durchmesser. Ampicillin wurde nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums auf 50 – 60°C zugefügt.

LB-Ampicillin Platten:
35 g LB Agar
ad 1 l H₂O bidest.
Autoklavieren

Alternativ:
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar
1 ml 1 M NaOH
pH 7,0
ad 1 l H₂O bidest.
Autoklavieren

2.5.9. Minipräparation zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Es wurde im Folgenden eine modifizierte Methode nach Birnboim und Doly (1979) benutzt, bei der Plasmide mit Phenol-Chloroform nach einer alkalischen Lyse extrahiert werden. 2 ml TB Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) wurde mit einer bakteriellen Kolonie beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C rollend inkubiert. 1,5 ml dieser bakteriellen Kultur wurden in ein Testgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 15 s bei 14000 rpm geerntet. Das Sediment wurde durch Vortexen in 100 µl GTE Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl frischer 1%iger SDS / 0,2 M NaOH Lösung wurde der Ansatz mehrfach gemischt. Während des Mischens wird die Zellwand der Bakterien durch das SDS aufgebrochen und die DNA durch NaOH denaturiert. Die Reaktion wurde mit 150 µl 3 M NaOAc pH 5,2 gestoppt und die DNA durch Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1) und Vortexen für 30 s extrahiert. Eine Zentrifugation für 2 min 14000 rpm bei Raumtemperatur ergab drei Phasen: a) Reststücke der Zellmembran sowie chromosomale DNA und RNA, die aufgrund des SDS ausfallen und in der organischen Phase verbleiben; b) eine Proteinhaltige Phase in der Mitte und c) eine wässrige Phase mit der Plasmid-DNA. 400 µl der wässrigen Phase wurden abgezogen und zu 1 ml 96% Ethanol zur Fällung gegeben. Dies geschah durch Inkubation des Ansatzes bei Raumtemperatur für 1 min und eine nachfolgende Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 min. Das DNA Sediment wurde dann mit 750 µl 70% Ethanol und einer weiteren Zentrifugation gewaschen. Nach Trocknung des Pellets Sediment *via* Speed-Vac, wurde das Sediment in 50 µl TE Puffer pH 8,0 / RNase A (Konc. 50 µg/ml) gelöst und bei 56°C für 3 min und bei 37°C für 30 min inkubiert. Für einen Kontrollverdau wurde 1 µl dieser DNA Lösung benutzt.

2. Material und Methoden

TB Media:
50,8 g TB Medium
4 ml Glycerin
ad 1 l H₂O bidest
Autoklavieren

Alternativ:
12 g Casein
24 g Hefeextrakt
2,3 g KH₂PO₄
12,5 g K₂HPO₄
4 ml Glycerin
pH 7,0
ad 1 l H₂O bidest
Autoklavieren

Nach Abkühlen des Mediums, wurden 50 ml Kaliumphosphat Puffer (0,89 M, pH 7,4) hinzugefügt.

Kaliumphosphat Puffer:
23,1 g KH₂PO₄
125,4 g K₂HPO₄
Ad 1 l H₂O bidest

Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25:24:1)
von Roth

GTE Lösung:
50 mM Glucose
25 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM EDTA

TE Puffer:
10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

RNase A (10mg/ml):
10 mg RNase A
986,25 µl H₂O bidest.
10 µl 1M Tris/HCl pH 7,5
3,75 µl 4 M NaCl
15 min 100°C Wasserbad (Inaktivierung der DNase)

Für eine Präparation größerer Mengen an Plasmid wurde der "Jetstar Plasmid Purification Midi Kit / 50" (Genomed) nach Anleitung des Herstellers benutzt. Hier wird eine alkalisch lysierte DNA an eine Anionenaustauschsäule gebunden, gewaschen und eluiert.

2.5.10. Zellkultur

Zellen wurden bei 37°C 5% CO₂ in dem entsprechenden Medium, angezogen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zelllinien mit ihren Parametern.

Tabelle 2.11. Übersicht der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Medium	Trypsinisierung	Verdopplungszeit (h) nach DSZM	Aufteilung (Woche)
HeLa ATCC	DMEM Gibco (stabiles Glu) 31966- 021 + 10% FCS	+	48	2x; 1:5
PC3	DMEM Gibco 41966-02a + 4,5g Glukose + 2mM Glu + 1% Aminosäuremix	+, gehen schlecht ab	50	2 – 3x; 1:10

Zellen wurden bei Aussaat für die nachfolgenden Versuche, bei Ernte bzw. für die Probenentnahme *via* Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür wurden die Zellen 1:2 mit Tryptophan-Blau verdünnt und die vier Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Der Mittelwert der Summe der vier Quadrate wurde dann mit dem Kammerfaktor 10⁴ und dem Wert der Verdünnung 2 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu bestimmen.

Zellen wurden geerntet indem man sie nach Entfernung des alten Mediums mit PBS wusch, kurz in Trypsin EDTA inkubierte und die Zellen daraufhin in 1 ml Medium aufnahm. Die Zellsuspension wurde dann bei RT für 3 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde dann mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Puffer restlos entfernt. Das Zellsediment wurde dann mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Parallel wurde die Zellzahl des Pellets *via* Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für eine Analyse mittels HT-Gel und Western Blot wurden die Zellpellets mit Lysepuffer versetzt und 20 – 30 min bei 37°C inkubiert. Das Volumen des Lysepuffer entsprach dabei 1/20.000 der bestimmten Zellzahl. Nach der Inkubation wurde das gleiche Volumen an 2x Laemmli Probenpuffer hinzugegeben und die Probe bei 56°C für 10 min inkubiert. Die erhaltenen 100.000 Zellen pro 10 µl konnten dann in der jeweiligen Zellzahl (meist 300.000 Zellen) auf die HT-Gele aufgetragen werden.

2.5.11. Transfektion von Zellen mit siRNA

Zellen wurden am Vortag 1:3 aufgeteilt. Nach Ernte der Zellen und einer Zellzahlbestimmung, wurden $1,2 \cdot 10^5$ Zellen pro Kammer einer 12-,„well“ Platte mit vorgelegtem 1,1 ml Medium ausgesät. Parallel wurde der Transfektionsansatz für die siRNA ERj7-hs-#1 und ERj7-hs-#2 vorbereitet:

Tabelle 2.12. Schema des Transfektionsansatzes.

Reagenz	Volumen (µl)	Stammkonzentration (µM)
Optimem (serumfrei)	99	
siRNA	0,6	20
HiPerfect	6	

Schnell vortexen!

10 min bei Raumtemperatur inkubieren!

Nach Inkubation wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die vorgelegten Zellen gegeben und die 12-,„well“ Platte bei 37°C für 96 h inkubiert. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen geerntet und *via* HT-Gel und Western Blot analysiert.

Neben den Kammern für die Zellernte wurden Deckgläschen in den „wells“ ausgelegt, um eine Immunfluoreszenz-Färbung durchzuführen. Die Deckgläser wurden einmal mit PBS gewaschen und die $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Kammer darauf ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zugegeben und die 12-,„well“ Platte bei 37°C für 96 h inkubiert. Nach 72 h wurden die Deckgläser aus der 12-,„well“ Platte entfernt, in eine feuchte Kammer übertragen und für eine Immunfluoreszenz-Messung aufbereitet (2.4.6.).

2.5.12. Stress Induktion in Zellen durch Thapsigargin und Tunicamycin

Zellen wurden am Vortag 1:3 aufgeteilt. Nach Ernte der Zellen und einer Zellzahlbestimmung, wurden 2×10^5 Zellen pro Kammer einer 12-,„well“ Platte mit vorgelegtem 1,1 ml Medium ausgesät. Nach 24 h wurden entweder DMSO (Lösungsmittelkontrolle, Endkonzentration 0,05 %), Thapsigargin (Endkonzentration 1 µM) oder Tunicamycin (Endkonzentration 1 µg/ml) zu den Zellen gegeben. Die Ernte und Analyse *via* HT-Gel und Western Blot bzw. die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte 24 h später.

3. Ergebnisse

3.1. ERj7p, ein HSP40-Homolog im ER?

Bei ERj7p, ehemals „gunanine nucleotide binding protein gama 10“ (Gng10), handelt es sich um das siebte entdeckte DnaJ-Homolog des endoplasmatischen Retikulums in Säuger-Zellen (Zahedi, Völzing, Schmitt, Frien *et al.*, 2009). Es wurde im Rahmen einer Proteomanalyse von Pankreasmikrosomen entdeckt. ERj7p besitzt nach bioinformatischer Analyse von MS-Daten eine zu DnaJ-homologe, N-terminale luminaire J-Domäne, zwei Transmembran-Domänen und einen luminalen C-Terminus. Hier sollte untersucht werden, ob ERj7p im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, in welchen Quantitäten es vorkommt und ob es wie alle anderen HSP40-Homologen im ER mit BiP interagiert und dessen ATPase-Aktivität stimuliert (Tsai und Douglas, 1996; Chevalier *et al.* 2000). Weiterhin sollte geprüft werden, ob ERj7p bei ER-Stress ähnlich ERj4p hochreguliert wird (Shen *et al.*, 2002). Abbildung 3.1. zeigt die Sequenz des bioinformatisch ermittelten Proteins (A) wie auch das in dieser Arbeit benutzte GST-Fusionsprotein von ERj7p (B).

A ERj7p

MAAPLLSPGWGAGAAGRRWWMLLAPLLPALLLRPAGAL VEGLYCGTRDCYEVLGVSRSAGKAEIARAYRQLAR
RYHPDRYRPQPGDEGPGRTTPQSAEEAFLLVATAYETLKDEETRKDYDYMLDHPEEYSHYHYHSRRLAPKVDVRV
VILVSVCAISVFQFFSWWNSYNKAI SYLATVPKYRIQATEIAKQQGLLKKAKEKGNKKSKEIRDEEENIIKNIKSKIDI
KGGYQKPQICDLLLFQIILAPFHLCSYIVWYCRWIYNFNIGKEYGEEERLYIIRKSMKMSKSQFDSLEDHQKETFLKRE
LWIKENYEVYKQEQEELKKKLANDPRWKRYRRWMCNEGPGRLTFVDD

B GST-ERj7 J-Domäne

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEHLRYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMARIYIADKH
 NMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFETLKVDLFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLY
 DALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDYDIPTTENLYEQ
GAHMLVEGLYCGTRDCYEVLGVSRSAGKAEIARAYRQLLARRYHPDRYRPQPGDEGPGRTTPQSAEEAFLLVATAYET
LKDEETRKDYDYMLDHPEEYSHYHYHSRRLAPKVDVRGSPQFPGRLERPHRD.

Abb. 3.1. Sequenz von ERj7p nach Zahedi, Völzing, Schmitt, Frien *et al.* (2009)

A. das vollständige ERj7p.

B. das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne.

Orange = J-Domäne; Grau = GST-„tag“; Kursiv = Peptidsequenz für polyklonale Kaninchen-Antikörper; einfach unterstrichen die Transmembran-Domänen (TM), fett unterstrichen die Signal Sequenz sowie gekräuselt unterstrichen das TEV-Spaltmotiv.

3.1.1. ERj7p lokalisiert bei einer Immunfluoreszenz im ER von PC3-Zellen

ERj7p wurde als 39 kDa Membranprotein des ER mit einer luminalen J-Domäne vorausgesagt, wobei die Insertion in die Membran über eine spaltbare Signalsequenz und zwei Transmembran-Domänen erfolgen sollte (Zahedi, Völzing, Schmitt, Frien *et al.*, 2009). Durch Carbonatextraktion von Proteinen aus Hundepankreasmikrosomen wurde gezeigt, dass ERj7p in der Membran des ER lokalisiert (Zahedi, Völzin, Schmitt, Frien *et al.*, 2009). Es sollte daher zunächst getestet werden, ob ERj7p auch auf zellulärer Ebene im ER nachweisbar ist. Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen bei humanen PC3-Zellen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden humane PC3-Zellen herangezogen (2.5.10.) und nach 24 h Wachstum bei 37°C mittels Formaldehyd fixiert und mit Triton-X permeabilisiert (2.4.6.). Zur Detektion von ERj7p und Sec62p, als Kontrolle / Marker für das endoplasmatische Retikulum, wurden entsprechende Antikörper (α -1026/27 und α -262, vgl. 2.2.1.) sowie ein fluoreszenz-markierter, sekundärer Antikörper (α -Rabbit-Alexa488, Invitrogen) eingesetzt.

Für Sec62p und ERj7p ergab sich eine vergleichbare Anfärbung der PC3-Zellen (Abb. 3.2.A.). Bei beiden Proteinen war der Kern in der Färbung ausgespart und das ER angefärbt. Dass ERj7p in PC3-Zellen vorhanden ist und vom Antikörper erkannt wird, wurde mittels Western Blot nachgewiesen (2.4.3., 2.4.5.). Neben PC3-Zellen zeigten auch Cos- sowie 3T3-Zellen eine Bande in Höhe des Molekulargewichts von ERj7p (Abb. 3.2.B.). Der ERj7p-Antikörper zeigte neben der vom Molekulargewicht her passenden Bande zwei weitere, prominentere Proteinbanden (Abb. 3.2.B., ?). Diese Proteinbanden verschwanden auch nicht bei Verwendung einer anderen Antikörperfraktion bzw. nach Affinitätsreinigung des Antikörpers. Dass die Bande bei ~ 33 kDa ERj7p darstellt, wurde in Zusammenhang mit der Quantifizierung von ERj7p in rauen Mikrosomen (3.1.3.) verifiziert. Die Immunfluoreszenz zeigt somit, dass ERj7p im ER lokalisiert, allerdings sprach der Western Blot für eine zusätzliche unspezifische Färbung der Zellen. Um zu klären, ob das ER-Signal tatsächlich die Lokalisierung des ERj7p widerspiegelt, wurde ERj7p mittels siRNA in PC3-Zellen herunterreguliert bzw. wurden die Zellen Stressoren ausgesetzt und erneut *via* Immunfluoreszenz und Western Blot untersucht (vgl. 3.1.6.1. und 3.1.6.2.).

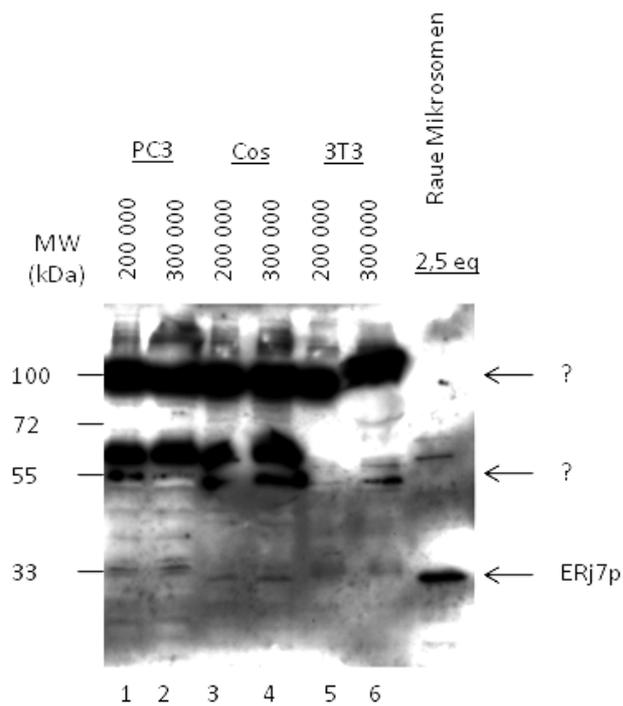
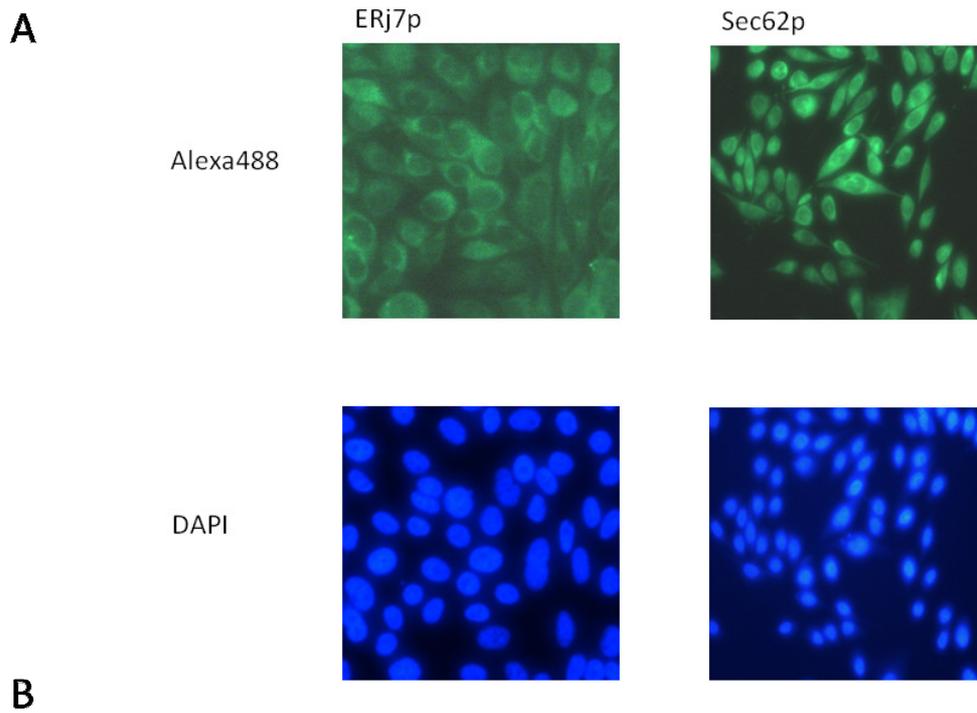


Abb. 3.2.

A. IF von ERj7p und Sec62p in PC3-Zellen. PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 angezogen und mittels Formaldehyd fixiert, Triton-X permeabilisiert und mit α -1026/27 oder α -262 sowie α -Rabbit-Alexa488 für die Proteine bzw. DAPI für den Kern gefärbt.

B. Analyse von 3T3-, Cos-, PC3-Zellen sowie von rauen Mikrosomen *via* SDS-PAGE sowie Western Blot auf Vorhandensein von ERj7p. Spur 1, 3, 5 je 200000 Zellen; Spur 2, 4, 6 je 300000 Zellen. 1. Antikörper: α -1026/27 (1:500) und 2. Antikörper: POD-Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:1000). ? bezeichnet zwei unbekannte Proteinbanden.

3.1.2. ERj7p wird in das ER importiert

Eine weitere Möglichkeit die Lokalisierung von ERj7p zu bestätigen war ein Transportversuch (2.3.4.) in das ER. Dieser wurde von Christian Völzing (2009) für Gng10, welches identisch ist mit ERj7p, in rauen Mikrosomen aus dem Hundepankreas durchgeführt. Der Versuch zeigt die Insertion des Vorläuferproteins für ERj7p in raue Mikrosomen (Abb. 3.3.A. Spuren 4, 5), allerdings keine Protease-geschützte Proteinbande (Abb. 3.3.A. Spur 5). Die Positiv-Kontrolle war Luziferase (Abb. 3.3.B.). Hier wurde das Vorläuferprotein vollständig in raue Mikrosomen transportiert und Protease-geschützt. Die Luziferase wurde ebenso wie Gng10 durch die Signalpeptidase prozessiert. Dass Gng10 / ERj7p allerdings nicht im Importversuch vollständig geschützt wird, weist auf eine Insertion des Proteins in die ER-Membran hin. ERj7p verfügt über zwei Transmembran-Domänen, so dass in diesem Versuch kein Schutz für die nicht Membran-inserierten Teile des Proteins vorliegt.

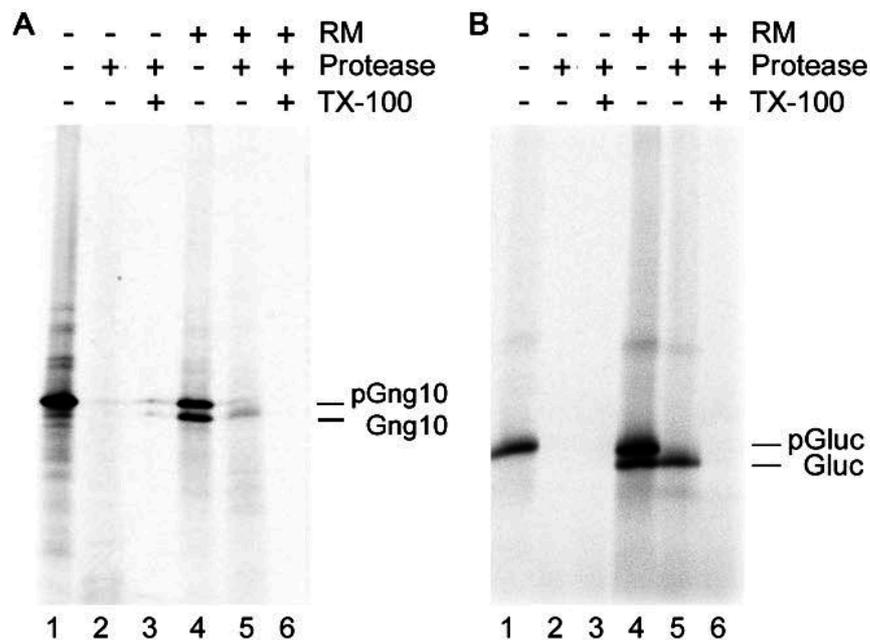


Abb. 3.3. aus Zahedi, Völzing, Schmitt (2009).

A. Import von ERj7p in RMs des Hundepankreas. Der Vorläufer von ERj7p wurde in Retikulozyten Lysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin für 20 min bei 30°C synthetisiert. Die Translationsreaktion wurde mit Puffer oder RMs versetzt und nach Translation gedrittelt. Die Proben wurden dann mit Proteinase K (Protease) und / oder Triton-X- 100 (TX-100) für 60 min bei 0°C inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Proben *via* SDS-PAGE und „Phospho Imaging“ analysiert.

B. Import von pGluc in RMs des Hundepankreas. Der Vorläufer von pGluc wurde in Retikulozyten Lysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin für 20 min bei 30°C synthetisiert. Die Translationsreaktion wurde mit Puffer oder RMs versetzt und nach Translation gedrittelt. Die Proben wurden dann mit Proteinase K (Protease) und / oder Triton-X- 100 (TX-100) für 60 min bei 0°C inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Proben *via* SDS-PAGE und „Phospho Imaging“ analysiert.

3.1.3. ERj7p liegt in hoher Konzentration in der Membran von rauen Mikrosomen vor

Um eine Einschätzung der Konzentration an ERj7p in rauen Mikrosomen treffen zu können, wurden eine definierte Konzentration an GST-ERj7 J-Domäne sowie verschiedene Mengen an rauen Mikrosomen *via* SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die rauen Mikrosomen wurden so eingestellt, dass 1 μl der Suspension bei einer $\text{OD}_{40} = 40$ einem Äquivalent entspricht. Für die Banden von ERj7p aus den beiden rauen Mikrosomenpräparationen sowie für die Banden der GST-ERj7p J-Domäne (Abb. 3.4.A.) wurden mittels ImageQuant die Intensitätsvolumina bestimmt. Nach Auftrag der Intensitätsvolumina von GST-ERj7p J-Domäne gegen die bekannten Konzentrationen wurde aus dem Eichgraph (Abb. 3.4.B.) die Geradengleichung bestimmt ($y = 2 \cdot 10^8 \cdot x + 3 \cdot 10^6$). Nach Umkehr der Geradengleichung ($x = (y - 3 \cdot 10^6) / (2 \cdot 10^8)$) wurde die Menge an ERj7p pro Äquivalent bzw. pro μl in rauen Mikrosomen berechnet. Bei einem Molekulargewicht von 38,5 kDa ergab sich im Folgenden eine Konzentration von 2,3 μM für ERj7p in rauen Mikrosomen. Dies galt für beide Chargen an rauen Mikrosomen. ERj7p liegt daher in rauen Mikrosomen in einer ähnlichen Konzentration vor wie ERj2p (Sec63p) oder ERj5p mit je 2,0 μM (Weitzmann *et al.*, 2007).

A

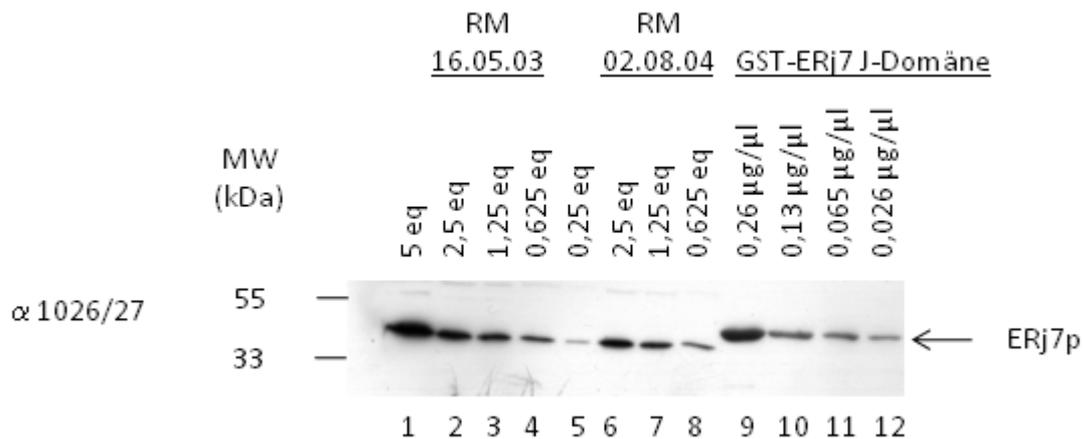


Abb. 3.4. Quantifizierung von ERj7p in rauen Mikrosomen.

A. Verschiedene Mengen an rauen Mikrosomen („RM“) wurden gemeinsam mit definierten Massen an GST-ERj7-J auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion mittels α -1026/27 erlaubte eine Abschätzung der Konzentration von ERj7p in rauen Mikrosomen über die Bestimmung der Intensitätsvolumina der markierten Banden.

B

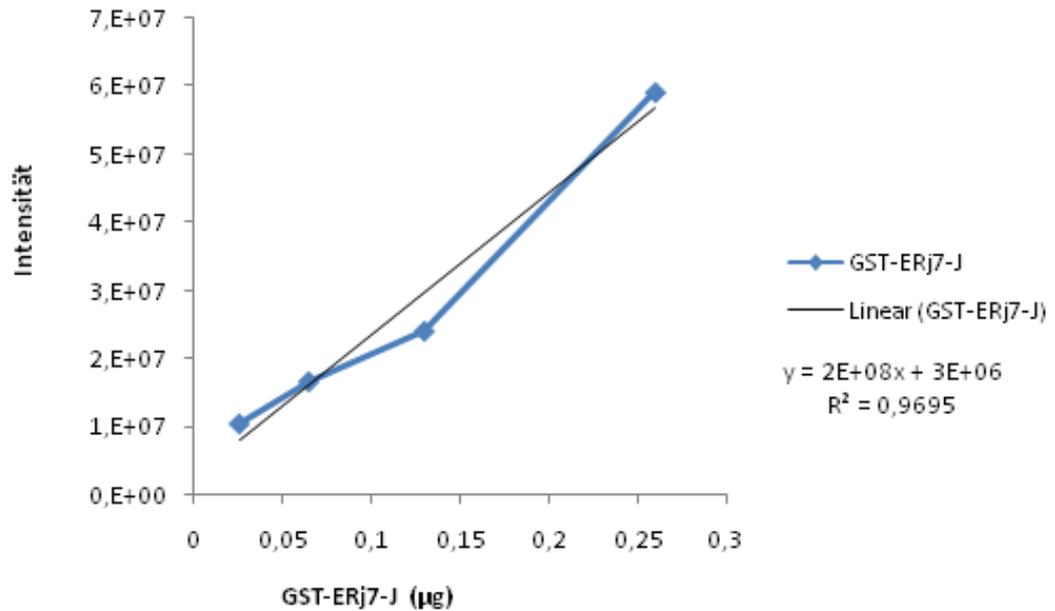


Abb. 3.4. Quantifizierung von ERj7p in rauen Mikrosomen.

B. Eichgraph zur Berechnung der Konzentration an ERj7p in rauen Mikrosomen. Aufgetragen ist die bekannte Masse an rekombinantem GST-ERj7p J-Domäne gegen das Intensitätsvolumen der Banden des Western Blots. Nach Umkehr der Geradengleichung konnte die Masse an ERj7p pro Equivalent RM bzw. pro μl RM berechnet werden. Bei einem Molekulargewicht von 38,5 kDa ergab sich daher ein Wert von 2,3 μM für ERj7p in RM.

3.1.4. Rekombinante Expression und Reinigung des Fusionsproteins GST-ERj7p

J-Domäne

Um ERj7p *in vitro* zu charakterisieren, wurde die J-Domäne des Proteins als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. Die Klonierung des ERj7p aus humanem Gewebe erfolgte durch die Firma RZPD (RZPD-Klon: EX-E1345-B02). Die Gensequenz der J-Domäne des ERj7p wurde durch PCR amplifiziert und mit Hilfe von Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *BamHI* in den pGEX-4T-TEV-804 Vektor subkloniert (vgl. Abb. 3.1.). Die GST-ERj7p J-Domäne lag nach der Synthese in *E. coli* in löslicher Form vor (Abb. 3.5.A.) und wurde nach einer Umpufferung in PBS und einem Konzentrationsabgleich mit Rinder Serum Albumin (BSA) für die nachfolgenden Versuche verwendet. Eine Kontrolle der Fraktionen mit einem α -GST-Antikörper zeigte wie schon die Coomassie-Färbung (Abb. 3.5.A.) kaum Abbau. Es konnten bei Reaktionsvolumen von 3 l ca. 3,7 mg Protein bei der Synthese durch *E. coli* gewonnen werden.

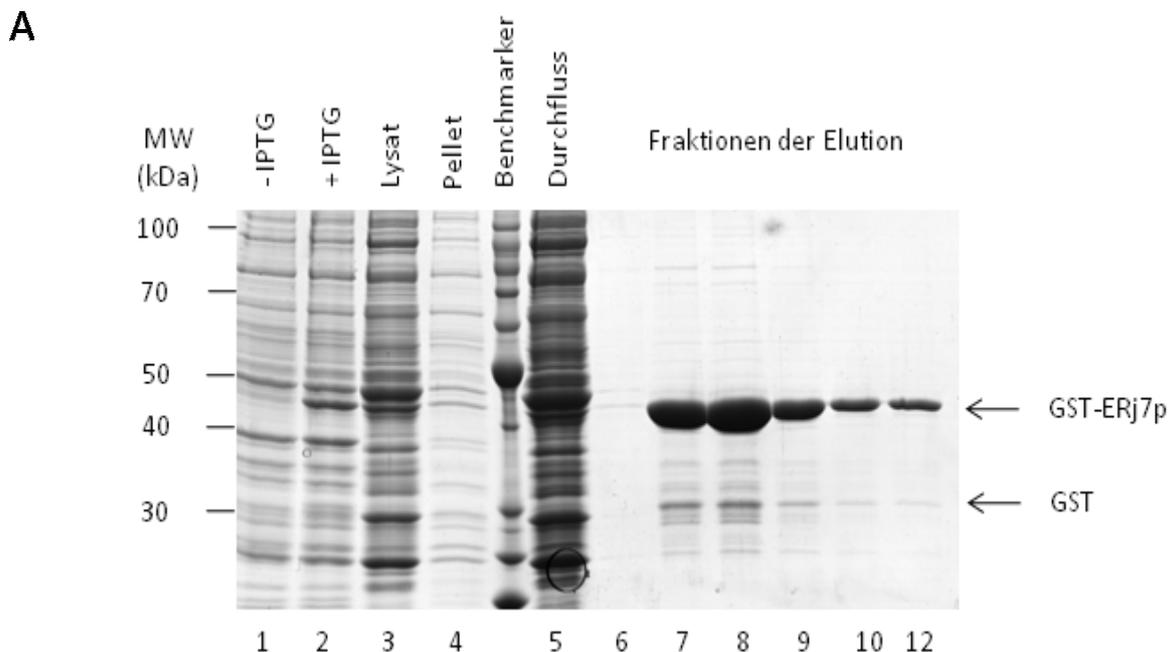


Abb. 3.5. Synthese von GST-ERj7p J-Domäne in *E. coli*.

A. Rosetta pLys *E. coli*-Zellen wurden mit dem Plasmid pGEX-4T-TEV-804-ERj7p-J-Domäne transformiert und bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert (Spur „- IPTG“). Es wurde dann bei einer Temperatur von 20°C für 3 h mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach Ende der Induktion (Spur „+ IPTG“) wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 4°C für 10 min geerntet. Die Zellen wurden durch Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile der Suspension wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Spur „Pellet“). Das Lysat wurde auf eine GSH-Sepharose Säule gegeben und mit PBSKMT gewaschen und mit red. GSH eluiert (Spuren „Lysat“, „Durchfluss“ und „Fraktionen der Elution“).

B

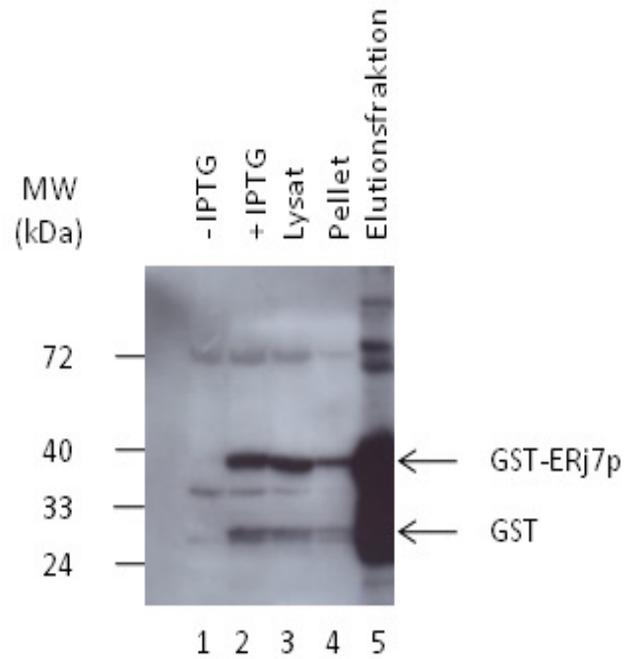


Abb. 3.5. Synthese von GST-ERj7p J-Domäne in *E. coli*.

B. Kontrolle der Expression auf Western Blot Ebene.

Zur Kontrolle der Expression wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit α -GST (1:1000) und POD-Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:1000). Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem und Röntgenfilmen visualisiert.

3.1.5. Funktion der GST-ERj7 J-Domäne

3.1.5.1. Das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne interagiert ATP-abhängig mit BiP

In Anwesenheit von ATP interagieren HSP40-Proteine mit molekularen Chaperonen der HSP70-Familie. Die Interaktion wird dabei durch die J-Domäne der HSP40-Proteine vermittelt (Silver und Way, 1993; Shen *et al.*, 2002). Aus diesem Grund sollte die Funktionalität der rekombinant in *E. coli* synthetisierten GST-ERj7-J-Domäne mittels ihrer Bindungseigenschaften an BiP geprüft werden.

Zu diesem Zweck wurde GST-ERj7 J-Domäne an GSH-Sepharose immobilisiert und mit RM Extrakt in An- und Abwesenheit von ATP inkubiert. Der Extrakt aus Hundepankreas-Mikrosomen wurde durch Solubilisierung von rauen Mikrosomen und anschließende Abtrennung von Membranbestandteilen durch Zentrifugation hergestellt (vgl. 2.3.1.). Unspezifisch bindendes Protein wurde durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt. Die gebundenen Proteine wurden daraufhin mit Laemmli-Probenpuffer eluiert. Die Elutionsproben sowie die Überstände mit ungebundenem Protein wurden *via* SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (siehe Abb. 3.6.B). Bei Betrachtung des gebundenen Materials in Spur 1 ist zu erkennen, dass in Abwesenheit von ATP BiP im verwendeten RM-Extrakt verblieb (Spur 2). In Anwesenheit von ATP hingegen ging BiP eine Bindung mit GST-ERj7 J-Domäne ein (Spur 3 und 4). Bei der Negativkontrolle (Abb. 3.6.A.) war keine Bindung festzustellen, so dass eine Interaktion von BiP mit dem GST-„tag“ des Fusionsproteins ausgeschlossen werden konnte. BiP konnte *via* Western Blot der in Abb. 3.6. gezeigten Bande zugeordnet werden (Abb. 3.6.D.).

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die Interaktion mit rekombinant in *E. coli* synthetisiertem BiP-His₆ anstatt RM-Extrakt untersucht. Auch hier wurden die Elutionsproben und die Überstände mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 3.6.C.). Wie schon bei dem Versuch mit RM-Extrakt kam es nur bei Anwesenheit von ATP zu einer Bindung von BiP an GST-ERj7-J-Domäne (Spur 3).

Die J-Domäne des Fusionsproteins von ERj7p interagiert somit ATP-abhängig mit BiP. Stimuliert die J-Domäne auch die ATPase-Aktivität von BiP?

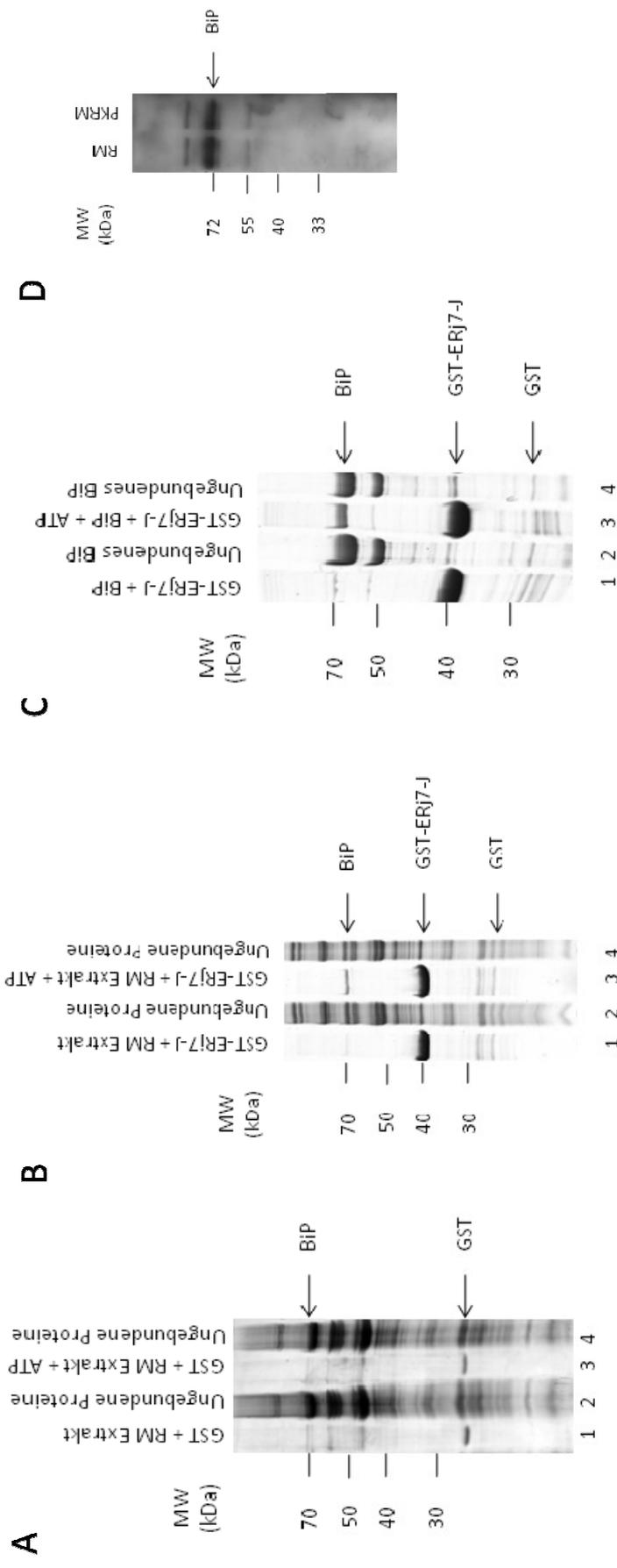


Abb. 3.6. GST-ERj7-J-Domäne interagiert ATP-abhängig mit BiP.

A. Pro Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sephrose mit 20 μ g GST für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS + 0,325% CHAPS gewaschen. Die immobilisierten Proteine wurden dann in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP mit 50 μ l RM-Extrakt (vgl. 2.3.1.) und 50 μ l CCP0 für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Abnahme der Überstände (Spur 2 und 4), wurde nicht gebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,325% CHAPS entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 30 μ l Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Proben der Überstände und den Elutionen wurden jeweils 10 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

B. Pro Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sephrose mit 120 μ g GST-ERj7 J-Domäne für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS + 0,325% CHAPS gewaschen. Die immobilisierten Proteine wurden dann in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP mit 50 μ l RM-Extrakt (vgl. 2.3.1.) und 50 μ l CCP0 für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Abnahme der Überstände (Spur 2 und 4), wurde nicht gebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,325% CHAPS entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 30 μ l Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Proben der Überstände und den Elutionen wurden jeweils 10 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

C. Je Ansatz wurden 30 μ l GSH-Sephrose mit 120 μ g GST-ERj7p J-Domäne für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS + 0,325% CHAPS gewaschen. Die Ansätze wurden dann mit 20 μ g BiP in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP für 15 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden dabei mit PBS + 0,325% CHAPS auf ein Volumen von 100 μ l gebracht. Nach der Abnahme der Überstände wurde ungebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,325% CHAPS entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 30 μ l Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Proben der Überstände und den Elutionen wurden jeweils 10 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

D. Western Blot für BiP. BiP wird mit α -BiP-Antikörper in RMs und PKRMs bei 72 kDa detektiert.

3.1.5.2. Das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP

Es konnte eine ATP-abhängige Interaktion von GST-ERj7 J-Domäne mit dem HSP70 Chaperon BiP, wie sie von Shen *et al.* (2002) für ERj4p und BiP gezeigt wurde, bestätigt werden. Als weiterer Test zur Funktionalität der rekombinant synthetisierten GST-ERj7 J-Domäne wurde daher der Einfluss der J-Domäne des ERj7p auf die ATPase-Aktivität von BiP untersucht. Eine funktionelle Interaktion eines J-Proteins mit seinem HSP70-Partner führt zu einer Stimulation von dessen intrinsischer ATPase-Aktivität (Cyr *et al.*, 1994, Rassow *et al.*, 1995).

BiP wurde für diesen Versuch in einem äquimolaren Verhältnis zu der GST-ERj7 J-Domäne eingesetzt. Bei dem verwendeten BiP handelte es sich um rekombinant in *E. coli* synthetisiertes His₆-BiP aus Hamster. Die Proteine wurden zusammen mit 500 µM ATP sowie 0,1 µCi [γ ³²P]ATP bei 37°C inkubiert (vgl. 2.4.11.). Aus den Reaktionsansätzen wurden zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. ATP und freigesetztes P_i wurden anschließend durch Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt. Die DC-Platten wurden schließlich mit einem PhosphoImager und der zugehörigen ImageQuant-Software ausgewertet (Abb. 3.7.).

Es zeigte sich eine zweifache Stimulation der intrinsischen ATPase-Aktivität von BiP in Anwesenheit von GST-ERj7 J-Domäne. Der Zusatz des Nukleotidaustauschfaktors GRP170 erhöhte die ATPase-Aktivität um das 2,5-fache (Abb. 3.7.). Diese Ergebnisse zeigen, dass die rekombinant in *E. coli* synthetisierte GST-ERj7 J-Domäne in der Lage ist, funktionell mit BiP zu interagieren.

In Zusammenfassung mit der in 3.1.5.1. gezeigten ATP-abhängigen Interaktion der J-Domäne von ERj7p mit BiP stellt ERj7p ein HSP40 Co-Chaperon des Chaperon-Netzwerkes des ER dar. Die genaue Affinität der beiden Proteine zueinander wurde im Folgenden genauer untersucht.

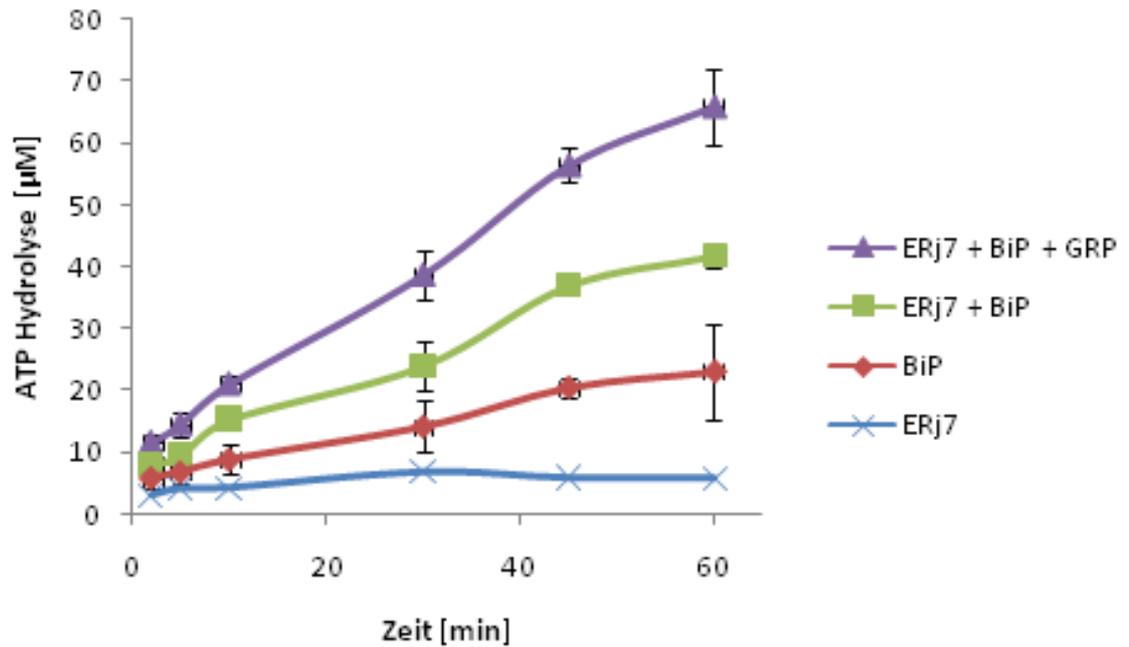


Abb. 3.7. GST-ERj7p stimuliert die ATPase-Aktivität von BiP

2 µM BiP wurden in An- und Abwesenheit von 2 µM GST-ERj7p in Hepes-Puffer mit 500 µM ATP und 0,1 µCi [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP bei 37°C inkubiert. Nach 3, 10, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots entnommen und zum Stoppen der ATPase-Reaktion in eine 60 mM EDTA-Lösung überführt. Die Aliquots wurden dann auf eine PEI-Cellulose-Platte aufgetragen und zur Trennung von ATP und freigesetztem P_i für ca. 10 min in 1 M Formiat, 0,5 M Lithiumchlorid chromatographiert. Die radioaktiven Adeninnukleotide wurden durch Auflegen einer PhosphoImager-Platte für 1,5 h sichtbar gemacht und mit der ImageQuant-Software ausgewertet.

3.1.5.3. Das Fusionsprotein GST-ERj7 J-Domäne zeigt eine hohe Affinität zu BiP

Nach dem Nachweis der Funktionalität der GST-ERj7 J-Domäne durch die Interaktion mit BiP in den vorausgegangenen Versuchen sollte anschließend die Affinität der Bindung bestimmt werden. Die erhaltene Affinität sollte in Zusammenhang mit den Affinitäten anderer HSP40-Bindungspartner gebracht werden.

Die Bindungsaffinität wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) mit einem BIAcoreX-Gerät bestimmt (vgl. 2.4.10.). GST-ERj7 J-Domäne wurde als Ligand in einer Flusszelle (Fc1) auf der Oberfläche eines Sensorchips über einen kovalent gebundenen α -GST-Antikörper immobilisiert. BiP-His₆ wurde daraufhin als Analyt in verschiedenen Konzentrationen in Puffer über die Oberfläche des Sensorchips geleitet.

Über die SPR-Detektion wurde die Bindung des Analyten an den Liganden beobachtet. Bei jeder Messung wurde zusätzlich in einer Referenzzelle (Fc2) GST alleine auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Für die mathematische Auswertung wurde die Differenz der Sensorgramme der beiden Flusszellen (Fc1–Fc2) verwendet. Somit konnten eventuell auftretende unspezifische Bindungen an GST berücksichtigt werden. Die Bindungsaffinität des Proteinkomplexes wurde mit Hilfe der BIAevaluation-Software bestimmt.

Abbildung 3.8.A. zeigt das Sensorgramm für eine Analyt-Konzentration von 0,5 μ M BiP-His₆ in An-/Abwesenheit von ATP. Dies bestätigt erneut, dass die Bindung des Analyten an den Liganden tatsächlich ATP-abhängig geschieht. In einem weiteren Versuch wurden verschiedene Konzentrationen an BiP-His₆ eingesetzt (Abb. 3.8.B.). BiP-His₆ wurde während der Assoziationsphase an die immobilisierte GST-ERj7 J-Domäne gebunden und dissoziierte wieder ab, sobald Laufpuffer zugegeben wurde. Aus den aufgezeichneten Sensorgrammen wurden mittels der BiaEvaluation-Software die Werte für die Assoziationsratenkonstante k_a und die Dissoziationsratenkonstante k_d sowie ein Wert für die Dissoziationskonstante K_D (k_d/k_a) der BiP - GST-ERj7p J-Domänen Interaktion berechnet. Die Daten wurden mit dem von der Software zur Verfügung gestellten Modell für eine 1:1-Bindung ausgewertet. Das kleine χ^2 zeigte in der statistischen Auswertung eine passende Annäherung der Trendlinie in Bezug auf die Graphen. Es ergaben aus den Auswertungen der Graphen die in Tab. 3.1. aufgeführten Werte:

3. Ergebnisse

Tabelle 3.1. Übersicht der Affinitätswerte von ERj7p J-Domäne zu BiP.

k_a	k_d	K_D	χ^2
$5,07 * 10^3$ 1/Ms	$5,70 * 10^{-3}$ 1/s	$1,13 * 10^{-6}$ M	9,42

Die mit Oberflächenplasmonspektroskopie bestimmte Dissoziationskonstante K_D weist mit $1,13 \mu\text{M}$ eine vergleichbare Affinität wie ERj1p und ERj5p in seiner Interaktion mit BiP (vgl. Tab. 4.1.) auf. Die K_D mit $1,13 \mu\text{M}$ spricht daher für eine relative hohe Affinität des ERj7p zu BiP. BiP und ERj7p scheinen also *in vivo* miteinander zu interagieren, wobei die genaue Funktion dieser Interaktion noch bestimmt werden muss.

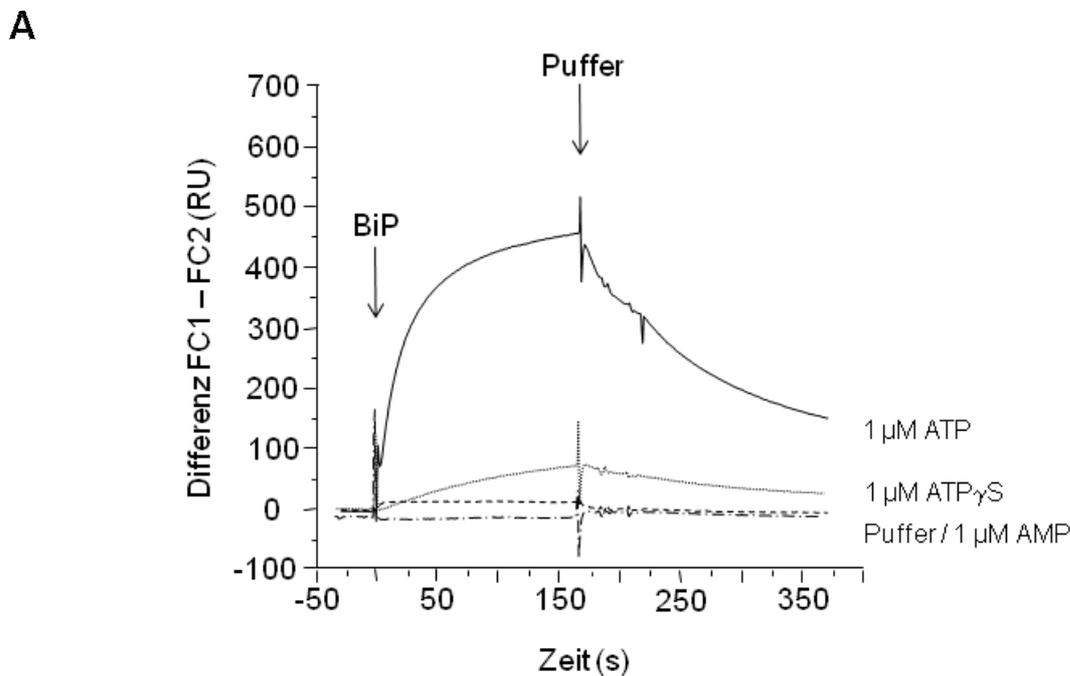


Abb. 3.8. Affinität von GST-ERj7p zu BiP in Gegenwart von ATP

A. Ein monoklonaler anti-GST-Antikörper wurde nach Anweisung des Herstellers an einen CM5-Chip gekoppelt. Das Fusionsprotein GST-ERj7p wurde über diesen GST-Antikörper auf dem Chip in Flusszelle 1 (Fc1) immobilisiert. In Flusszelle 2 (Fc2) wurde die gleiche Menge GST als Referenz gebunden. Dann wurde BiP-His₆ in der angegebenen Konzentration und in Gegenwart von 1 mM ATP, 1 mM ATP γ S, 1 mM AMP oder PBS/KMT mit einer Flussgeschwindigkeit von $15 \mu\text{l}/\text{min}$ über die Chipoberfläche injiziert. Nach jeder Injektion wurde PBS/KMT-Puffer über den Chip geleitet. Die aufgezeichneten Sensorgramme zeigen die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem GST-ERj7p und der Referenzzelle mit immobilisiertem GST.

B

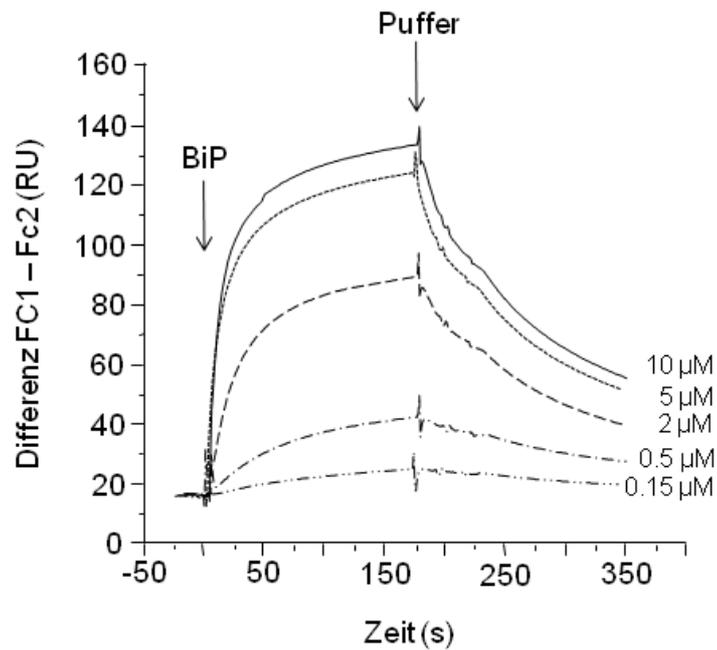


Abb. 3.8. Affinität von GST-ERj7p zu BiP in Gegenwart von ATP

B. Ein monoklonaler anti-GST-Antikörper wurde nach Anweisung des Herstellers an einen CM5-Chip gekoppelt. Das Fusionsprotein GST-ERj7p wurde über diesen GST-Antikörper auf dem Chip in Flusszelle 1 (Fc1) immobilisiert. In Flusszelle 2 (Fc2) wurde die gleiche Menge GST als Referenz gebunden. Dann wurde BiP-His₆ in den angegebenen Konzentrationen und in Gegenwart von 1 mM ATP mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 µl/min über die Chipoberfläche injiziert. Nach jeder Injektion wurde PBS/KMT-Puffer über den Chip geleitet. Die aufgezeichneten Sensorgramme zeigen die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem GST-ERj7p und der Referenzzelle mit immobilisiertem GST.

3.1.6. Funktion von ERj7p

3.1.6.1. Herunterregulation von ERj7 leitet keine UPR ein

Da die Immunfluoreszenz eine ER-Lokalisierung von ERj7p zeigte, der Western Blot jedoch auch andere Banden nachwies, stellte sich die Frage, ob bei Behandlung der PC3-Zellen mit siRNA gegen ERj7 weiterhin eine Lokalisierung im ER nachweisbar ist. Weiterhin sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob eine Regulation von ERj7 durch siRNA zur Einleitung der UPR führt.

Hierfür wurden PC3-Zellen herangezogen, nach 24 h mit zwei verschiedenen siRNAs (ERj7-hs-#1 und #2) bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und nach 48 h, 72 h und 86 h bzw. 96 h *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Parallel wurden PC3-Zellen mittels Formaldehyd fixiert und Triton-X permeabilisiert (2.4.6.). Zur Anfärbung von ERj7p und Sec62p wurden entsprechende Antikörper (α -1026/27 und α -262, 2.2.1.) sowie ein fluoreszenz-markierter, sekundärer Antikörper (α -Rabbit-Alexa488, Invitrogen) eingesetzt.

Die unbekannt, prominenten Proteinbanden fanden sich auch in diesem Versuch auf Ebene des Western Blots wieder. Allerdings zeigte sich auch eine Abreicherung des ERj7p unter Einsatz der siRNAs (Abb. 3.10.A., B., C. und D.). Hierbei fanden sich ~ 40% Restprotein in den Proben bezogen auf unbehandelte Zellen (Abb. 3.10.A. und B.) und ~ 10 – 40% Restprotein bezogen auf Kontroll-siRNA behandelte Proben (Abb. 3.10.C. und D.). Die Immunfluoreszenz-Färbung der mit siRNA behandelten PC3-Zellen zeigte nach 86 h jedoch keine Änderung in der Lokalisierung des ERj7p Antikörper-Signals (Abb. 3.9.). Die Anwendung von siRNA zeigte demnach eine Änderung des Proteingehalts für ERj7p nur auf Western Blot nicht jedoch auf Immunfluoreszenz-Ebene. Eine Regulierung von ERj7 durch siRNA brachte hier somit keine Veränderung. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das Signal in der Immunfluoreszenz vorwiegend von den unspezifischen Banden herrührte.

Weiterhin wurde bei einer Herunterregulation von ERj7 keine UPR ausgelöst. So blieb der Proteingehalt von GRP170 relativ stabil, obwohl es bei der UPR induziert wird (Abb. 3.10.B.). Für BiP zeigte sich allerdings bei der Reduzierung von ERj7 durch die siRNA #2 eine Hochregulierung (Abb. 3.10.D.), nicht jedoch bei dem Einsatz der siRNA #1. Dass keine UPR ausgelöst wurde, könnte mit der relativ schwachen Reduzierung des ERj7 auf ca. 40 % Restprotein zusammenhängen.

Im Folgenden sollte nun die Frage beantwortet werden, ob ein induzierter ER-Stress eine Hochregulierung von ERj7 bewirkt. Eine weitere Frage war, ob ERj7p bei ER-Stress in der Immunfluoreszenz besser erkannt wird.

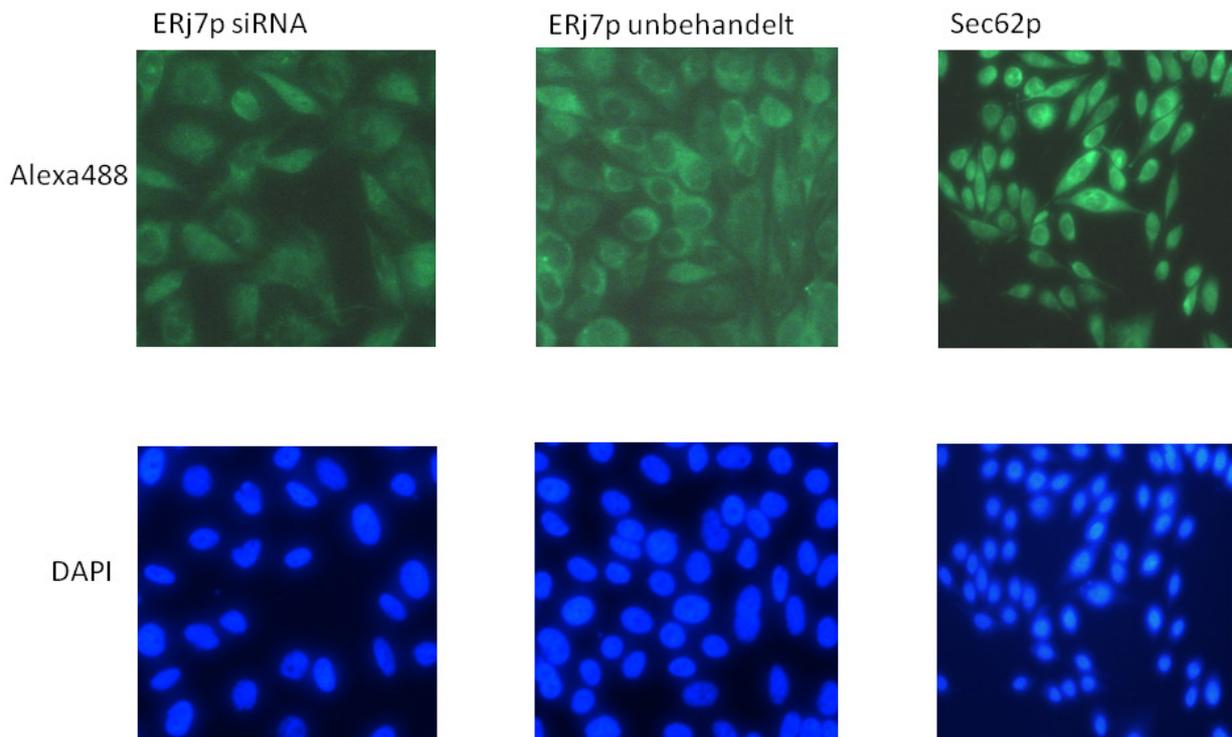


Abb. 3.9. Lokalisierung von ERj7p in siRNA transfizierten und unbehandelten PC3-Zellen, sowie Sec62p in PC3-Zellen.

PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 angezogen mit siRNA gegen ERj7p mittels Highperfect transfiziert und nach 96 h mit Formaldehyd fixiert, Triton-X permeabilisiert und mit α -1026/27 oder α -262 sowie α -Rabbit-Alexa488 für die Proteine bzw. DAPI für den Kern gefärbt.

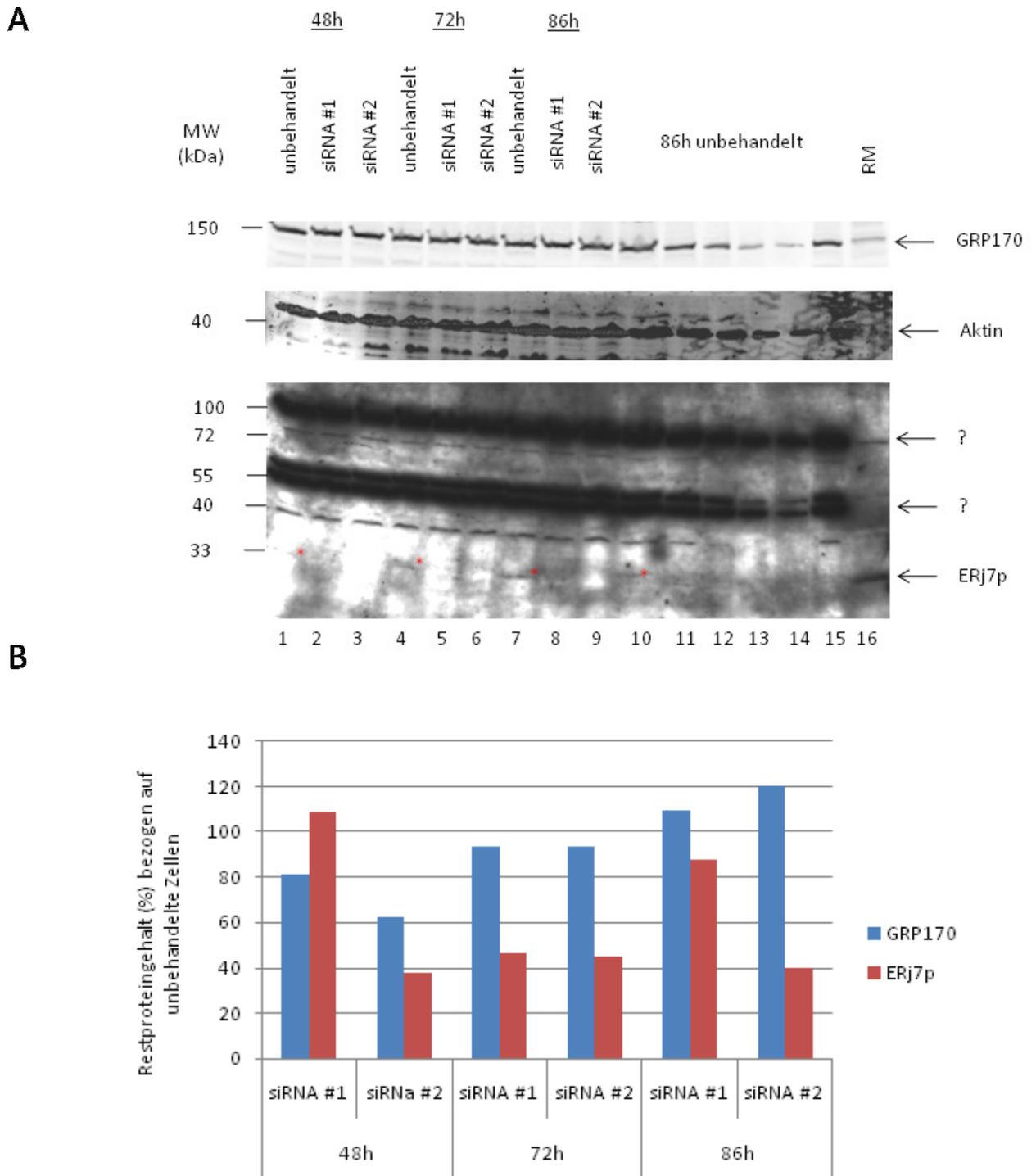


Abb. 3.10. siRNA Experimente für ERj7p.

A. PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 herangezogen und mit siRNA gegen ERj7p (#1 und #2) mit Highperfect transfiziert. Nach 48 h, 72 h und 86 h wurden Proben entnommen und ein Zellextrakt von 300.000 Zellen über SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert. Für 86 h unbehandelt wurde eine Verdünnungsreihe aufgetragen. 1. Antikörper: α -GRP170, α -Katin und α -1026/27; 2. Antikörper: ECL Plex Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5, ECL Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und POD-Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper. ? kennzeichnet die unter 3.1.1. gefundenen unbekanntenen Banden

B. Auswertung des Western Blots.

Gezeigt ist der Restproteingehalt in % (berechnet aus dem Quotienten ERj7p zu Aktin bei unbehandelten Zellen) nach 48 h, 72 h und 86 h. Die Behandlung mit siRNA zeigt eine Reduzierung des ERj7p auf ~ 40 % Restprotein.

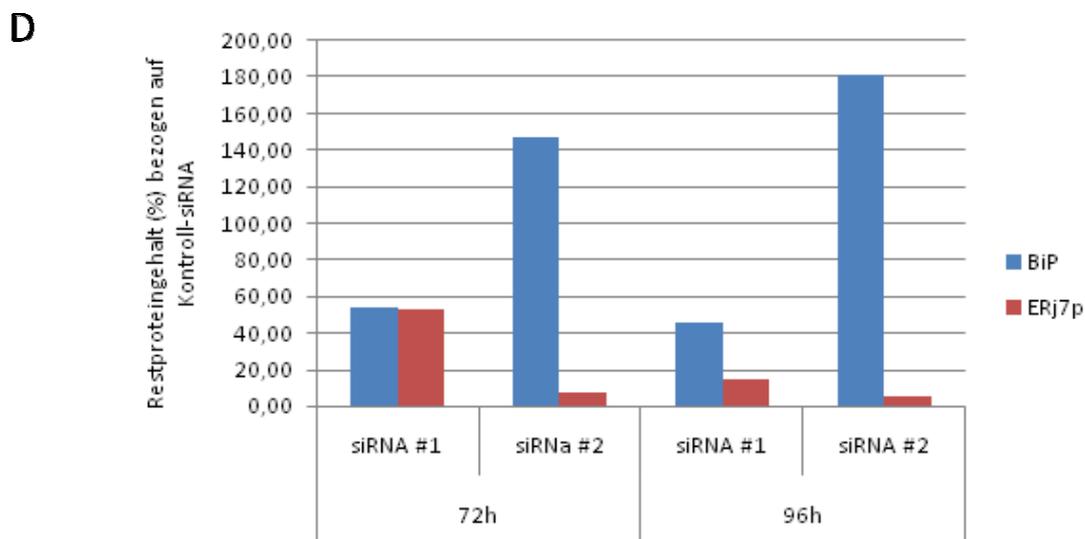
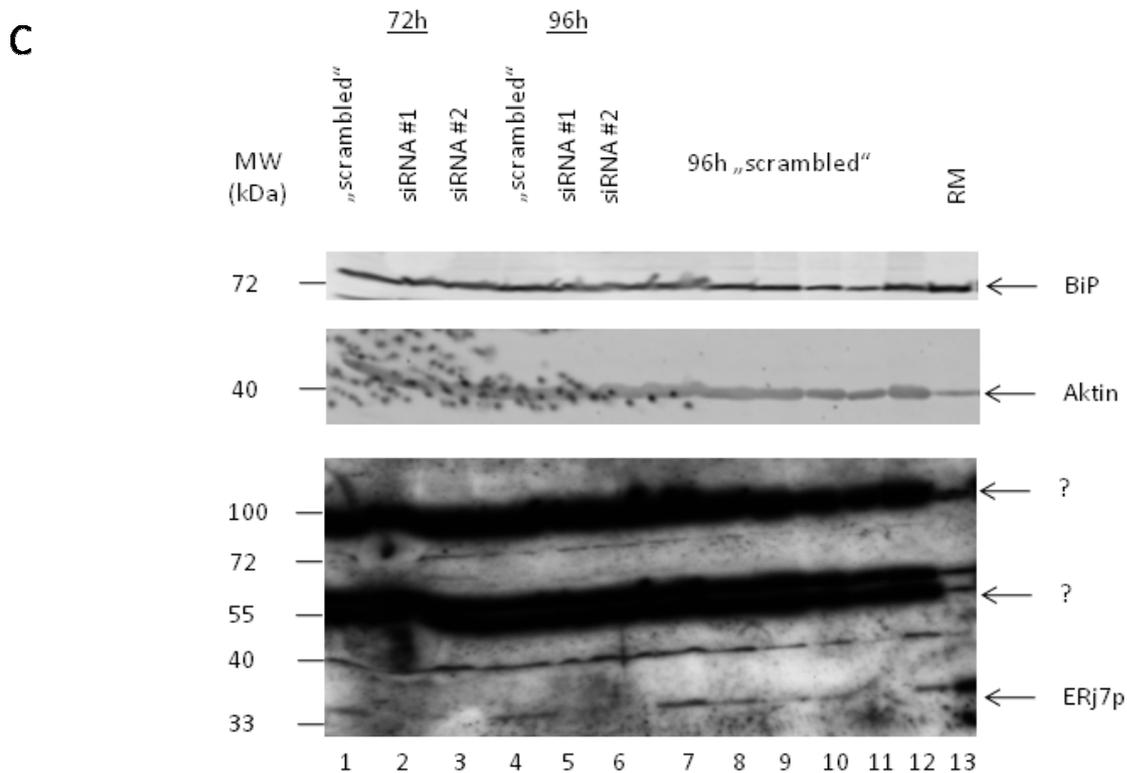


Abb. 3.10. siRNA Experimente für ERj7p.

C. PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 herangezogen und mit siRNA gegen ERj7p (#1 und #2) und einer „scrambled“ siRNA mit Highperfect transfiziert. Nach 72 h und 96 h wurden Proben entnommen und ein Zellextrakt von 300.000 Zellen über SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert. Für 96 h „scrambled“ wurde eine Verdünnungsreihe aufgetragen. 1. Antikörper: α -BiP, α -Katin und α -1026/27; 2. Antikörper: ECL Plex Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5, ECL Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und POD-Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper. ? bezeichnet die unter 3.1.1. gefundenen unbekanntem Banden.

D. Auswertung des Western Blots.

Gezeigt ist der Restproteingehalt in % (berechnet aus dem Quotienten ERj7p zu Aktin bei Kontroll-siRNA behandelten Zellen) nach 72 h und 96 h. Die Behandlung mit siRNAs zeigte eine Regulierung auf ~ 10 – 40 % Restprotein nach 72 h bis 96 h.

3.1.6.2. ERj7 wird bei Stress durch Tunicamycin hochreguliert

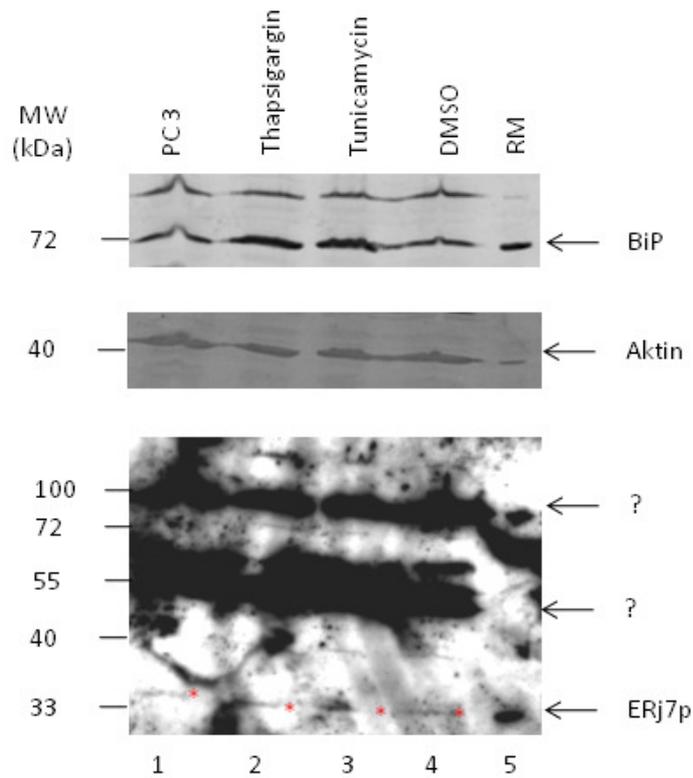
Die Immunfluoreszenz- wie die Immunfluoreszenzfärbung von siRNA reguliertem ERj7 zeigte eine ER-Lokalisierung, der dazugehörige Western Blot zeigte neben ERj7p noch andere Banden. Daher sollte unter Einsatz der beiden Stressoren Tunicamycin 1 $\mu\text{g/ml}$ und Thapsigargin 1 μM die Verteilung innerhalb der PC3-Zellen sowie der Proteingehalt von ERj7p untersucht werden.

Hierfür wurden PC3-Zellen herangezogen, nach 24 h mit Tunicamycin 1 $\mu\text{g/ml}$ und Thapsigargin 1 μM sowie DMSO bei 37°C inkubiert, nach weiteren 24 h geerntet und *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Ein Teil der Zellen wurde mit Formaldehyd fixiert und mit Triton-X permeabilisiert, sowie anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Anfärbung von ERj7p und Sec62p wurden entsprechende Antikörper (α -1026/27 und α -262, 2.2.1.) sowie ein fluoreszierender, sekundärer Antikörper (α -Rabbit-Alexa488, Invitrogen) eingesetzt.

Die Auswertung der Zellextrakte *via* SDS-PAGE und Western Blot zeigte neben einer Hochregulierung von BiP (Abb. 3.11.B.) auch eine starke Erhöhung des ERj7p-Proteingehalts für Tunicamycin, allerdings keine Erhöhung bei Thapsigargin. ERj7 wurde bei Stress durch Tunicamycin hochreguliert und scheint somit an der UPR beteiligt zu sein. Bei der Immunfluoreszenz wurde eine Veränderung der ER-Färbung erkennbar. Die bei DMSO sichtbare Unterteilung von Kern und ER änderte sich für die gestressten Zellen dahingehend, dass sie im Bereich der Kernpole eine verstärkte Färbung zeigten (Tunicamycin) bzw. sich die Färbung insgesamt gleichmäßig auf die Zelle verteilte (Thapsigargin, Abb. 3.12.). Die Funde für Thapsigargin ließen vermuten, dass in der Immunfluoreszenz wieder nicht ERj7p angefärbt wurde, sondern eines der Proteine, die im Western Blot in den zusätzlichen Banden erkannt wurden. Beide unbekannt Proteine zeigten keine Veränderung aufgrund von Stress ausgelöst durch Thapsigargin oder Tunicamycin (Abb. 3.11.A.). Tunicamycin zeigte auch in der Immunfluoreszenz eine Änderung der Proteinverteilung.

ERj7p scheint somit an der UPR, ausgelöst durch die Behandlung mit Tunicamycin, beteiligt zu sein, nicht jedoch an der Stressantwort durch Behandlung mit Thapsigargin. ERj7p ist somit ein funktionelles Mitglied des Chaperon-Netzwerk des ER.

A



B

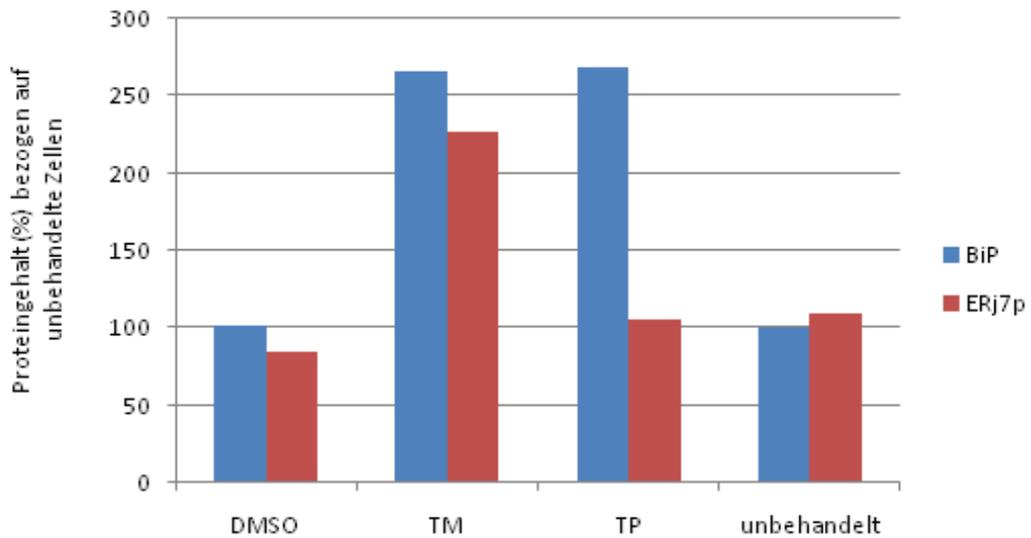


Abb. 3.11. Verhalten von ERj7p bei ER-Stress.

A. Western Blot nach Stressinduktion.

PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 herangezogen und mit DMSO, Tunicamycin 1 $\mu\text{g/ml}$ und Thapsigargin 1 μM gestresst, nach 24 h entnommen und über SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert. Für alle Proben wurde Zellextrakt aus 300.000 Zellen aufgetragen. ? bezeichnet die unbekanntene Proteine, welche nicht durch Stress induziert werden.

B. Auswertung des Western Blots.

Proteingehalt nach 24 h bezogen auf Aktin. BiP wird bei Stress durch Tunicamycin 1 $\mu\text{g/ml}$ oder Thapsigargin 1 μM hochreguliert. Erj7p wird nur durch Tunicamycin 1 $\mu\text{g/ml}$ hochreguliert.

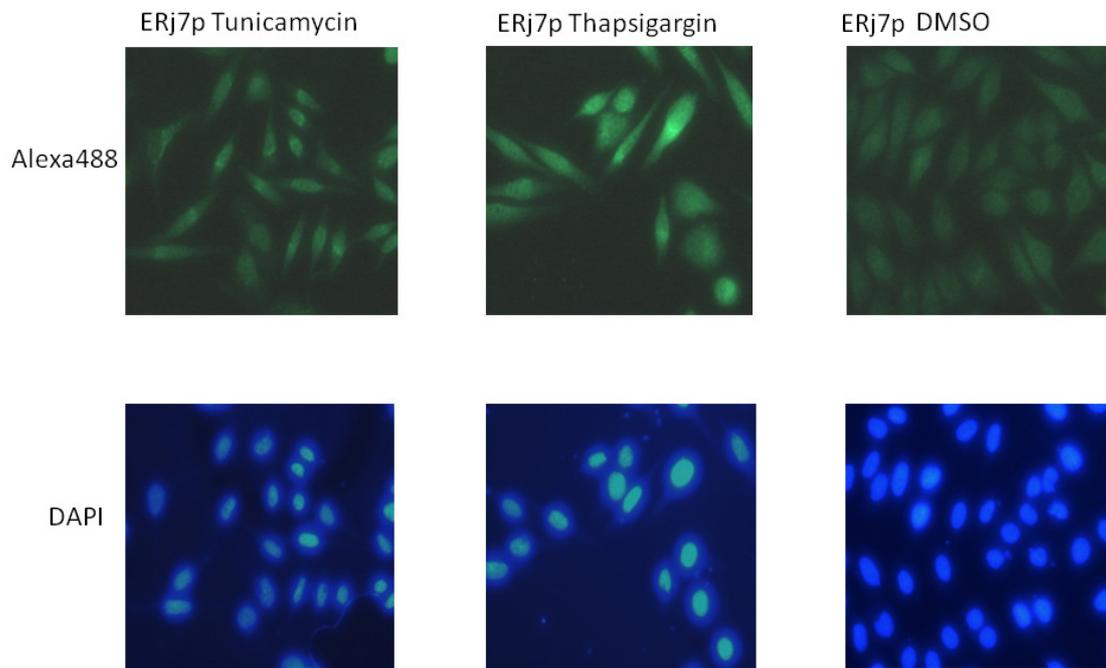


Abb. 3.12. Verteilungsmuster von ERj7p in gestressten wie DMSO behandelten PC3-Zellen
PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 herangezogen und mit DMSO, Tunicamycin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und Thapsigargin 1 μM gestresst. Nach 24 h wurden die PC3-Zellen mit Formaldehyd fixiert, mit Triton-X 100 permeabilisiert und mit α -1026/27 sowie α -Rabbit-Alexa488 für die Proteine bzw. DAPI für den Kern gefärbt.

3.2. Calumenin, ein EF-Hand-Protein im ER

Bei Calumenin handelt es sich um ein Mitglied der CREC Familie, die EF-Hand-Proteine mit geringer Affinität zu Calcium innerhalb des sekretorischen Weges umfasst (Honoré *et al.*, 2000). Es wurde von Tyedmers *et al.* (2005) gezeigt, dass Calumenin mit Sec63p co-immunpräzipitiert. In der vorliegenden Arbeit sollte diese Interaktion von Calumenin und Sec63p, vor allem auch in Bezug auf die Calcium-Abhängigkeit, genauer untersucht werden. Die mögliche Bindung an die J-Domäne des Sec63p ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, da sie als einzige putative Bindestelle im Lumen des ER liegt. Abbildung 3.13. zeigt die Proteinsequenz des nativen Calumenin (A) sowie die Sequenz des benutzten GST-Fusionproteins (B). Es sollte im Rahmen dieser Arbeit zudem die Lokalisierung von Calumenin im ER bestätigt werden wie auch die Regulierung des Calumenin-Gens (CALU) bei induziertem ER-Stress.

A Calumenin

MDLRQFLMCLSLCTAFALSKPTEKKDRVHHEPQLSDKVHNDASQSF~~FDYDHDAFLGAEE~~AKTFDQLTPEESKERLGKI
VSKIDGDKDGFVTVDELKDWIKFAQKRWIYEDVERQWKGHDLNEDGLVSWEEYKNATYGYVLDDPDPDDGFNYK
QMMVDRERRFKMADKDGDLIATKEEFTAFHLPEEYDYMKDIVVQETMEDIDKNADGFDLEEYIGDMYSHDGNT
DEPEWVKTEREQFVEFRDKNRDGKMDKEETKDWILPSDYDHAEAEARHLVYESDQNKDGKLTKEEIVDKYDLFVG
SQATDFGEALVRHDEF.

B GST-Calumenin

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKH
NMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLY
DALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSDYDIPTT
ENLYFQGAHMGGSPEFPGRLEKKPTEKKDRVHHEPQLSDKVHNDASQSF~~FDYDHDAFLGAEE~~AKTFDQLTPEESKERL
GKIVSKIDGDKDGFVTVDELKDWIKFAQKRWIYEDVERQWKGHDLNEDGLVSWEEYKNATYGYVLDDPDPDDGF
NYKQMMVDRERRFKMADKDGDLIATKEEFTAFHLPEEYDYMKDIVVQETMEDIDKNADGFDLEEYIGDMYSHD
GNTDEPEWVKTEREQFVEFRDKNRDGKMDKEETKDWILPSDYDHAEAEARHLVYESDQNKDGKLTKEEIVDKYDL
FVGSQATDFGEALVRHDEF.

Abb. 3.13. Sequenz von Calumenin

A. das vollständige Calumenin.

B. das Fusionsprotein GST-Calumenin.

Orange = EF-Hand-Motive; Grau = GST-Domäne; fett unterstrichen die Signal Sequenz, gestrichelt unterstrichen das ER-Retentionsmotiv sowie gekräuselt unterstrichen das TEV-Spaltmotiv.

3.2.1. Calumenin ist im ER von PC3-Zellen lokalisiert

Es stellte sich zuerst die Frage, ob Calumenin wirklich wie Sec62p im ER lokalisiert ist. Honoré *et al.* (2000) konnten dies bereits nachweisen. Daher diente dieser Abschnitt der Bestätigung der Literaturangaben.

Für den Nachweis der Lokalisierung von Calumenin im ER wurden humane PC3-Zellen mittels Formaldehyd fixiert und Triton-X 100 permeabilisiert (2.4.6.). Zur Anfärbung von Calumenin und Sec62p wurden entsprechende Antikörper (α -344 und α -262, 2.2.1.) sowie ein fluoreszenz-markierter, sekundärer Antikörper (α -Rabbit-Alexa488, Invitrogen) eingesetzt.

Sec62p und Calumenin zeigten eine vergleichbare Anfärbung des ER in PC3-Zellen (Abb. 3.14.A.). Bei beiden Proteinen war der Kern in der Färbung ausgespart und das ER angefärbt. Der dazugehörige Western Blot wies jedoch weitere Banden auf, die auf eine Kreuzreaktion hindeuten (vgl. Abb. 3.14.B.). Allerdings wurde sowohl für Calumenin in rauen Mikrosomen des Hundepankreas wie für das rekombinante Protein gezeigt, dass der α -Calumenin-Antikörper durchaus spezifisch Calumenin detektiert (vgl. Abb. 3.14.B. und Abb. 3.16.C.). Calumenin ist daher in Bezug auf die Spezifität des Antikörpers auf Ebene der Immunfluoreszenz als ER-ständiges Protein nachweisbar. Die luminale Lokalisierung von Calumenin sollte in einem weiteren Versuch genauer untersucht werden.

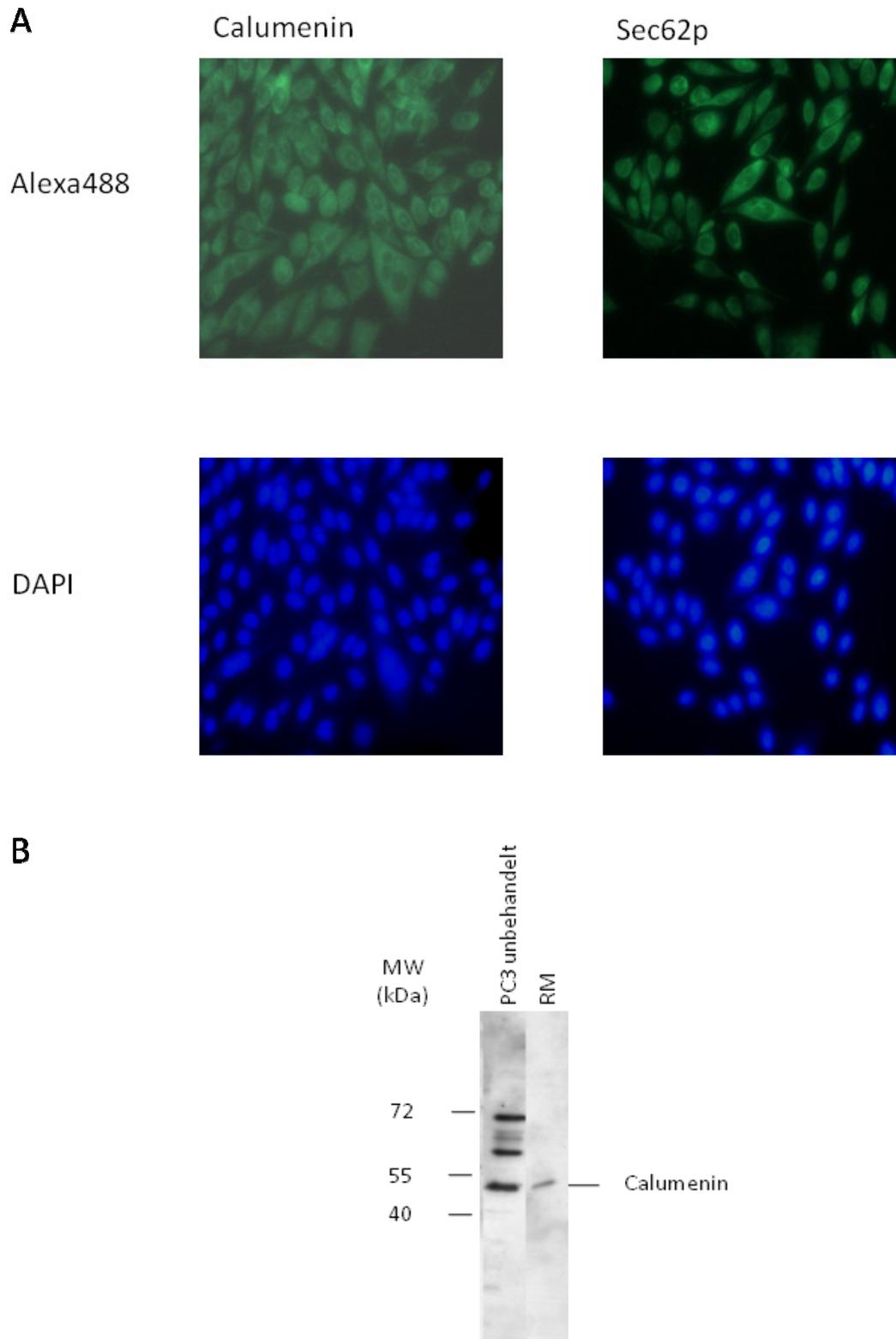


Abb. 3.14.: Verteilungsmuster von Calumenin und Sec62p in PC3-Zellen.

A. PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 angezogen und mittels Formaldehyd fixiert, Triton-X 100 permeabilisiert und mit α -344 oder α -262 sowie α -Rabbit-Alexa488 für die Proteine bzw. DAPI für den Kern gefärbt.

B. Kontrolle des α -Calumenin-Antikörpers. Aufgetragen sind 300.000 PC3-Zellen sowie eine RM-Kontrolle.

3.2.2. Calumenin wird in das ER importiert

Calumenin verfügt nach einer bioinformatischen Analyse über eine Signalsequenz für den Transport in das ER sowie ein Retentionssignal (HDEF, Honoré *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2005, Abb. 3.13.). Es wurde daher untersucht, ob Calumenin in raue Mikrosomen importiert sowie prozessiert wird und in ihnen gegen Proteinase K-Verdau geschützt ist.

Es wurde das Plasmid pcDNA3-*Calumenin* hergestellt (vgl. 2.2.3.), das die für Calumenin codierende Sequenz vollständig beinhaltet (Abb. 3.13.A.). Dieses Plasmid wurde in einem Importversuch eingesetzt (2.3.4.). Dabei wurde das Retikulozyten-Lysat-System von Roche verwendet. Nach der Inkubation des Versuchsansatzes mit dem pCDNA3-*Calumenin*-Plasmid und [³⁵S] Methionin für 30 min bei 30°C wurde der Ansatz gedrittelt. Je ein Drittel wurde mit Sucrose (Spur 1 und 4), Sucrose + Proteinase K (Spur 2 und 5) oder mit Sucrose + Proteinase K + Triton-X (Spur 3 und 6) für 1 h auf Eis inkubiert und mit 4 µl PMSF die Reaktion gestoppt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Proben mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und *via* SDS-PAGE und PhosphoImaging analysiert.

Neben den Proben mit rauen Mikrosomen (Abb. 3.15., Spur 4 – 6) wurden auch Proben mit H₂O / Puffer (Abb. 3.15., Spur 1 – 3) als Kontrolle aufbereitet. Abb. 3.16. zeigt das Ergebnis des Importversuches. Calumenin wurde im Falle der rauen Mikrosomen transportiert und ist vor dem Proteinase K Verdau geschützt. Erst die Zugabe von Triton-X, das die rauen Mikrosomen auflöst, erlaubte einen Abbau des Calumenins. Der fehlende Schutz ist in der H₂O / Puffer Kontrolle gut zu erkennen. In Zusammenhang mit der Immunfluoreszenz sowie der aus der Literatur bekannten HDEF ER-Rückhaltesequenz (Honoré *et al.*, 2000) wurde somit die Lokalisierung von Calumenin im ER nachgewiesen. Leider konnte in diesem Versuchsteil nur der Import, nicht jedoch die Prozessierung des Calumenins beobachtet werden. Dies dürfte auf die ungenügende Auflösung der Methode zurückzuführen sein.

3. Ergebnisse

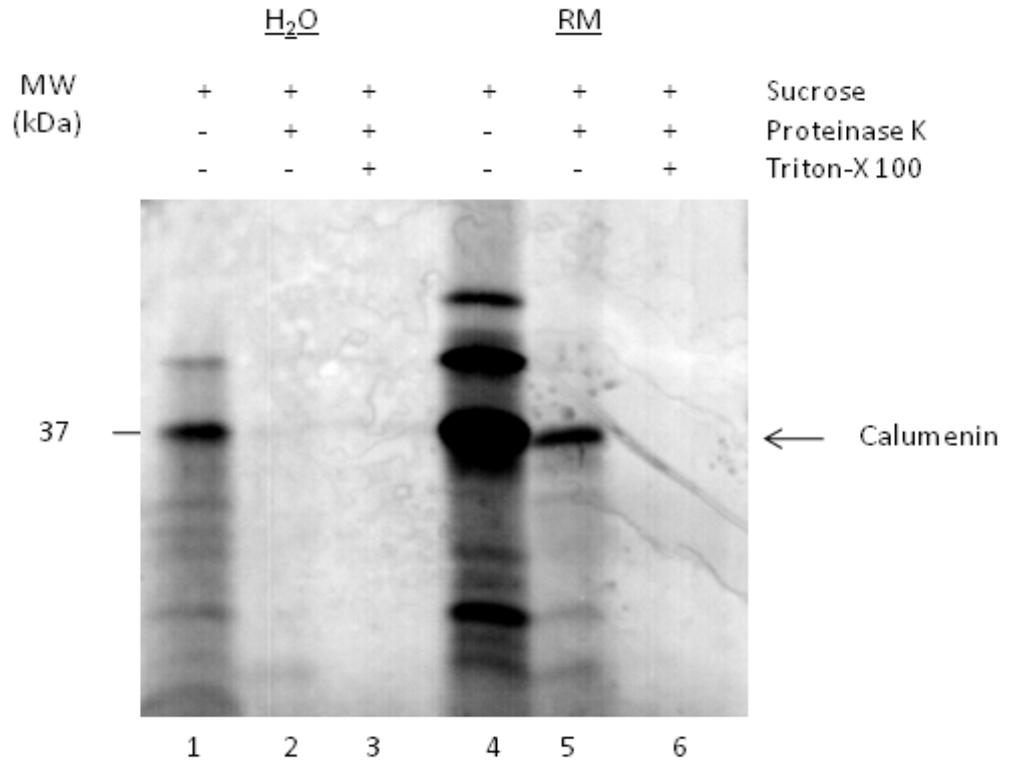


Abb. 3.15. Sequestrierung von Calumenin in raue Mikrosomen. Retikulozyten-Lysat +/- raue Mikrosomen wurde für 30 min bei 30°C zusammen mit [³⁵S] Methionin inkubiert, gedrittelt und mit Sucrose, Proteinase K und Triton-X 100 versetzt. Nach einer weiteren Inkubation, wurde die Reaktion mit 4 µl PMSF gestoppt und 6µl Laemmli bei 5 min 95°C eluiert. Nach SDS-PAGE wurden die Spuren *via* „PhosphoImaging“ analysiert.

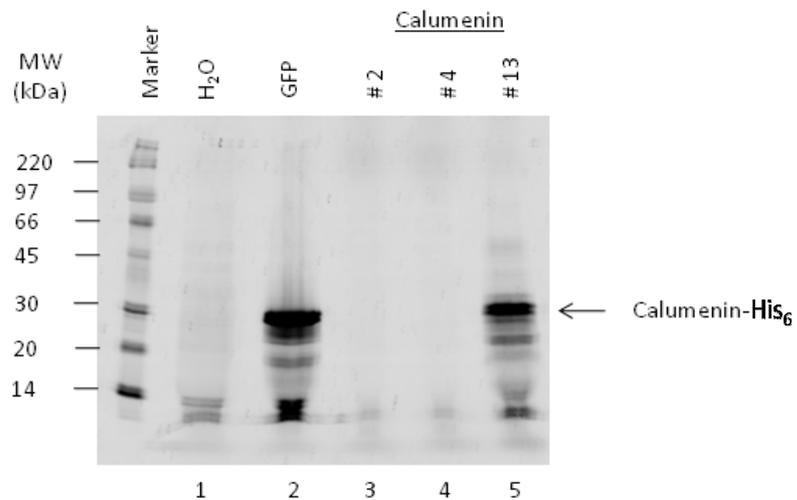
3.2.3. Rekombinante Synthese und Reinigung des Fusionsproteins GST-Calumenin

Um die Interaktion von Calumenin mit Sec63p *in vitro* zu charakterisieren, wurde das Protein als His₆-Fusionsprotein in einem RTS 100-System (Roche, Abb. 3.16.A.) bzw. als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert (Abb. 3.16.B.). Zur Kontrolle der Synthese im RTS 100 System wurde GFP als Kontrolle eingesetzt (Abb. 3.16.A.). Da die Synthese und Reinigung des Fusionsproteins aus *E. coli* zu einem nativen Protein führte, wurde dieser Syntheseweg für den weiteren Verlauf der Arbeit gewählt. GST-Calumenin wurde mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. Die Klonierung Calumenins aus humanem Gewebe erfolgte durch die Firma RZPD (RPZD-Klon: IRAUp96F0847D). Die für Calumenin codierende Sequenz abzüglich der Signalsequenz wurde durch PCR amplifiziert und mit Hilfe von Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *NotI* in einen pGEX-4T-TEV-804 Vektor kloniert. GST-Calumenin lag nach der Synthese in *E. coli* in löslicher Form vor (Abb. 3.16.B., C. und D.) und wurde nach einer Umpufferung in PBS + 0,65% CHAPS und einem Konzentrationsabgleich mit Rinder Serum Albumin direkt für die nachfolgenden Versuche verwendet.

Die beiden Western Blots (Abb. 3.16.C. und D.) mit Antikörpern gegen Calumenin bzw. GST zeigten nur für α -GST verstärkten Abbau; α -Calumenin zeigte hingegen kaum Abbau. Es wurde daher keine weitere Reinigung des GST-Calumenin vorgenommen. Es wurde bei einem Reaktionsvolumen von 3 l bei der Synthese in *E. coli* ca. 6,5 mg Protein synthetisiert. Das RTS 100-System synthetisierte ca. 0,57 μ g Protein aus 12 μ l Reaktionslösung.

Im direkten Vergleich war die Synthese-Leistung des RTS 100-Systems gegenüber dem *E. coli* System besser. Allerdings arbeitet das RTS 100-System im Vergleich zu der Synthese in *E. coli* nicht zufriedenstellend. Das im RTS 100-System hergestellte Protein zeigte nicht die gleiche Funktionalität wie das Protein aus einem GST basierenden Systems. Die Abspaltbarkeit des GST-„tags“ durch die TEV-Protease war ein weiterer Grund für die Verwendung des GST-Fusionsprotein von Calumenin in allen nachfolgenden Versuchen.

A



B

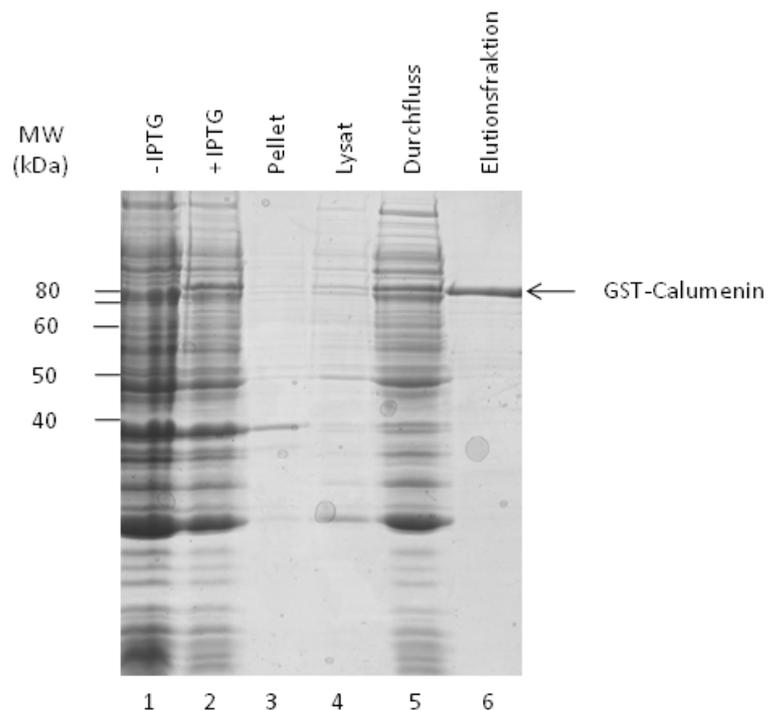


Abb. 3.16. Synthese der rekombinanten Fusionsproteine von Calumenin

A. Synthese von Calumenin-His₆ im RTS 100 System.

Dem RTS 100 System wurde das Plasmid pIVEX-Calumenin-His₆ zugegeben und für 4 h bei 250 Upm und 30°C inkubiert. Das synthetisierte Protein wurde aus dem Reaktionsgefäß entfernt und eine Laemmli-Probe *via* SDS-PAGE und PhosphoImaging auf Synthese analysiert.

B. Synthese von GST-Calumenin in *E. coli*.

Rosetta pLys *E. coli*-Zellen wurden mit dem Plasmid pGEX-4T-TEV-804-Calumenin transformiert und bei 37°C und 250 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert (Spur „- IPTG“). Es wurde dann bei einer Temperatur von 25°C für ÜN mit 0,08 M IPTG induziert. Nach Ende der Induktion (Spur „+ IPTG“) wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5.000 Upm und 4°C für 10 min geerntet. Die Zellen wurden durch Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile der Suspension wurden durch Zentrifugation abgetrennt (Spur „Pellet“). Das Lysat wurde auf eine GSH-Sepharose-Säule gegeben und mit PBSKMT gewaschen und mit red. GHS eluiert (Spuren „Lysat“, „Durchfluss“ und „Fraktionen der Elution“).

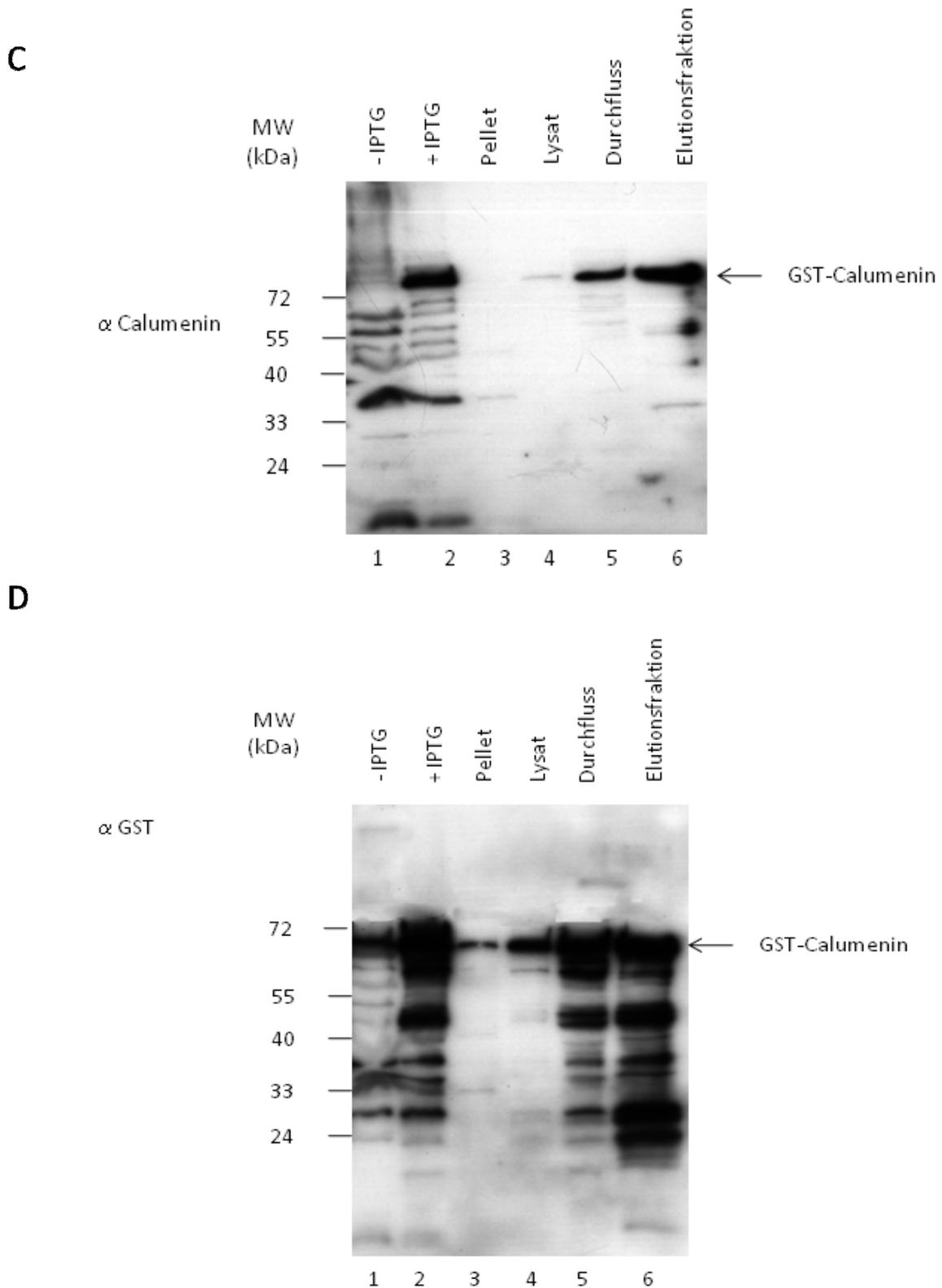


Abb. 3.16. Synthese der rekombinanten Fusionsproteine von Calumenin

C. und D. Kontrolle der Synthese mit dem α -344 Antikörper sowie dem α -GST Antikörper.

Zur Kontrolle des gegen Calumenin gerichteten Antikörpers sowie als Kontrolle auf die Expression wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit α -Calumenin (1:1000) sowie in einer Nachdekoration mit α -GST (1:1000). Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem und Röntgenfilmen visualisiert.

3.2.4. Funktion von GST-Calumenin

3.2.4.1. GST-Calumenin interagiert Ca^{2+} -unabhängig mit Sec63p

Wie schon durch Tyedmers *et al.* (2005) gezeigt, co-immunpräzipitiert Calumenin mit Sec63p. Da Sec63p über putative Bindestellen für Calmodulin (ein EF-Hand-Protein des Cytosols) verfügt (Abb. 3.19.C.), stellte sich die Frage, ob Calumenin ebenfalls Ca^{2+} -abhängig mit diesen Bindestellen interagiert. Besonders interessant war hier jedoch die mögliche Interaktion von Calumenin und Sec63p über die putative Bindestelle in der luminalen J-Domäne des Sec63p.

Zu diesem Zweck wurde GST-Calumenin an GSH-Sepharose immobilisiert und mit RM Extrakt in Anwesenheit von 1 mM Ca^{2+} oder 4 mM EGTA (einem Chelator von Ca^{2+}) in verschiedenen Puffern (CCP200 bzw. TBS) inkubiert. Der Extrakt aus Hundepankreas-Mikrosomen wurde durch Solubilisierung der rauen Mikrosomen und anschließende Abtrennung von Membranbestandteilen durch Zentrifugation hergestellt (vgl. 2.3.1.). Unspezifisch bindendes Protein wurde durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt. Die gebundenen Proteine wurden daraufhin mit Laemmli-Probenpuffer eluiert. Die Elutionsproben sowie die Überstände mit ungebundenem Protein wurden *via* SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (siehe Abb. 3.17.A.) oder *via* Western Blot analysiert (Abb. 3.17.B.). Bei Betrachtung des gebundenen Materials in den Spuren 1 bis 6 ist zu erkennen, dass in An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} verschiedene Proteine unabhängig vom eingesetzten Puffer an das immobilisierte GST-Calumenin band. Eine Kontrolle des „pulldown“-Experiments auf Ebene des Western Blots zeigte ebenfalls eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung von Sec63p an GST-Calumenin (Abb. 3.17.B.). Hier zeigte sich vor allem in Spur 4 in TBS sowie etwas schwächer in Spur 1 in CCP200 eine deutliche Bindung von Sec63p an GST-Calumenin. Die Abnahme der Proteinmenge in Spur 12 hingegen lässt auf einen unvollständigen Auftrag des Durchflusses erklären. Die Kontrollen mit GST mit CCP200 Puffer in An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} (Abb. 3.17.C. und D.) zeigten kein gebundenes Sec63p aus RM-Extrakt (Spuren 1, 3). Dies wurde wiederum auf Western Blot-Ebene besser sichtbar. Sec63p bindet daher nicht an die GST-Kontrolle.

Die Bindung von Sec63p aus dem RM-Extrakt an Calumenin war im Ganzen sehr schwach (Abb. 3.17. Spur 4). Es deutet hier alles auf eine schwache indirekte Interaktion von Calumenin un Sec63p hin. Um eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen zu erkennen wurde daher ein Versuch durchgeführt, bei dem Fusionsproteine des Sec63p an GSH vorgebunden wurden und Calumenin ohne „tag“ als Bindungspartner benutzt wurde.

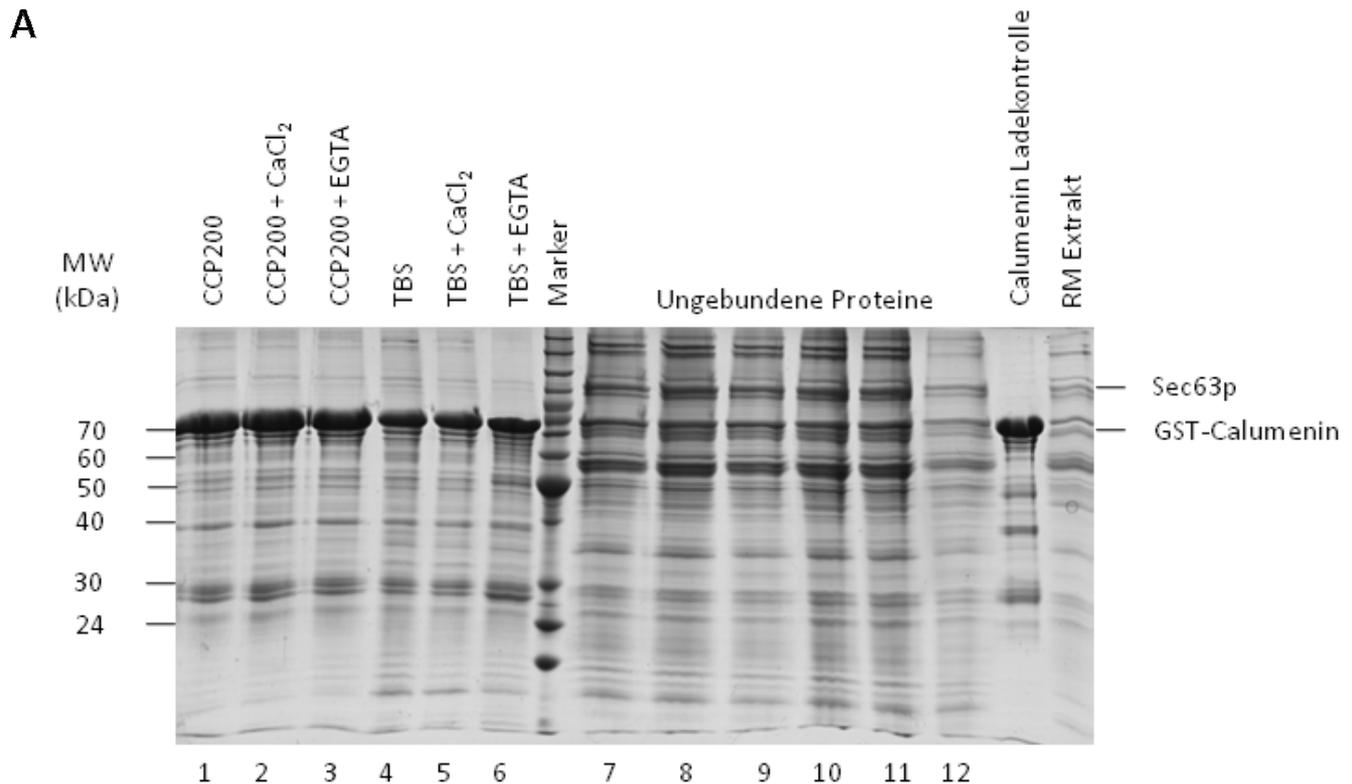


Abb. 3.17. GST-Calumenin interagiert Ca²⁺-unabhängig mit Sec63.

A. Pro Ansatz wurden 30 µl GSH-Sepharose mit 30 µg GST-Calumenin (Spur 1 bis 4) in CCP200 bzw. TBS +/- CaCl₂ für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit CCP200 bzw. TBS +/- CaCl₂ gewaschen. Die immobilisierten Proteine wurden dann in Anwesenheit von 1 mM CaCl₂ oder 4 mM EGTA mit 50 µl RM-Extrakt (vgl. 2.3.1.) und CCP0 in An-/Abwesenheit von CaCl₂ sowie 0,65% CHAPS für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme der Überstände (Spur 7 bis 12) wurde nicht gebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit CCP200 bzw. TBS in An-/Abwesenheit von CaCl₂ entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 30 µl Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Proben der Überstände und den Elutionen wurden jeweils 10 µl mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

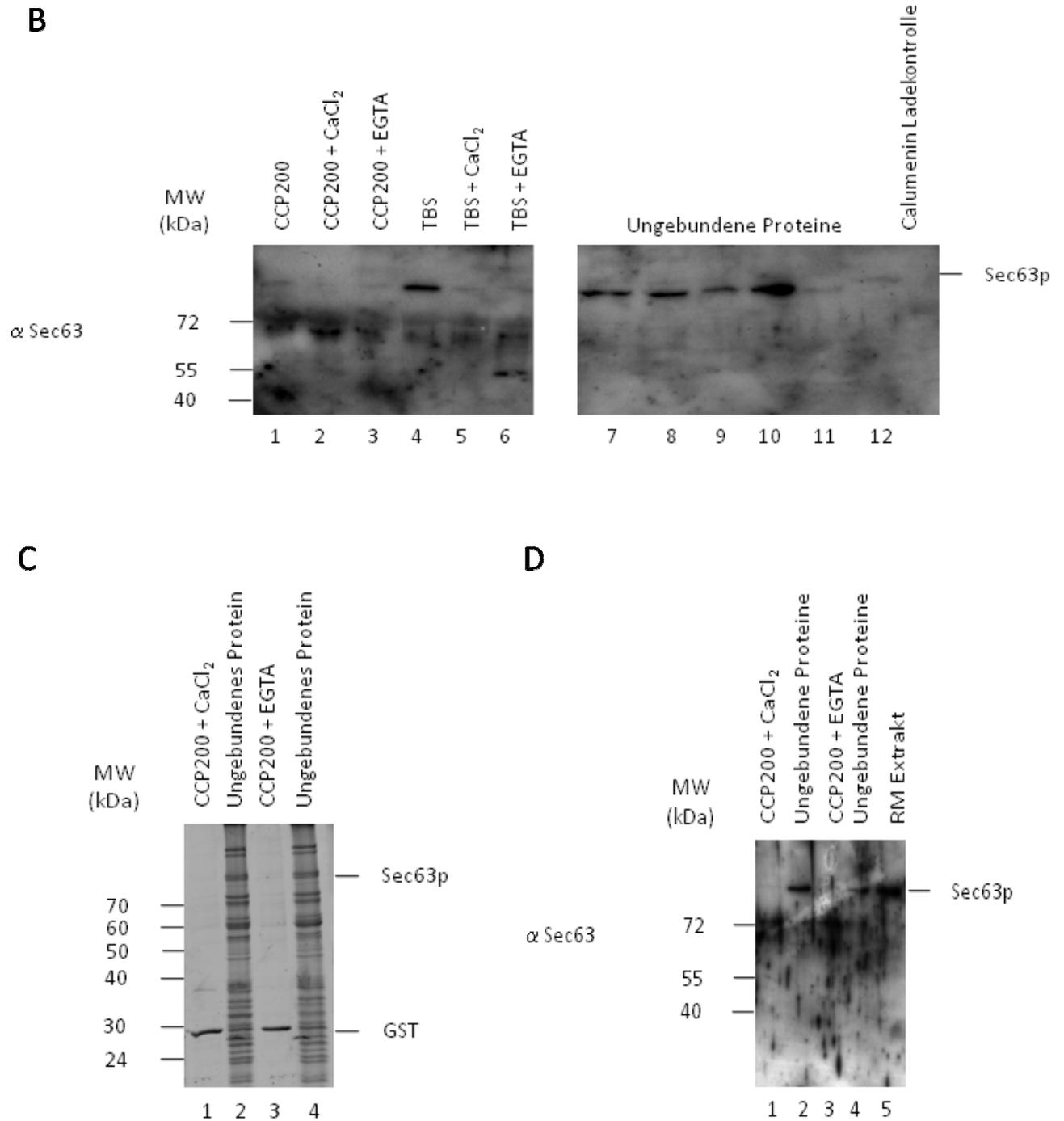


Abb. 3.17. GST-Calumenin interagiert Ca^{2+} -unabhängig mit Sec63.

B. Western Blot der Proben aus Ansatz A. mit α -286. Von den Überständen und den Elutionen wurden jeweils 10 μl mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer immunologischen Detektion mit einem α -Sec63-Antikörper und einem POD-Ziege-anti-Kaninchen Antikörper unterzogen. Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem auf Röntgenfilmen visualisiert.

C. GST-Kontrolle zu A. mit CCP200 als Puffer +/- CaCl_2 .

D. GST-Kontrolle zu B. mit CCP200 als Puffer +/- CaCl_2 .

3.2.4.2. TEV Protease gespaltenes Calumenin interagiert Ca^{2+} -unabhängig mit GST-Sec63-C-Terminus

Zur Bestätigung des vorangegangenen Ergebnisses wurde die Interaktion von rekombinant in *E. coli* synthetisierter GST-Sec63 J-Domäne bzw. GST-Sec63 C-Terminus mit TEV-Protease gespaltenem GST-Calumenin (vgl. 2.3.2.5.) untersucht.

Zu diesem Zweck wurden GST-Sec63 J-Domäne, GST-Sec63 C-Terminus bzw. GST an GSH-Sepharose immobilisiert. Die Bindung von Calumenin als lumenalem ER-Protein sollte nach der Literatur (Ozawa und Muramatsu, 1993; Weis *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1996; Koivu *et al.*, 1997; Yabe *et al.*, 1997; Vorum *et al.*, 1998; Yabe *et al.*, 1998; Hseu *et al.*, 1999; Vorum *et al.*, 1999) an dem lumenalen Teil des Sec63p erfolgen, daher wurde sowohl GST-Sec63 J-Domäne (lumenaler Anteil des Sec63p) als auch GST-Sec63 C-Terminus (Kontrolle, cytosolischer Anteil des Sec63p) für den „pulldown“ herangezogen. Beide Fusionsproteine wurden mit dem Produkt der Proteolyse des GST-Calumenins durch die TEV-Protease (Calumenin) in Anwesenheit von 1 mM Ca^{2+} oder 4 mM EGTA in CCP200 inkubiert. Unspezifisch bindendes Protein wurde durch Waschen von der GSH-Sepharose entfernt. Die gebundenen Proteine wurden daraufhin mit Laemmli-Probenpuffer eluiert. Die Elutionsproben sowie die Überstände mit ungebundenem Protein wurden *via* SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (siehe Abb. 3.18.A.) bzw. *via* Western Blot analysiert (Abb. 3.18.B). Bei Betrachtung des gebundenen Materials in den Spuren 1 bis 6 ist zu erkennen, dass in An- oder Abwesenheit von Ca^{2+} Calumenin an die immobilisierten GST-Fusionsproteine band. Es zeigte sich, dass Calumenin in Anwesenheit von CaCl_2 (Spur 1) sowie EGTA (Spur 3) nicht nur an die J-Domäne des Sec63p bindet, sondern auch an den C-Terminus des Sec63p (Spuren 2 und 5). Eine Bindung von Calumenin an die GST-Kontrolle war ebenfalls zu beobachten und die Kontrolle des „pulldown“ Experiments auf Ebene des Western Blots zeigte eine deutliche Bindung von Calumenin in Anwesenheit von CaCl_2 oder EGTA (Abb. 3.18.B.) an GST-Sec63p C-Terminus, wobei die Bindung mit CaCl_2 stärker erschien. Die GST-Kontrolle zeigte ebenfalls eine Bindung mit EGTA. GST-Sec63p J-Domäne zeigte keinerlei Bindung im Western Blot. Es kam zudem im Western Blot zu Kreuzreaktionen des anti-Calumenin Antikörpers mit der J-Domäne wie des C-Terminus des Sec63p. Weshalb diese Reaktion auftrat ist nicht erklärbar. Zudem zeigte sich eine unspezifische Bindung oberhalb von Calumenin.

Calumenin scheint in Anbetracht dieser Ergebnisse Ca^{2+} -unabhängig an GST-Sec63p C-Terminus aber auch an GST zu binden. Da die Ergebnisse des vorangegangenen Versuches (3.2.4.1.) eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung von Calumenin an Sec63p andeuten, sollte eine weitere Methode benutzt werden, um eine mögliche Bestätigung der Interaktion von Calumenin mit Sec63p zu erhalten.

A

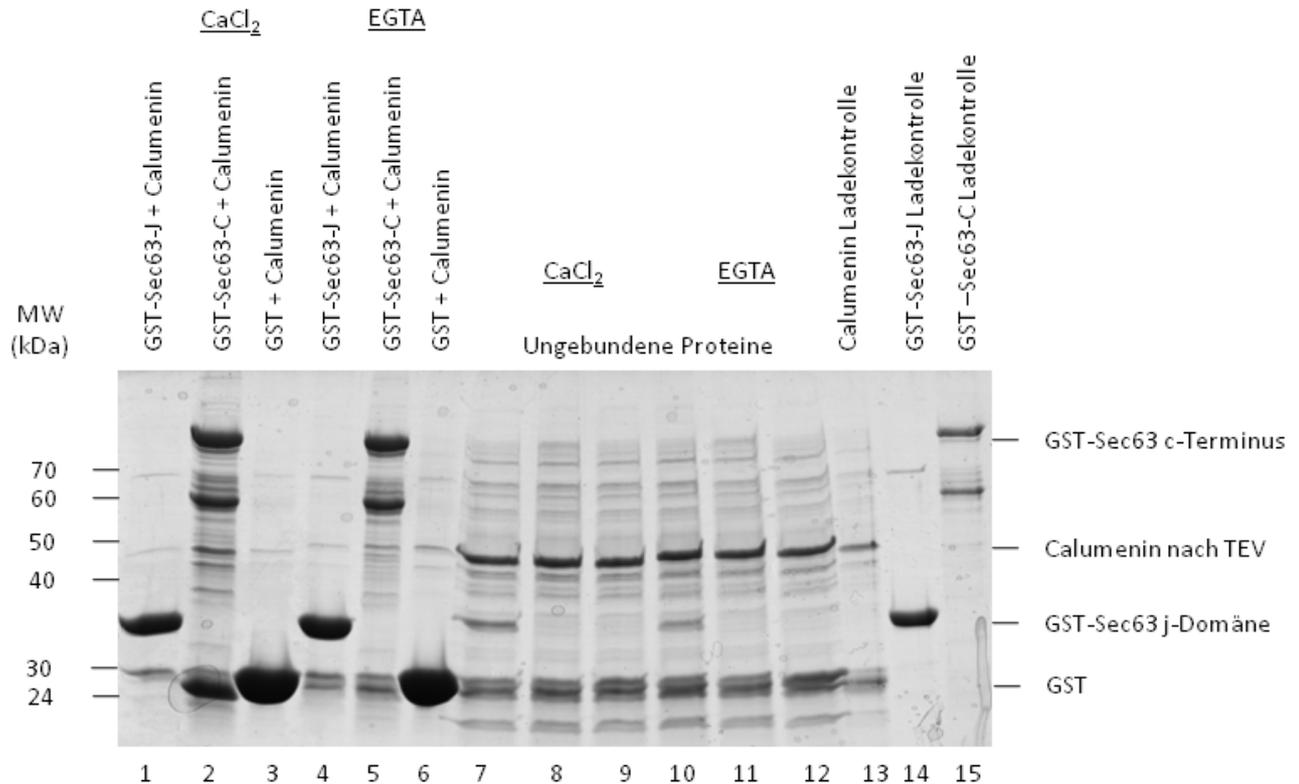


Abb. 3.18. GST-Sec63 J-Domäne bzw. GST-Sec63 C-Terminus interagiert mit Calumenin.

A. Pro Ansatz wurden 30 μl GSH-Sepharose mit 30 μg GST-Sec63 J-Domäne (Spur 1, 4), GST-Sec63 C-Terminus (Spur 2, 5) oder GST (Spur 3, 6) für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit CCP200 +/- CaCl_2 gewaschen. Die immobilisierten Proteine wurden dann in An- oder Abwesenheit von 1 mM CaCl_2 oder 4 mM EGTA mit 15 μg TEV gespaltenem Calumenin (vgl. 2.3.2.5.) und CCP200 +/- CaCl_2 für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme der Überstände (Spur 7 bis 12) wurde nicht gebundenes Material durch dreimaliges Waschen mit CCP200 +/- CaCl_2 entfernt. Die Elution erfolgte durch eine Inkubation mit 30 μl Laemmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C. Von den Proben der Überstände und den Elutionen wurden jeweils 10 μl mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

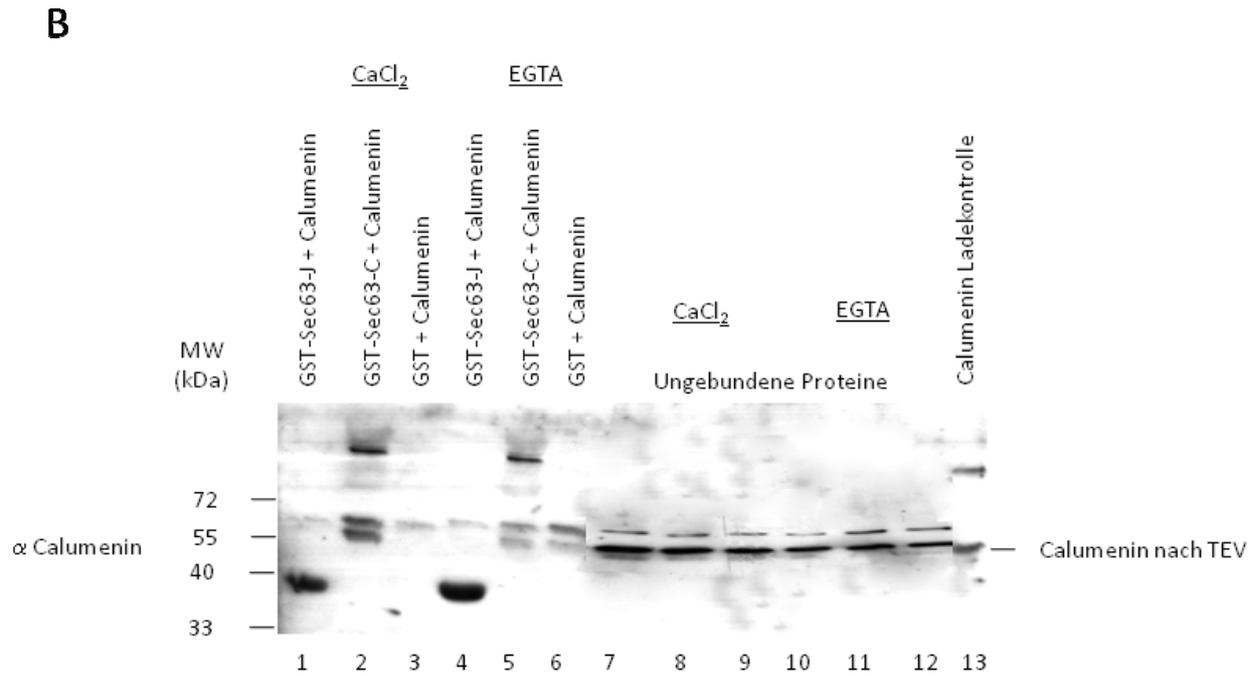


Abb. 3.18. GST-Sec63 J-Domäne bzw. GST-Sec63 C-Terminus interagiert mit Calumenin.

B. Western Blot der Proben aus Ansatz A. mit α -344. Von den Überständen und den Elutionen wurden jeweils 10 μ l mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer immunologischen Detektion mit einem α -Calumenin-Antikörper unterzogen. Die Antikörpersignale wurden mit dem ECL-Detektionssystem auf Röntgenfilmen visualisiert.

3.2.4.3. [¹⁴C] markiertes GST-Calumenin interagiert mit den putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p

Aufgrund der in den vorigen Abschnitten nicht genau zu klärenden Interaktion des Calumenins sollte im Folgenden eine alternative Methode genutzt werden, um die Frage zu beantworten, ob Calumenin direkt mit Sec63p interagiert. Hierbei sollte überprüft werden, an welche Peptidmotive innerhalb des Sec63p Calumenin bindet (Abb. 3.19.C.; Tabelle 3.2.). Hierzu wurden die putativen Bindestellen des cytosolischen, Calcium-bindenden EF-Hand-Proteins Calmodulin herangezogen, für das bereits eine Interaktion mit der Sec61p-Untereinheit des Translokonkomplexes nachgewiesen wurde (Erdmann, Dissertation, 2009). Calmodulin stellte somit eine Kontrolle für die nachfolgenden Bindungsversuche mit Calumenin dar. Für die Untersuchung der Interaktion war vor allem die Interaktion zwischen Calumenin und dem putativen Bindemotiv der J-Domäne des Sec63p wichtig.

3.2.4.3.1. [¹⁴C] markiertes GST-Calumenin und GST-Calmodulin binden in Anwesenheit von CaCl₂ an verschiedene putative Calmodulin-Bindemotive

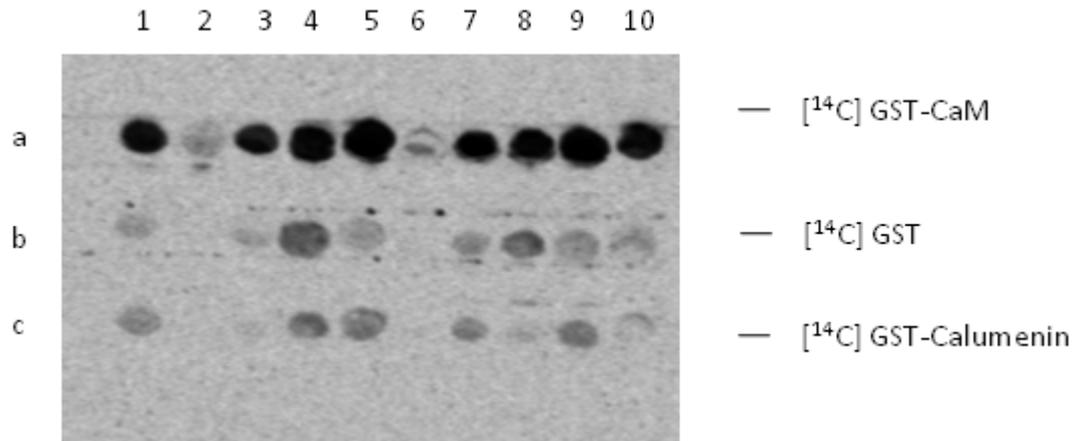
Ein erster Schritt für die Untersuchung der Interaktion zwischen Calumenin und der Peptidbindestellen des Sec63p war der Nachweis einer Bindung von GST-Calumenin an verschiedene putative Calmodulin-Bindestellen aus diversen ER-Membranproteinen. Dafür wurden Peptidfilter mit 10 verschiedenen Peptidsequenzen hergestellt (vgl. Tab. 3.2.). Sieben dieser Sequenzen entsprechen hierbei Calmodulin-Bindestellen aus dem Sec61p (Tab. 3.2. und Abb. 3.19., 1 und 2) sowie aus dem Sec63p (Tab. 3.2. und Abb. 3.19., 4 bis 7).

Für den Versuch wurde GST-Calumenin über eine NAP5-Säule in PBS umgepuffert und mit [¹⁴C] markiert (vgl. 2.4.12.1.). Die Peptidfilter wurden in MeOH aktiviert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und für 3 h in Bindungspuffer mit CaCl₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Peptidfilter für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS blockiert, wiederum mit H₂O_{dest.} gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 30.000 cpm des [¹⁴C]-markierten GST-Calumenins, GST-Calmodulin (Positiv-Kontrolle) oder GST (Negativ-Kontrolle) in Bindungspuffer mit CaCl₂ inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Peptidfilter bei Raumtemperatur getrocknet und einer Analyse mittels „PhosphoImaging“ und der ImageQuant-Software unterzogen.

Die geschwärzten Peptidspots zeigten eine Interaktion zwischen den Fusionsproteinen und den putativen Bindestellen an (Abb. 3.19.A.). Wie aus den Spots erkennbar wird, zeigten Calumenin und GST eine schwache Interaktion mit den Peptidspots, wohingegen Calmodulin eine sehr starke Interaktion mit den Peptidspots zeigte. Von den in ImageQuant quantifizierten Werten der Peptidspots wurde die GST-Kontrolle subtrahiert, die Werte auf das jeweilige Maximum der Wertereihe normiert und als Säulendiagramm dargestellt (Abb. 3.19.B.). Aus dem Säulendiagramm (Abb. 3.19.B) lässt sich ersehen, dass eine vergleichbare Bindung der [¹⁴C] markierten Fusionsproteine an die Peptidspots 1, 5, 6, und 9 erfolgte. Der Peptidspot 5 war hier besonders wichtig, da der Spot der J-Domäne des Sec63p zugeordnet werden kann. GST-Calmodulin interagierte zudem mit den Peptidspots 2, 3, 4, 7, 8 und 10. Die Bindung der beiden Fusionsproteine an die Peptidspots 2 und 6 war allerdings sehr schwach. Die Interaktion von Calumenin mit dem Peptidspot 9, dem C-Terminus des ERj1p, war ebenfalls kaum vorhanden. Korrelierte man die Peptidspot-Sequenzen mit den Ergebnissen des Säulendiagramms wie mit den Sequenzen der einzelnen Proteine wie Sec61p, Sec62p, Sec63p und ERj1p, so konnte man eine topographische Aufteilung der Bindungsmotive erstellen (Abb. 3.19.C.). In Bezug auf die Lokalisierung Calumenins im Lumen des ERs war daher die Interaktion mit den lumenalen Bindemotiven der ER-Proteine wichtig. Es konnte allerdings nur eine Bindung von GST-Calmodulin wie von GST-Calumenin an das lumenale Bindemotiv des Sec63p (Peptidspot 5) nicht aber an das des Sec61p α (Peptidspot 2) nachgewiesen werden. Beide Fusionsproteine wiesen zudem eine Interaktion mit dem cytosolischen Teil des Sec61p α (Peptidspot 1) auf.

Die Bindung der Fusionsproteine an Peptidsequenzen aus den beiden Sec-Proteinen ist wichtig, da angenommen wird, dass über sie die Regulation des Calcium-Leckstroms erfolgt. Insgesamt gesehen interagierte Calumenin mit vier putativen Calmodulin-Bindestellen, was in Sicht auf die strukturelle Ähnlichkeit der beiden EF-Hand-Proteine für einen ähnlichen Mechanismus spricht. In Sicht auf die hier gewonnenen Ergebnisse, ließ sich eine ähnliche Bindung von Calumenin und Calmodulin an drei ER-Proteine feststellen: Sec61p α , Sec63p und ERj1p. Besonders wichtig war hier die Interaktion von Calumenin mit der J-Domäne des Sec63p (Spot 5). In einem nächsten Schritt sollte nun das gesamte Sec63p auf eine Interaktion mit Calumenin und Calmodulin in Anwesenheit von CaCl₂ sowie im Falle von Calumenin mit EGTA untersucht werden. Dadurch sollte ein besseres Bild der Interaktion der beiden Fusionsproteine vor allem von Calumenin mit Sec63p generiert werden.

A



B

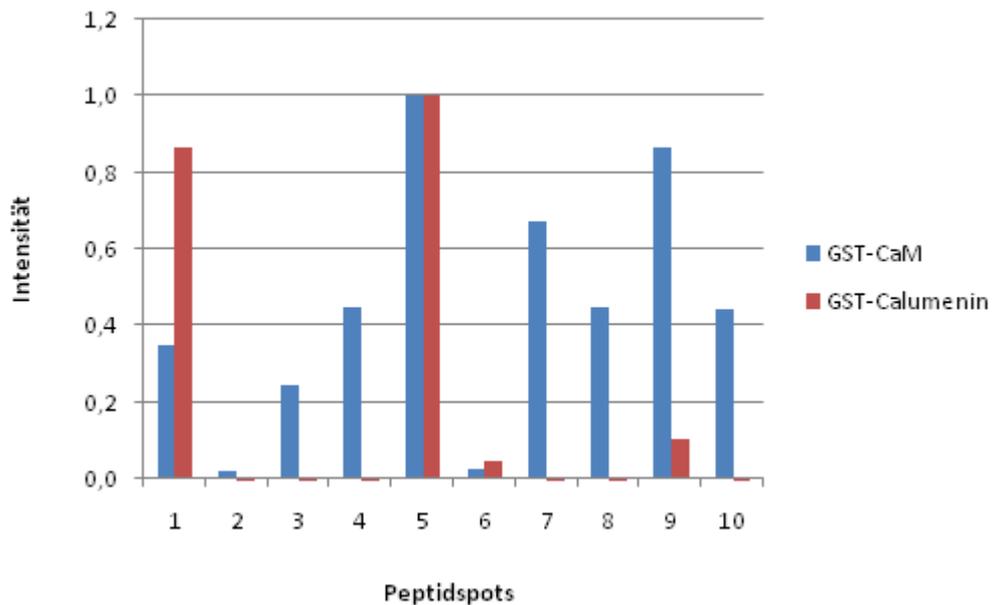


Abb. 3.19. Bindung von [¹⁴C] markiertem GST-Calumenin und GST-Calmodulin an verschiedene putative Calmodulin-Bindemotive.

A. Peptidfilter wurden in MeOH aktiviert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und für 3 h in Bindungspuffer mit CaCl₂ inkubiert. Nach Inkubation wurde für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS blockiert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 30.000 cpm des [¹⁴C] markierten GST-Calumenin, GST-Calmodulin (Positiv-Kontrolle) oder GST (Negativ-Kontrolle) in Bindungspuffer mit CaCl₂ inkubiert. Nach einem weiterem Waschschritt wurden die Peptidfilter bei Raumtemperatur getrocknet und einer Analyse mittels „PhosphoImaging“ und der ImageQuant-Software unterzogen.

B. Darstellung der Spots der Peptidfilter für GST-Calmodulin und GST-Calumenin. Gezeigt werden die auf die jeweiligen Maxima normierten Werte. Der Hintergrund in Form der GST-Werte ist von den Werten für GST-Calmodulin und GST-Calumenin bereits subtrahiert.

C

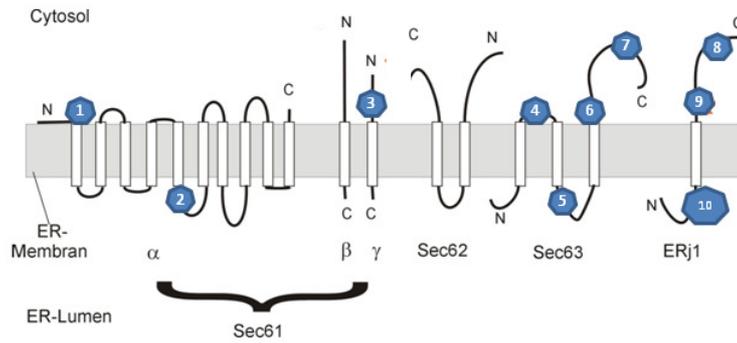


Abb. 3.19.

C. Topographische Übersicht der eingesetzten Peptidsequenzen nach Julia Benedix (Diplomarbeit, 2006).

Tabelle 3.2. Übersicht der Bindung von [¹⁴C] markiertem GST Calmodulin bzw. [¹⁴C] markierte GST-Calumenin an putative Calmodulin-Bindestellen diverser ER-Proteine. + = Bindung; - = keine Bindung.

Spot	Peptidsequenz	Protein	Ort	Bindung von [¹⁴ C] GST-Calmodulin	Bindung von [¹⁴ C] GST-Calumenin
1	IQKPERKIQFKEKV	Secd61p α	Cytosolisch	+	+
2	ATRTDKVRALREAFYQR	Sec61p α	Lumenal	-	-
3	KPDRKEFQKIAMAT	Sec61p γ	Cytosolisch	+	-
4	LKNIRKVYGRMCMWYR	Sec63p	Cytosolisch	+	-
5	TVAEIKKQYRLLSLKYHP	Sec63p	Lumenal	+	+
6	WWYRSIRYSGDQILIRT	Sec63p	Cytosolisch	-	-
7	EEREHKKYKIKTIQDLV	Sec63p	Cytosolisch	+	-
8	QPVFYYRRVRKMSNAEL	ERj1p	Cytosolisch	+	-
9	KQKKVKVKKPKPEFP	ERj1p	Cytosolisch	+	?
10	LELALQQYPKGASDRWDKIAK	ERj1p	Lumenal	+	-

3.2.4.3.2. [¹⁴C] markiertes GST-Calumenin bindet Ca²⁺ unabhängig an Peptide aus dem Sec63p

Um ein genaueres Bild der Interaktion von Calumenin mit den putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p zu erhalten, wurden Peptidfilter mit der gesamten Sequenz des Sec63p hergestellt (Abb. 3.20. und 3.21., putative Bindestelle in roter Schrift). Besonders wichtig im Zusammenhang mit der Interaktion von Calumenin und Sec63p war die Ca²⁺-Abhängigkeit der Interaktion von Calumenin mit der putativen Calmodulin-Bindestelle der J-Domäne des Sec63p. Über diese Interaktion sollte eine Regulierung des Calcium-Leckstroms des ER möglich sein.

Für den Versuch wurde GST-Calumenin über eine NAP5-Säule in PBS umgepuffert und mit [¹⁴C] markiert (vgl. 2.4.12.1.). Die Peptidfilter wurden in MeOH aktiviert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und für 3 h in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Peptidfilter für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS blockiert, wiederum mit H₂O_{dest.} gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 30.000 cpm des [¹⁴C] markierten GST-Calumenin, GST-Calmodulin (Positiv-Kontrolle) oder GST (Negativ-Kontrolle) in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Peptidfilter bei Raumtemperatur getrocknet und einer Analyse mittels „PhosphoImaging“ und der ImageQuant-Software unterzogen.

Um eine bessere Auswertung der Daten zu erreichen, wurden die positiven Peptidspots farblich markiert (Abb. 3.22.). Dies ermöglichte ein schnelleres Auffinden der zu korrelierenden Daten (Abb. 3.21. und 3.23. bis 3.26.). Die geschwärzten Peptidspots zeigten auch hier eine Interaktion zwischen den Fusionsproteinen und den putativen Bindestellen an (3.23.A. bis D.). Aus den Spots wurde erkennbar, dass Calumenin und Calmodulin eine ähnliche Interaktion mit den Peptidspots zeigten. Von den in ImageQuant quantifizierten Werten der Peptidspots wurde die GST-Kontrolle subtrahiert, die Werte auf das jeweilige Maximum der Wertereihe normiert und als Säulendiagramm dargestellt (Abb. 3.24. bis 3.26.). Aus dem Vergleich der Säulendiagramme lässt sich ersehen, dass eine Bindung von [¹⁴C] GST-Calumenin an die gleichen Bindestellen wie [¹⁴C] GST-Calmodulin (Abb. 3.24. bis 3.26.) erfolgt. Es wurden verschiedene Interaktionen in der Auswertung erkennbar:

1. die Ca^{2+} unabhängige Interaktion des GST-Calumenins mit den putativen Calmodulin Bindemotiven (Abb. 3.25. und 3.26.); es zeigte sich hier ein vergleichbares Bindungsmuster für EGTA wie für Calcium in den Säulendiagrammen. Die Positiv-Kontrolle mit GST-Calmodulin zeigte ebenfalls eine Bindung an alle putativen Bindemotive.

2. die Bindung der Fusionsproteine an zwei nicht charakterisierte Bereiche (55 - 67 bzw. 91 – 93, vgl. violette bzw. schwarze Markierung der Abb. 3.21. – 3.26.) mit der Ausnahme von Calumenin in CaCl_2 -Puffer, da hier Calumenin nicht an den Bereich 55 – 67 (violett) band;

3. Die Bindung der Fusionproteine an die putative NLS (101 – 109, gelb) und die „coiled coil“ Domäne (121 – 125, rot) des Sec63p und die Bindung an die Sec62p Interaktionsdomäne (134 – 136, nicht gekennzeichnet).

Die Interaktion von [^{14}C] markiertem GST-Calumenin korrelierte mit den Ergebnissen aus 3.2.4.1. und 3.2.4.2., da eine Interaktion bei 1 mM CaCl_2 als auch eine stärkere Interaktion bei 4 mM EGTA nachgewiesen wurde. Ein wichtiges Ergebnis dieses Versuches war mit Sicht auf die Lokalisierung des Calumenins die Bindung von GST-Calumenin an die zweite putative Calmodulin-Bindestelle des Sec63p. Diese Bindestelle liegt auf der lumenalen Seite des Sec63p und fällt mit der J-Domäne des Proteins zusammen. Somit gibt es eine Interaktion der beiden Proteine auf der lumenalen Seite des ERs. Diese Interaktion ist jedoch Ca^{2+} -unabhängig. Die Bindung der Fusionsproteine an die zwei nicht charakterisierten Bereiche (violette und schwarze Markierung) kann mit der Nähe zu putativen Bindemotiven zusammenhängen. Beide Bereiche der Peptidsequenz folgen einem Calmodulin-Bindemotiv und könnten bei der Interaktion des Sec63p mit Calmodulin eine strukturelle Rolle spielen, da sich beide Bereiche im cytosolischen Teil des Sec63p befinden. Die einzige Ausnahme bildete hier der Versuchsteil GST-Calumenin in CaCl_2 -Puffer, da hier im violetten Bereich keine Bindung zu erkennen war. Die Bindung der Fusionsproteine an die putative NLS (gelb), die „coiled coil“ Domäne (rot) sowie die Sec62p Interaktionsdomäne (nicht gekennzeichnet) könnte durch eine von Arginin- und Lysin-Resten vermittelte positive Ladung in diesen Bereichen des Sec63p erfolgen. Solche Interaktionen wären als unspezifisch zu betrachten. Bei der „coiled oil“ Domäne könnte zudem noch eine spezifische Bindung vorliegen, da diese ein IQ RKER Motiv enthält, welches einem IQ-Bindemotiv für Calmodulin ähnelt.

3. Ergebnisse

Sec63p

```

MAGQQFQYDDSGNTFFYFLTSFVGLVIVPATYYLWPRDQNAEQIRLKNIR # potentielle Calmodulin Bs.
KVYGRCMWYRLRLKPKQPNIIPTVKKIVLLAGWALFLFLAYKVSKT DREY #
QEYNPYEVLNLDPGATVAEIKKQYRLLSLKYHPDKGGDEV MFMRIAKAYA # J-Domäne, potentielle
ALTDESRKNWEEFGNPDGPQATSF GIALPAWIVDQKNSILVLLVYGLAF # Calmodulin Bs.
MVLVPPVVGSWWYRSIRYSGDQLIRTTQIYTYFVYKTRNMDMKRLIMVL # potentielle Calmodulin Bs.
AGASEFDPQYNKDATS RPTDNILIPQLIREIGSINLKKNEPPLTCPYSLK
ARVLLSHLARMKIPETLEEDQQFMLKKCPALLQEMVNVICQLIVMARNR
EEREFRAPTLASLENCMKLSQMAVQGLQQFKSPLLQLPHIEEDNLRRVSN
HKKYKIKTIQDLVSLKESDRHTLLHFLEDEKYEEMAVLGSFPYVTMDIK # potentielle Calmodulin Bs.
SQVLDEDSNNITVGS LVTVLV KLTRQTMAEVFEKEQSICAAEEQPAEDG
QGETNKNRTKGGWQQKSKGPKKTAKSKKKKPLKKKPTVLLPQSKQKQK # putative NLS
QANGVVGNEAAVKEDEEEVSDKGSDEEEETNRDSQSEKDDGSDRDSRE
QDEKQNKDDEAEWQELQSQSIQRKERALLETKSITHPVSYLYFPEEKQEW # putative „coiled coil“ Domäne
WWLYIADRKEQTLISMPYHVCTLKDTEEVELKFPAPGKPGNYQYTVFLRS
DSYMGDLQIKPLKLEVHEAKVPENHPQWDTAIEGDEDQEDSEGFEDSFE # Sec62p Interaktionsdomäne
EEEEEEEDDD
.end

```

Abb. 3.20. Darstellung der strukturellen Charakteristika des Sec63p.

kennzeichnet die Transmembran-Domänen des Sec63p. Die putativen Bindestellen für Calmodulin sind rot markiert. IQRKER ähnelt einem IQ-Bindemotiv für Calmodulin.

```

1 M A G Q Q F Q Y D D S G N T F F Y F L T
2 F Q Y D D S G N T F F Y F L T S F V G L
3 S G N T F F Y F L T S F V G L I V I P A
4 F Y F L T S F V G L I V I P A T Y Y L W
5 S F V G L I V I P A T Y Y L W P R D Q N
6 I V I P A T Y Y L W P R D Q N A E Q I R
7 T Y Y L W P R D Q N A E Q I R L K N I R
8 P R D Q N A E Q I R L K N I R K V Y G R
9 A E Q I R L K N I R K V Y G R C M W Y R
10 L K N I R K V Y G R C M W Y R L R L L K
11 K V Y G R C M W Y R L R L L K P Q P N I
12 C M W Y R L R L L K P Q P N I I P T V K
13 L R L L K P Q P N I I P T V K K I V L L
14 P Q P N I I P T V K K I V L L A G W A L
15 I P T V K K I V L L A G W A L F L F L A
16 K I V L L A G W A L F L F L A Y K V S K
17 A G W A L F L F L A Y K V S K T D R E Y
18 F L F L A Y K V S K T D R E Y Q E Y N P
19 Y K V S K T D R E Y Q E Y N P Y E V L N
20 T D R E Y Q E Y N P Y E V L N L D P G A
21 Q E Y N P Y E V L N L D P G A T V A E I
22 Y E V L N L D P G A T V A E I K K Q Y R
23 L D P G A T V A E I K K Q Y R L L S L K
24 T V A E I K K Q Y R L L S L K Y H P D K
25 K K Q Y R L L S L K Y H P D K G G D E V
26 L L S L K Y H P D K G G D E V M F M R I
27 Y H P D K G G D E V M F M R I A K A Y A
28 G G D E V M F M R I A K A Y A A L T D E

```

Abb. 3.21. Übersicht über die Peptidsequenzen des Sec63p Peptidfilters.

Gezeigt werden die Peptidsequenzen der Spots des Sec63p Peptidfilters. Mit roten Buchstaben markiert sind die Sequenzen der putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p. Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots der Peptidfilter.

3. Ergebnisse

```

29 M F M R I A K A Y A A L T D E E S R K N
30 A K A Y A A L T D E E S R K N W E E F G
31 A L T D E E S R K N W E E F G N P D G P
32 E S R K N W E E F G N P D G P Q A T S F
33 W E E F G N P D G P Q A T S F G I A L P
34 N P D G P Q A T S F G I A L P A W I V D
35 Q A T S F G I A L P A W I V D Q K N S I
36 G I A L P A W I V D Q K N S I L V L L V
37 A W I V D Q K N S I L V L L V Y G L A F
38 Q K N S I L V L L V Y G L A F M V I L P
39 L V L L V Y G L A F M V I L P V V V G S
40 Y G L A F M V I L P V V V G S W W Y R S
41 M V I L P V V V G S W W Y R S I R Y S G
42 V V V G S W W Y R S I R Y S G D Q I L I
43 W W Y R S I R Y S G D Q I L I R T T Q I
44 I R Y S G D Q I L I R T T Q I Y T Y F V
45 D Q I L I R T T Q I Y T Y F V Y K T R N
46 R T T Q I Y T Y F V Y K T R N M D M K R
47 Y T Y F V Y K T R N M D M K R L I M V L
48 Y K T R N M D M K R L I M V L A G A S E
49 M D M K R L I M V L A G A S E F D P Q Y
50 L I M V L A G A S E F D P Q Y N K D A T
51 A G A S E F D P Q Y N K D A T S R P T D
52 F D P Q Y N K D A T S R P T D N I L I P
53 N K D A T S R P T D N I L I P Q L I R E
54 S R P T D N I L I P Q L I R E I G S I N
55 N I L I P Q L I R E I G S I N L K K N E
56 Q L I R E I G S I N L K K N E P P L T C
57 I G S I N L K K N E P P L T C P Y S L K
58 L K K N E P P L T C P Y S L K A R V L L
59 P P L T C P Y S L K A R V L L L S H L A
60 P Y S L K A R V L L L S H L A R M K I P
61 A R V L L L S H L A R M K I P E T L E E
62 L S H L A R M K I P E T L E E D Q Q F M
63 R M K I P E T L E E D Q Q F M L K K C P
64 E T L E E D Q Q F M L K K C P A L L Q E
65 D Q Q F M L K K C P A L L Q E M V N V I
66 L K K C P A L L Q E M V N V I C Q L I V
67 A L L Q E M V N V I C Q L I V M A R N R
68 M V N V I C Q L I V M A R N R E E R E F
69 C Q L I V M A R N R E E R E F R A P T L
70 M A R N R E E R E F R A P T L A S L E N
71 E E R E F R A P T L A S L E N C M K L S
72 R A P T L A S L E N C M K L S Q M A V Q
73 A S L E N C M K L S Q M A V Q G L Q Q F
74 C M K L S Q M A V Q G L Q Q F K S P L L
75 Q M A V Q G L Q Q F K S P L L Q L P H I
76 G L Q Q F K S P L L Q L P H I E E D N L
77 K S P L L Q L P H I E E D N L R R V S N
78 Q L P H I E E D N L R R V S N H K K Y K
79 E E D N L R R V S N H K K Y K I K T I Q
80 R R V S N H K K Y K I K T I Q D L V S L
81 H K K Y K I K T I Q D L V S L K E S D R
82 I K T I Q D L V S L K E S D R H T L L H
83 D L V S L K E S D R H T L L H F L E D E
84 K E S D R H T L L H F L E D E K Y E E V
85 H T L L H F L E D E K Y E E V M A V L G

```

Abb. 3.21. Übersicht über die Peptidsequenzen des Sec63p Peptidfilters.

Gezeigt werden die Peptidsequenzen der Spots des Sec63p Peptidfilters. Mit roten Buchstaben markiert sind die Sequenzen der putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p. Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots der Peptidfilter.

3. Ergebnisse

```
86 F L E D E K Y E E V M A V L G S F P Y V
87 K Y E E V M A V L G S F P Y V T M D I K
88 M A V L G S F P Y V T M D I K S Q V L D
89 S F P Y V T M D I K S Q V L D D E D S N
90 T M D I K S Q V L D D E D S N N I T V G
91 S Q V L D D E D S N N I T V G S L V T V
92 D E D S N N I T V G S L V T V L V K L T
93 N I T V G S L V T V L V K L T R Q T M A
94 S L V T V L V K L T R Q T M A E V F E K
95 L V K L T R Q T M A E V F E K E Q S I C
96 R Q T M A E V F E K E Q S I C A A E E Q
97 E V F E K E Q S I C A A E E Q P A E D G
98 E Q S I C A A E E Q P A E D G Q G E T N
99 A A E E Q P A E D G Q G E T N K N R T K
100 P A E D G Q G E T N K N R T K G G W Q Q
101 Q G E T N K N R T K G G W Q Q K S K G P
102 K N R T K G G W Q Q K S K G P K K T A K
103 G G W Q Q K S K G P K K T A K S K K K K
104 K S K G P K K T A K S K K K K P L K K K
105 K K T A K S K K K K P L K K K P T P V L
106 S K K K K P L K K K P T P V L L P Q S K
107 P L K K K P T P V L L P Q S K Q Q K Q K
108 P T P V L L P Q S K Q Q K Q K Q A N G V
109 L P Q S K Q Q K Q K Q A N G V V G N E A
110 Q Q K Q K Q A N G V V G N E A A V K E D
111 Q A N G V V G N E A A V K E D E E E V S
112 V G N E A A V K E D E E E V S D K G S D
113 A V K E D E E E V S D K G S D S E E E E
114 E E E V S D K G S D S E E E E T N R D S
115 D K G S D S E E E E T N R D S Q S E K D
116 S E E E E T N R D S Q S E K D D G S D R
117 T N R D S Q S E K D D G S D R D S D R E
118 Q S E K D D G S D R D S D R E Q D E K Q
119 D G S D R D S D R E Q D E K Q N K D D E
120 D S D R E Q D E K Q N K D D E A E W Q E
121 Q D E K Q N K D D E A E W Q E L Q Q S I
122 N K D D E A E W Q E L Q Q S I Q R K E R
123 A E W Q E L Q Q S I Q R K E R A L L E T
124 L Q Q S I Q R K E R A L L E T K S K I T
125 Q R K E R A L L E T K S K I T H P V Y S
126 A L L E T K S K I T H P V Y S L Y F P E
127 K S K I T H P V Y S L Y F P E E K Q E W
128 H P V Y S L Y F P E E K Q E W W L Y I
129 L Y F P E E K Q E W W L Y I A D R K E
130 E K Q E W W W L Y I A D R K E Q T L I S
131 W W L Y I A D R K E Q T L I S M P Y H V
132 A D R K E Q T L I S M P Y H V C T L K D
133 Q T L I S M P Y H V C T L K D T E E V E
134 M P Y H V C T L K D T E E V E L K F P A
135 C T L K D T E E V E L K F P A P G K P G
136 T E E V E L K F P A P G K P G N Y Q Y T
137 L K F P A P G K P G N Y Q Y T V F L R S
```

Abb. 3.21. Übersicht über die Peptidsequenzen des Sec63p Peptidfilters.

Gezeigt werden die Peptidsequenzen der Spots des Sec63p Peptidfilters. Mit roten Buchstaben markiert sind die Sequenzen der putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p. Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots der Peptidfilter.

3. Ergebnisse

```
138 P G K P G N Y Q Y T V F L R S D S Y M G
139 N Y Q Y T V F L R S D S Y M G L D Q I K
140 V F L R S D S Y M G L D Q I K P L K L E
141 D S Y M G L D Q I K P L K L E V H E A K
142 L D Q I K P L K L E V H E A K P V P E N
143 P L K L E V H E A K P V P E N H P Q W D
144 V H E A K P V P E N H P Q W D T A I E G
145 P V P E N H P Q W D T A I E G D E D Q E
146 H P Q W D T A I E G D E D Q E D S E G F
147 T A I E G D E D Q E D S E G F E D S F E
148 D E D Q E D S E G F E D S F E E E E E E
149 D S E G F E D S F E E E E E E E D D D
150 B      61.0
```

Abb. 3.21. Übersicht über die Peptidsequenzen des Sec63p Peptidfilters.

Gezeigt werden die Peptidsequenzen der Spots des Sec63p Peptidfilters. Mit roten Buchstaben markiert sind die Sequenzen der putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p. Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots der Peptidfilter.

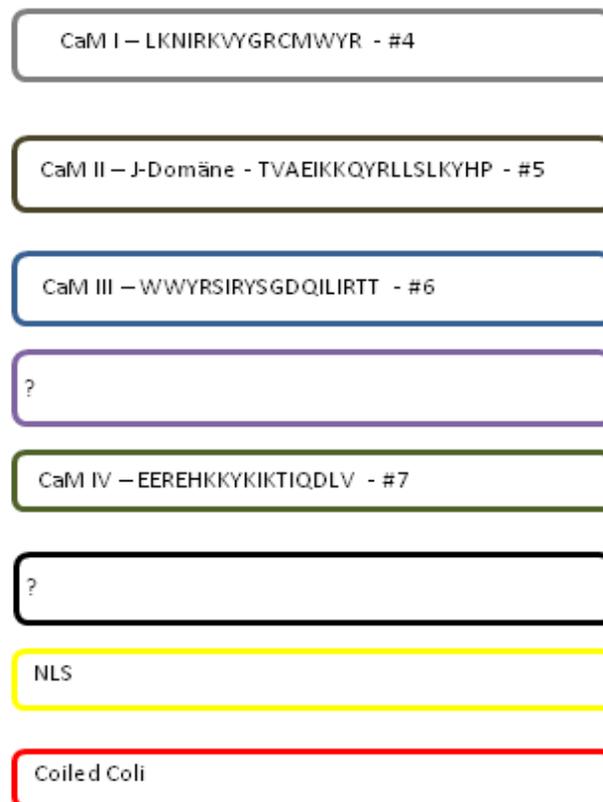


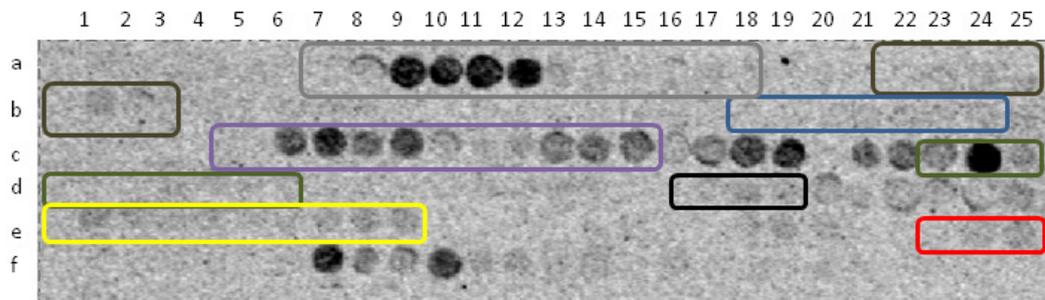
Abb. 3.22. Farbcodierung für die nachfolgenden Abbildungen.

Die einzelnen Farben entsprechen positiven Spots bei dem Bindungsversuch von [¹⁴C] markiertem GST-Calmodulin und GST-Calumenin an Sec63p. Diese Farbcodierung wird auf die Peptidfilter, die Säulendiagramme und die Peptidübersicht des Sec63p angewendet. CaM = putative Calmodulin-Bindestelle I, II, III oder IV, #4 - #7 bezeichnen die Orte der Peptidsequenzen auf dem Sec63p in Zusammenhang mit Abb. 3.19..

A

Peptidfilter – Sec63

Puffer + CaCl₂ 1mM; Bindungsnachweis für ¹⁴C GST



B

Peptidfilter – Sec63

Puffer + CaCl₂ 1mM; Bindungsnachweis für ¹⁴C GST-CaM

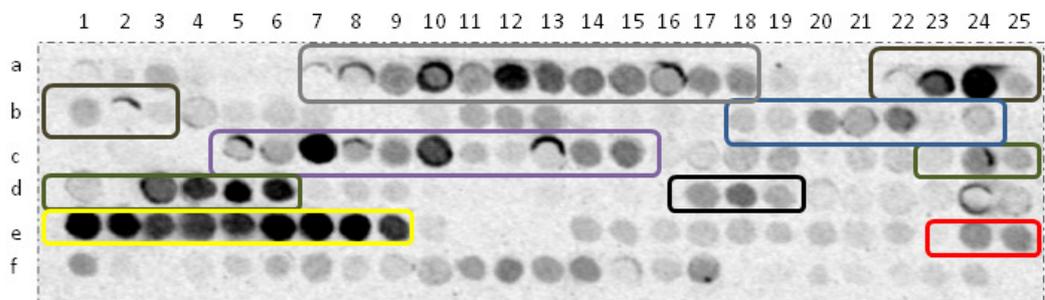


Abb. 3.23. Bindung von [¹⁴C]-markiertem GST, GST-Calmodulin und GST-Calumenin an Sec63p. Peptidfilter wurden in MeOH aktiviert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und für 3 h in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA inkubiert. Nach Inkubation wurde für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS blockiert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 30.000 cpm des [¹⁴C]-markierten GST-Calumenin, GST-Calmodulin (Positiv-Kontrolle) oder GST (Negativ-Kontrolle) in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA inkubiert. Nach einem weiterem Waschschrift wurden die Peptidfilter bei Raumtemperatur getrocknet und einer Analyse mittels „PhosphoImaging“ und der ImageQuant-Software unterzogen.

A. [¹⁴C] markiertes GST + CaCl₂ Puffer

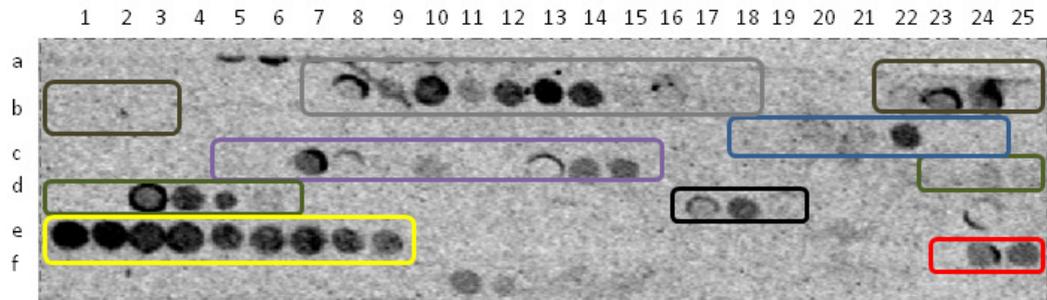
B. [¹⁴C] markiertes GST-Calmodulin + CaCl₂ Puffer

3. Ergebnisse

C

Peptidfilter – Sec63

Puffer + CaCl₂ 1mM; Bindungsnachweis für ¹⁴C GST-Calumenin



D

Peptidfilter – Sec63

Puffer + EGTA 4mM; Bindungsnachweis für ¹⁴C GST-Calumenin

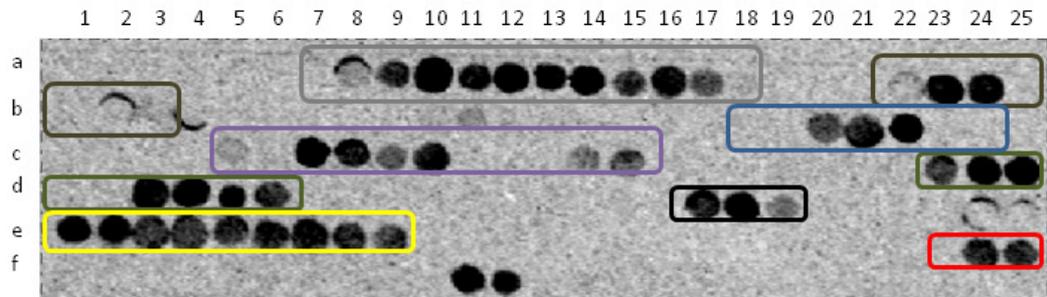


Abb. 3.23. Bindung von [¹⁴C]-markiertem GST, GST-Calmodulin und GST-Calumenin an Sec63p. Peptidfilter wurden in MeOH aktiviert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und für 3 h in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA inkubiert. Nach Inkubation wurde für 1 h mit 5% Milchpulver in TBS blockiert, mit H₂O_{dest.} gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 30.000 cpm des [¹⁴C]-markierten GST-Calumenin, GST-Calmodulin (Positiv-Kontrolle) oder GST (Negativ-Kontrolle) in Bindungspuffer mit CaCl₂ oder EGTA inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Peptidfilter bei Raumtemperatur getrocknet und einer Analyse mittels „PhosphoImaging“ und der ImageQuant-Software unterzogen.

C. [¹⁴C] markiertes GST-Calumenin + CaCl₂ Puffer

D. [¹⁴C] markiertes GST-Calumenin + EGTA Puffer

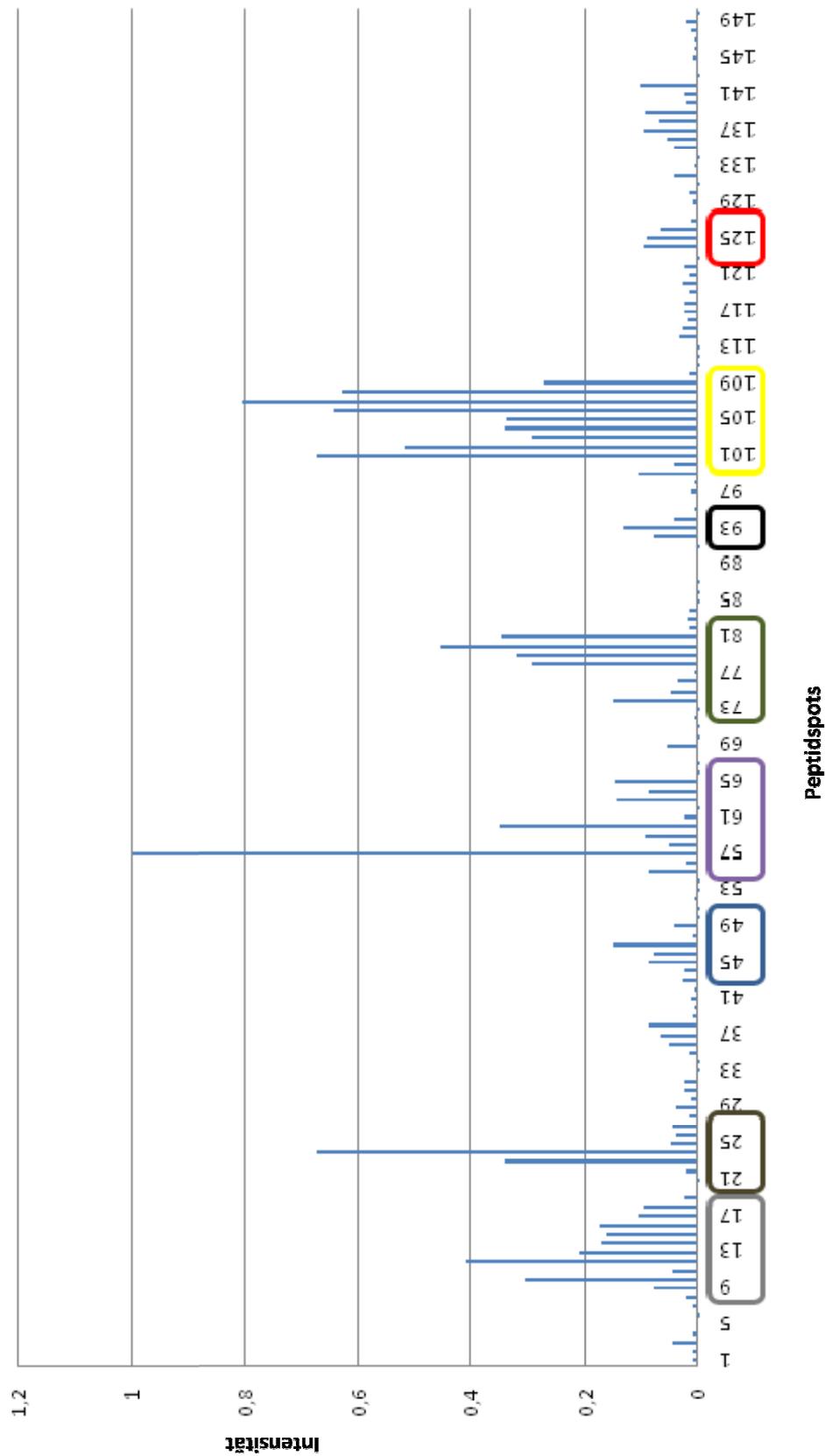


Abb. 3.24. Bindung von ^{14}C markiertem GST-Calmodulin in CaCl_2 Puffer an Sec63p. Auswertung der Spots des Sec63p Peptidfilters: Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots des Peptidfilters. Gezeigt werden die auf das Maximum der Wertereihe normierten Werte nach Subtraktion des GST-Hintergrund für GST-Calmodulin in CaCl_2 Puffer.

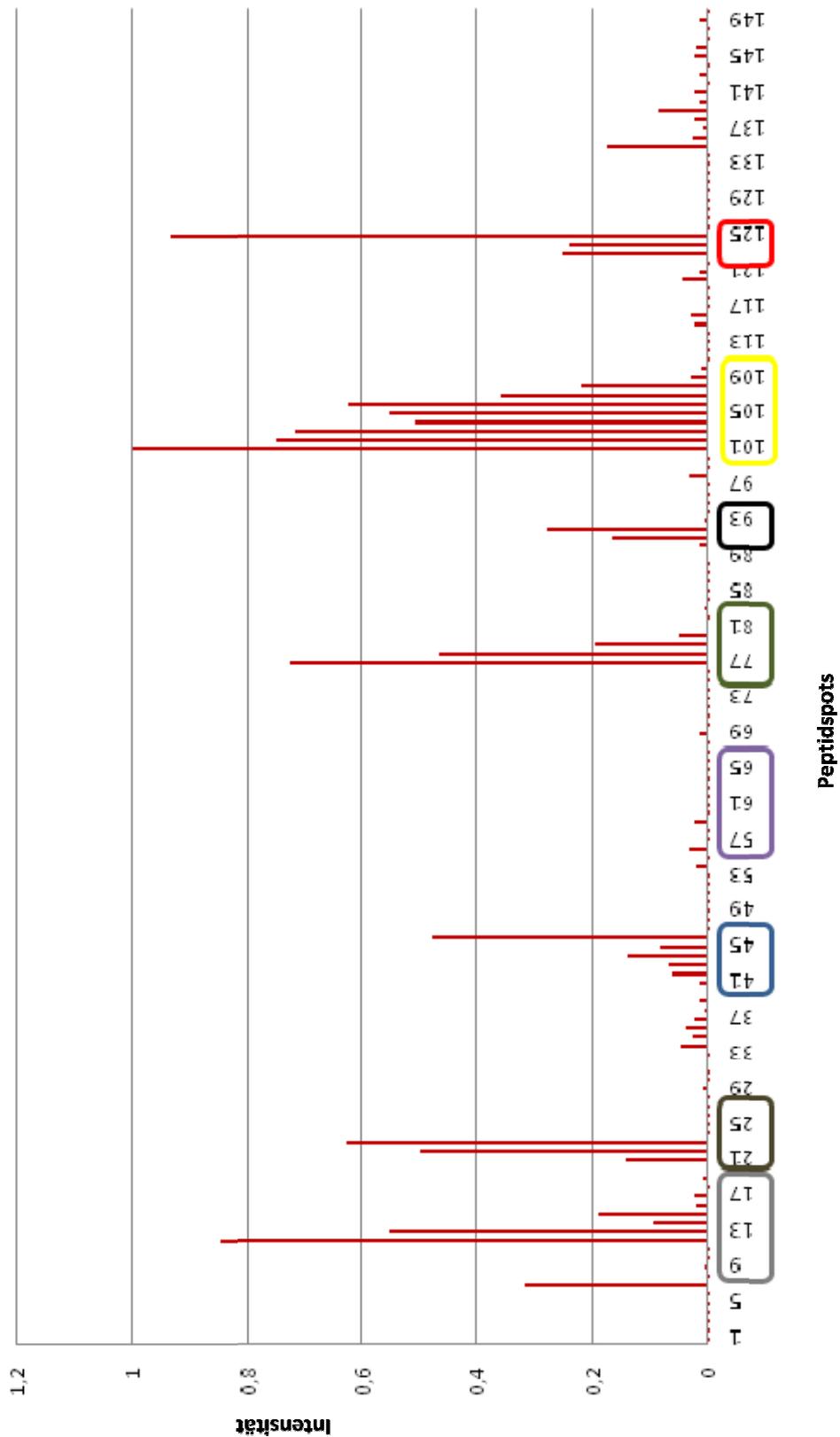


Abb. 3.25. Bindung von [^{14}C] markiertem GST-Calumenin in CaCl_2 Puffer an Sec63p. Auswertung der Spots des Sec63p Peptidfilters: Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots des Peptidfilters. Gezeigt werden die auf das Maximum der Wertereihe normierten Werte nach Subtraktion des GST-Hintergrund für GST-Calumenin in CaCl_2 Puffer.

3. Ergebnisse

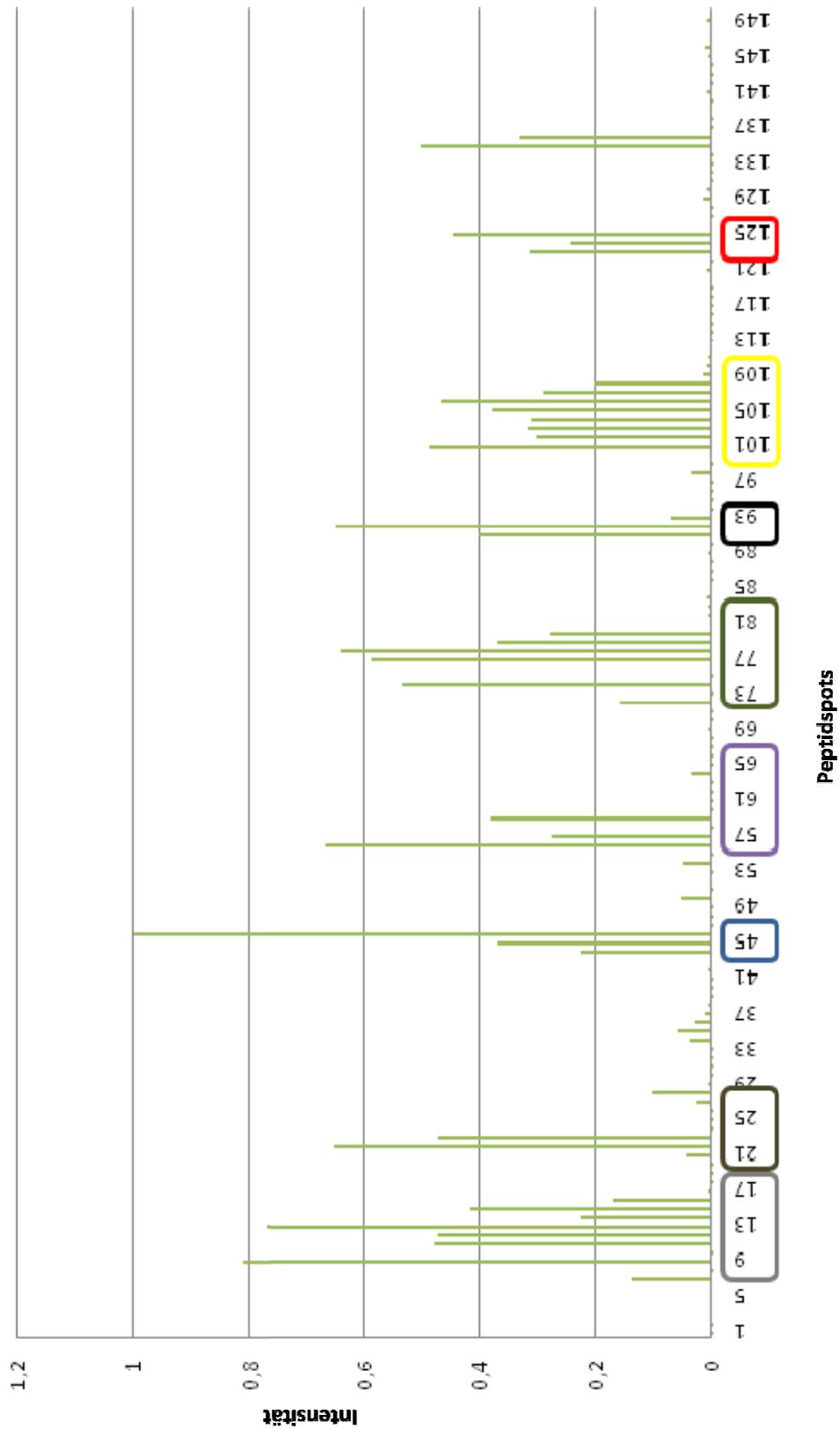


Abb. 3.26. Bindung von [^{14}C] markiertem GST-Calumenin in EGTA Puffer an Sec63p. Auswertung der Spots des Sec63p Peptidfilters: Die farbigen Kästchen kennzeichnen die positiven Spots des Peptidfilters. Gezeigt werden die auf das Maximum der Wertereihe normierten Werte nach Subtraktion des GST-Hintergrund für GST-Calumenin in EGTA Puffer.

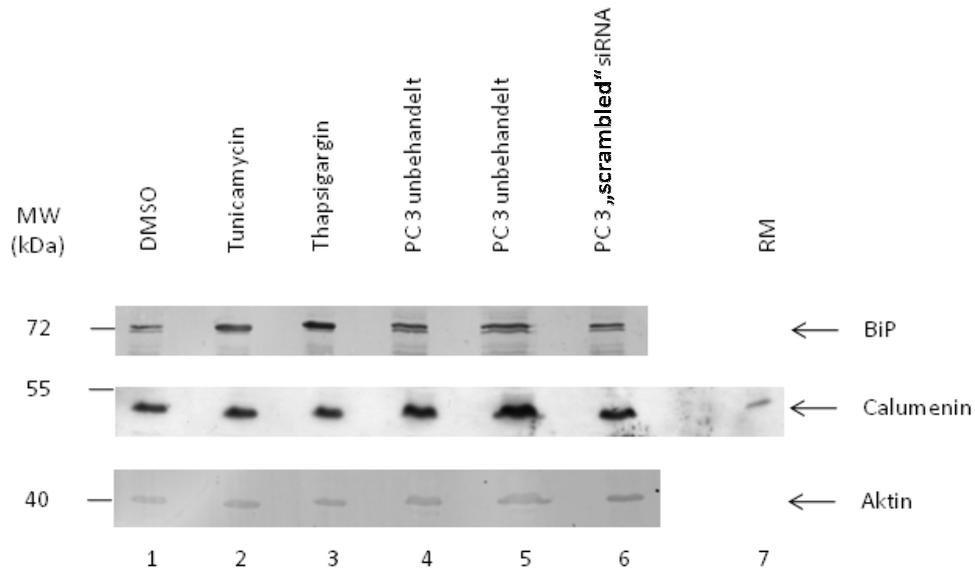
3.2.5. Funktion von Calumenin

3.2.5.1. CALU wird bei induziertem ER-Stress durch Tunicamycin oder Thapsigargin nicht hochreguliert

Wiederum kam die Frage auf, ob Calumenin an Stressreaktionen des ER beteiligt ist. Diese Stressreaktionen können z.B. durch Thapsigargin, das die SERCA hemmt, was zu einem verstärkten Ausfluss an Calcium aus dem ER führt (Ong *et al.*, 2007) oder Tunicamycin, welches zu einer Fehlglykosylierung von Proteinen führt, ausgelöst werden. Es sollte daher die Regulierung von CALU bei Einsatz der beiden Stressoren Tunicamycin (1 µg/ml) und Thapsigargin (1 µM) beobachtet werden.

Hierfür wurden die für 3.1.6.2. aufbereiteten PC3-Zellen benutzt. Die PC3-Zellen wurden herangezogen, nach 24h mit Tunicamycin 1 µg/ml und Thapsigargin 1 µM sowie DMSO bei 37°C inkubiert, nach weiteren 24 h geerntet und *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dabei wurden je 300 000 PC3-Zellen für DMSO, Tunicamycin- und Thapsigargin-Stress *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Auswertung der Zellextrakte *via* SDS-PAGE und Western Blot zeigte neben einer Hochregulierung von BiP (Abb. 3.27.A. und B.) keine Regulation von Calumenin in Antwort auf ER-Stress ausgelöst durch Tunicamycin oder Thapsigargin. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abb. 3.11.B. zeigte sich, dass der induzierte Stress für die Induktion von BiP in diesem Falle nicht so ausgeprägt war. Demnach kann Calumenin nach diesem Ergebnis und der ER-Färbung in der Immunfluoreszenz (vgl. 3.2.1.) wie auch in Zusammenhang mit dem Ergebnis aus 3.2.2. als ein lumenales Protein des ER betrachtet werden, welches nicht an einer Stressreaktion des ER in Bezug auf Thapsigargin oder Tunicamycin beteiligt ist.

A



B

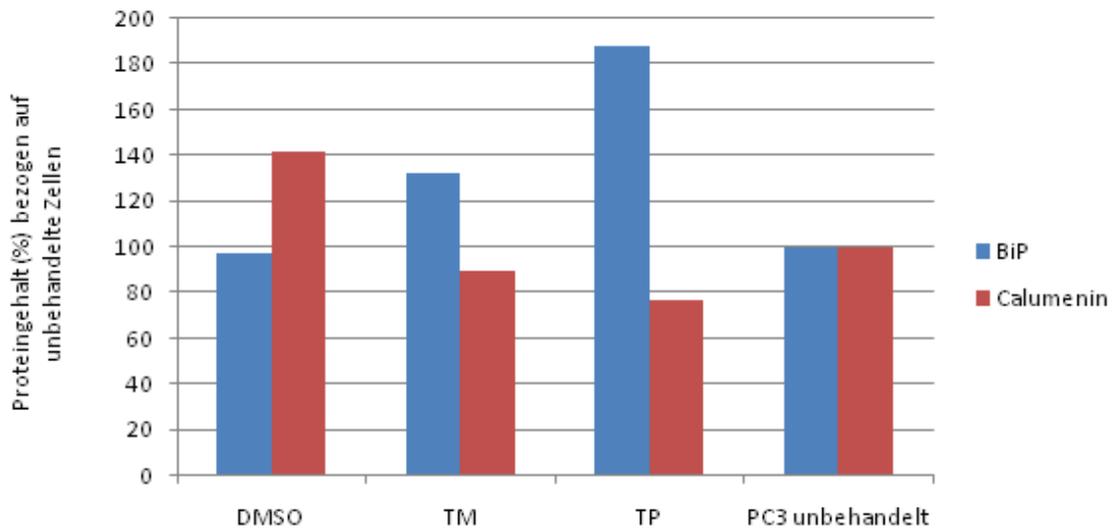


Abbildung 3.27.: Verhalten von Calumenin bei ER-Stress

A. Western Blot der Zellen nach Stressinduktion.

PC3-Zellen wurden in Gibco DMEM 21499 herangezogen und mit DMSO, Tunicamycin 1 µg/ml und Thapsigargin 1 µM gestresst, nach 24 h entnommen und über SDS-PAGE sowie Western Blot analysiert. Es wurde je ein Zellextrakt aus 300.000 Zellen aufgetragen.

Abbildung 3.27.: Verhalten von Calumenin bei ER-Stress

B. Auswertung des Western Blots.

Gezeigt wird der Proteingehalt bezogen auf Aktin nach 24 h. Calumenin zeigt keine Regulation auf einen Stress durch Tunicamycin 1 µg/ml oder Thapsigargin 1 µM.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung von ERj7p

ERj7p wurde ursprünglich von Ray *et al.* (1995) als die zehnte γ -Untereinheit des menschlichen Guanin bindenden Proteins beschrieben (Gng10p). Gng10p γ wird durch eine Geranylgeranyl-Gruppe modifiziert und interagiert mit den G-Proteinen β 1 und β 2, aber nicht β 3. Aufgrund seines differierenden N-Terminus (nur 35 – 53% Homologie zu den anderen G-Proteinen γ) interagiert Gng10p mit einer spezifischen Unterklasse des G-Proteins α (Rahmatullah *et al.*, 1995). Die G Proteine β und γ regulieren nach Ray *et al.* (1995) die Aktivität diverser Enzyme und Ionenkanäle. GNG10p entspricht dem Protein DnaJ C25, welches als Co-Chaperon mit HSP70-Chaperonen assoziiert (Zahedi, Völzing, Schmitt, Frien *et al.*, 2009). Die Gemeinsamkeit der beiden Proteine besteht in einer J-Domäne. Proteine wie DnaJ C25 oder Gng10p, die ein DnaJ-Motiv (J-Domäne) enthalten, werden zur HSP40 Familie gezählt und fungieren als Co-Chaperone für HSP70-Chaperone (Tsai und Douglas, 1996; Chevalier *et al.*, 2000). In dieser Funktion als Co-Chaperon stimulieren sie die ATP-Hydrolyse der HSP70 und leiten somit die Bindung der HSP70 Chaperone an ihr Substrat ein. Nach Walsh *et al.* (2004) werden die HSP40-Homologe in drei Klassen eingeteilt: Typ I zeichnet eine Klasse mit einer G/F-reichen sowie einer Zink-Finger-Region aus, Typ II nur eine G/F-reiche Region und Typ III besitzt weder eine G/F-reiche Region noch ein Zink-Finger-Motiv (Abb. 4.1.B). Da ERj7p im Gegensatz zu *E. coli* DnaJ lediglich eine J-Domäne besitzt, gehört es wie ERj1p zum TYP III der HSP40-Homologen (Abb. 4.1.A). Dabei vermittelt die J-Domäne die Interaktion zwischen den HSP40-Homologen und ihren spezifischen HSP70-Partnern, wobei die ATPase-Aktivität des HSP70-Proteins stimuliert wird. Die Funktion der HSP70-Chaperone besteht in der Bindung und Freisetzung von hydrophoben Segmenten ungefalteter Polypeptidketten in einem ATP-hydrolysierenden Reaktionszyklus (Flynn *et al.*, 1991). Sie können daher ungefaltete oder partiell gefaltete Polypeptidketten binden, wodurch deren Aggregation verhindert wird (Hartl, 1996). Zudem hilft diese Art von Komplexierung bei der Um- oder Neufaltung der Polypeptidketten. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war über eine Funktion von ERj7p als ER-Membran-ständiges Co-Chaperon noch nichts bekannt.

A

DnaJ

MAKQDY~~Y~~EILGVSKTAEEREIRKAYKRLAMKYHPDRNQGDKAEAKFKEIKEAYEVLTD~~SQKRAAYDQYGHAAFEQ~~
GGMGGGGGGGGADFS~~D~~IFG~~D~~VFG~~D~~IFGGGRGRQRRAARGADLRYNMELTLEEAVRGTKEIRIPTLEEC~~D~~VCHGS
 GAKP~~G~~TQ~~P~~T~~C~~PTCHGSGQVQMRQ~~G~~FFAVQQTCPHCQGRGTLIKDPCNKCHGHGRVERSKTLSVKIPAGVDT**G**
 DRIRLAGEGEAGEHGAPAGDLYVQVQVKQHPIFEREGNNLYCEVPINFAMAALGGEIEVPTLDGRVKLVKVPGETQT
 GKLFRMRGKGVKSVRGGAGQGDLLCRVVVETPVGLNERQKQLLQELQESFGGPTGEHNSPRSKSFFDGVKKFFDDL
 TR

ERj1p

MWV**P**FG**S**ARLPQRRRS**G**LESSVRPLWLLLLFLAAVRPVRAWESGDLELFDLVEEVQLN**F**Y**E**FL**G**VQ**Q**DASSAD
 IRKAYRKLSTLHPDKNKDENAET**Q**FRQLVAIYEVLKDDERRRQRYDDVLINGLPDWRQPVFYRRVRKMSNAELALL
 LFIILTVGHYAVVWSIYLEKQLDELLGRKKRERKKTGSKSVDAAKL**G**ASEKNERLLIKPQWHDL**P**CKL**G**IW**F**CLTK
 ALPHLIQDAG**Q**FYAKYKTKLKEKEDALARIEITLQKQKVKVKKPK**P**FPVYMPLENTYIQSYDH**G**TSIEIEEQMD
 DWLENRKRKTQKRQA**P**E**W**TEEDLSQLTRSMV**K**FP**G**GT**P**GRWDKIAHELGRSVTDVTTKAKELKDSVTSS**P**GMTRLS
 ELKSN**G**QNSRPIKIATLPDDIITQREDSAGAMEDEEHEAAEGEQESATTEARPRRRKSARAAEA**V**TRVEPEEKLR**G**
 KRQK**D**FISEQNDSDEEKQRKERTRAAEA**W**TQ**S**Q**K**LELALQ**Q**Y**P**K**G**ASDRWDKIAK**C**V**P**SK**S**KED**C**IAR**Y**KL
 LVELVQ**K**K**Q**AKS

ERj7p

MAAPLL**S**P**G**W**G**AGARRWWMLLAPLLPALLV**R**PA**G**AL**V**E**G**LY**C**G**T**R**D**C**Y**E**V**L**G**V**S**R**S**A**G**KAEIARAYRQLAR
 RYHPDRYR**P**Q**G**DE**G**PRTPQSAEEAFLLVATAYETLKDEETRKDYDYMLDHPEEYSHYHYHYSRRLAPKVDVRV
 VILV**S**CAIS**V**F**Q**FF**S**WWNSYNKAISYLATVPKYRIQATEIAKQ**Q**GLLKAK**E**K**G**KNKKSKEEIRDEEENIINKIISKIDI
 KGGYQK**P**Q**C**D**L**L**F**Q**I**L**A**P**F**H**L**CSYIVWY**C**RWIYN**F**NI**K**G**E**EERLYIRKSMKMK**S**Q**F**DSLEDHQKET**F**L**K**RE
 LWIKENYEVYKQEELKKKLANDPRWKRYRRWMC**N**E**G**PR**L**TFVDD

B

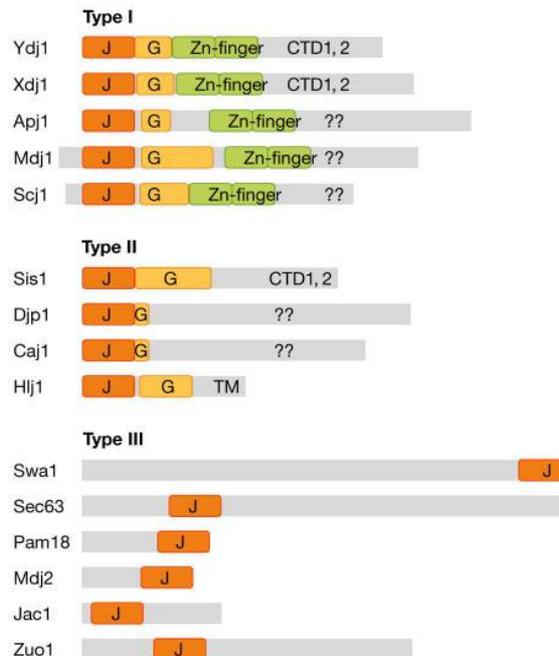


Abb. 4.1.:

A) Sequenz von DnaJ, ERj1p und ERj7p.

ERj7p unterscheidet sich in seinem strukturellen Aufbau kaum von ERj1p, jedoch sehr von DnaJ (Typ I HSP40-Homolog) aus *E. coli* sowie von TYP II HSP 40-Homologen. Es fehlen das Zink-Finger Motiv sowie die G/F-reiche Regionen. Orange = J-Domäne, Grün = Zink-Finger-Motiv, Blau = SANT Domäne, Signalsequenzen, Transmembrandomänen, Sec63p Homologie, Retentionssignal KKXX und G/F-reichen Regionen = **Buchstaben**.

B) nach Walsh *et al.* (2004): Übersicht Typ I, II und III HSP40-Homologe aus der Hefe
 Graue Boxen = Protein, Orange = J-Domäne, Gelb = G/F-reiche Region, Grün = Zink-Finger Motiv.
 CTD bezeichnet die carboxy-terminale Domäne und TM die Transmembran-Elemente.

Zahedi, Völzing, Schmitt, Frien *et al.* (2009) beschrieben ERj7p als in der ER-Membran verankertes HSP40-Homolog, dessen luminale J-Domäne mit BiP interagiert. Mittels Carbonatextraktion wurden Membran-verankerte von löslichen und Membran-assoziierten Proteinen getrennt. Hierbei zeigte sich eine Anreicherung für ERj7p in der Fraktion der Membranproteine. Mittels eines Importtests wurde hier nachgewiesen, dass ERj7p in raue Mikrosomen transportiert sowie prozessiert wird. ERj7p konnte in rauen Mikrosomen quantifiziert werden und kommt in Quantitäten ähnlich ERj2p und ERj5p vor (Tyedmers *et al.*, 2000; Dudek *et al.*, 2002; Bies, Dissertation, 2002; Weitzmann, Dissertation, 2007).

4.1.1. ERj7p interagiert ATP-abhängig mit BiP

Im Lumen des endoplasmatischen Retikulumss von Säugerzellen sind neben ERj7p noch sechs weitere HSP40-Homologe bekannt, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und dabei alle mit BiP interagieren (Tsai und Douglas, 1996; Chevalier *et al.* 2000; Tyedmers *et al.*, 2000; Dudek *et al.*, 2002; Bies, Dissertation, 2002; Shen *et al.*, 2002; Weitzmann, Dissertation, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch ERj7p mit BiP, dem HSP70-Chaperon des ER-Lumens, ATP-abhängig interagiert. Die J-Domäne des humanen ERj7p wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und an GSH-Sepharose immobilisiert. Eine Inkubation der immobilisierten J-Domäne mit Extrakt aus rauen Mikrosomen führte in Anwesenheit, nicht aber in Abwesenheit von ATP zur Bindung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 72 kDa. Das ATP-abhängige Bindungsverhalten ist eine typische Eigenschaft von HSP70 / HSP40-Interaktionen. Das Protein ließ sich mit einem anti-BiP Antikörper immunologisch detektieren. Unter Verwendung von rekombinant in *E. coli* hergestelltem BiP konnte die Interaktion bestätigt werden. Wurde eine immobilisierte ERj7p J-Domäne mit in *E. coli* synthetisiertem und gereinigtem BiP aus Hamster oder Maus inkubiert, kam es ebenfalls zu einer ATP-abhängigen Bindung.

Die mittels Oberflächenplasmonspektroskopie bestimmte K_D zeigt mit 1,13 μM eine vergleichbare Affinität wie ERj1p und ERj5p in seiner Interaktion mit BiP (vgl. Tab. 4.1.). Im Vergleich zu ERj2p/Sec63p, ERj3p und ERj4p besitzt ERj7p jedoch eine hohe Affinität zu BiP. ERj7p scheint daher eine wichtige Rolle im Chaperonnetzwerk des ER zu spielen.

Nachdem eine ATP-abhängige Interaktion der J-Domäne von ERj7p mit BiP in Bindungsversuchen nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob sich diese Interaktion auch funktionell auf die ATPase-Aktivität von BiP auswirkt. Für fast alle bisher untersuchten HSP70 / HSP40-Interaktionen ist beschrieben, dass die ATPase-Aktivität des HSP70 Partners durch sein HSP40 Co-Chaperon stimuliert wird. So wurde beispielsweise eine Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP infolge der Interaktion mit HSP40 (ERj1p, ERj2p, ERj4p, u.a.) mehrfach beschrieben (Tsai und Douglas, 1996; Chevalier *et al.* 2000; Shen *et al.*, 2002; Bies, Dissertation, 2002; Dudek *et al.* 2002). Um die ATPase-Aktivität von BiP in An- und Abwesenheit einer definierten Konzentration der J-Domäne von ERj7p zu bestimmen, wurden ATPase-Versuche durchgeführt, bei denen die Mengen an freigesetztem P_i und verbliebenem ATP nach verschiedenen Zeitintervallen bestimmt wurden.

Die Anwesenheit der J-Domäne führte zu einer 2-fachen Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP. Die ATPase-Aktivität konnte zudem durch Zugabe von GRP170, einem Nukleotidaustauschfaktor (NEF), zu dem Versuchsansatz sogar um das 2,5-fache gesteigert werden. Es bestätigt sich somit das in der Literatur vorherrschende Bild des HSP70 / HSP40 / NEF Systems für ERj7p (Bukau, Weissman und Horwich, 2006; Weitzmann *et al.*, 2007).

Im Vergleich zu ERj4p (Kurusu *et al.*, 2003) zeigt ERj7p eine stärkere Affinität zu BiP, wobei die Stimulation der ATP-Hydrolyse allerdings vergleichbar ist. Die Verbindung des Wertes der Affinität und der Stimulationsrate zusammen mit der hohen Konzentration von ERj7p in der Membran von rauen Mikrosomen, lässt die Vermutung zu, dass ERj7p auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle für die Funktion von BiP spielt. Inwieweit sich diese Funktion der Stabilisierung von BiP / Substrat Bindungen in einer J-Domänen abhängigen Weise bei ER-Stress verstärkt und so eine Akkumulation fehlgefalteter, nicht glykosylierter Proteine im ER verhindert, muss jedoch noch weiter untersucht werden.

4.1.2. ERj7p lokalisiert im ER von PC3-Zellen

Um die Lokalisierung von ERj7p in PC3-Zellen zu untersuchen, wurde eine immunologische Detektion mit polyklonalen Antikörpern, die aus Kaninchenblut gewonnen wurden, durchgeführt.

Dabei wurden PC3-Zellen kultiviert und nach einer Wachstumsphase mit siRNA gegen ERj7p transfiziert. Die behandelten Zellen wurden entweder für eine Immunfluoreszenz-Färbung herangezogen oder geerntet und *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Neben ERj7p (~ 40 kDa), wurden zwei weitere Proteine bei ca. 55 kDa und ca. 100 kDa von dem Antikörper innerhalb des Western Blots erkannt. Da die Identität der zusätzlich detektierten Proteine nicht geklärt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine möglicherweise aufgrund einer Kreuzreaktion des Antikörpers erkannt wurden. Dies wirkte sich auf die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung aus, da hier kaum eine Unterscheidung in der Färbung des endoplasmatischen Retikulums in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen der siRNA- und Stressversuche bzw. auf die Färbung gegen Sec62p erkennbar war. Es zeigten sich jeweils die Strukturen des endoplasmatischen Retikulums. Aufgrund der Kreuzreaktion mit den beiden unbekannt Proteinen lässt sich nicht ausschließen, dass bei der Betrachtung der ER-Verteilung des ERj7p *via* Immunfluoreszenz hauptsächlich die Kreuzreaktionen beobachtet wurden. In Verbindung mit dem Importtest, bei dem die Transmembran-Domänen des ERj7p erkennbar waren, kann man jedoch auf eine Lokalisierung von ERj7p in der Membran des ER von PC3-Zellen schließen.

4.1.3. ERj7 ist durch siRNA oder Tunicamycin regulierbar

Unter Einsatz von siRNA gegen ERj7 sowie Stressoren des ERs (Tunicamycin und Thapsigargin) sollte die Regulierung von ERj7 bzw. die Beteiligung von ERj7p an der UPR in PC3-Zellen untersucht werden. Der Einsatz von siRNA gegen ERj7 zeigte keine Veränderung von ERj7p in Immunfluoreszenz-Aufnahmen, jedoch auf Western Blot-Ebene. ERj7 kann somit mittels siRNA in PC3-Zellen herunterreguliert werden. Eine Reduzierung der Menge an ERj7p im ER löst jedoch keine UPR aus, da wahrscheinlich die Funktion von ERj7p von anderen Mitgliedern der ERj-Familie übernommen wird. Eine andere Erklärung bietet der doch noch recht hohe Restproteingehalt von ca. 40 %. So konnte im Versuchsteil der Abb. 3.10.C. und D. ein Anstieg für BiP infolge der Reduzierung des Proteingehaltes von ERj7p durch die siRNA #2 auf ca. 10 % beobachtet werden. In jedem Falle sollte die Regulierung von ERj7 mittels siRNA noch genauer untersucht werden.

Eine Hochregulation von ERj7 bei dem Einsatz von Tunicamycin, das die Glykosylierung von Proteinen inhibiert (Cronin, Rao und Hampton, 2002; Reimertz, *et al.*, 2003) und somit zu einer erhöhten Konzentration an ungefaltetem Protein und damit zur UPR führt, konnte auf Western Blot Ebene nachgewiesen werden. Zur weiteren Kontrolle für die Induktion von ERj7 bei ER-Stress wurden PC3-Zellen mit Thapsigargin behandelt, welches die SERCA inhibiert und somit die cytosolische Calcium-Konzentration erhöht, was u.a. zur Einleitung der Apoptose führt (Thastrup *et al.*, 1990; Kmonícková, 2008). Hier zeigte sich allerdings keine Veränderung auf Ebene des Western Blots.

Die Immunfluoreszenzen zeigten für die Einwirkung der Stressoren auf die Zellen eine Veränderung der Proteinmuster innerhalb des ER (Abb. 3.12.). Im Vergleich zu DMSO änderte sich für die gestressten Zellen das Verteilungsmuster dahingehend, dass bei Tunicamycin die Kernpole stärker färbten, wohingegen bei Thapsigargin das fibrilläre ER der Zelle diffus erschien. Da die Immunfluoreszenzen keine besonders großen Veränderungen innerhalb der Struktur des ER in Bezug auf ERj7p zeigten, aber auf den Western Blots neben der Bande für ERj7p noch zwei weitere unveränderte, unspezifische Banden auftraten (vgl. Abb. 3.1.), stellt sich die Frage, ob diese für die Färbung des ER bei der Immunfluoreszenz verantwortlich sind.

ERj7p ist den vorliegenden Daten folgend ein ER-Protein, welches unter Stressbedingungen im Bereich der Glykosylierung von Proteinen hochreguliert wird, jedoch nicht bei einem Stress durch Behinderung der Calcium-Homeostase. Im Zusammenhang mit dem ER-Stress durch Tunicamycin beobachten Kurisu *et al.* (2003) für ERj4p ebenfalls eine Hochregulierung. Sie bestätigten ERj4p als einen Interaktionspartner von BiP (Shen *et al.*, 2002) und konnten zeigen, dass bei einer Überexpression von ERj4p die durch Tunicamycin induzierte UPR inhibiert wird. Dabei spielt die Interaktion der J-Domäne von ERj4p mit dem HSP70-Chaperon BiP eine große Rolle, da bei Mutanten mit einer deletierten J-Domäne die protektiven Effekte bei der UPR aufgehoben wurden.

ERj7p könnte in diesem Rahmen eine ähnliche Funktion wie ERj4p bei der UPR einnehmen. Diese Funktion von ERj4p könnte mit ausschlaggebend für die Nicht-Induktion der UPR durch Herunterregulierung der Menge an ERj7p in den siRNA-Versuchen sein. Andererseits besteht die Möglichkeit dass der recht hohe Restproteingehalt von ERj7p von ca. 40 % nicht ausreichend für eine Induzierung der UPR war.

Die Herunterregulierung von ERj7p durch siRNA #2 zeigte für BiP im zweiten Versuchsansatz (Abb. 3.11.C. und D.) eine Steigerung von BiP, was auf die Einleitung der UPR schließen lässt. Hier lag der Restproteingehalt von ERj7p bei ca. 10 %. Es müssen in diesem Falle noch weitere Untersuchungen zur Beteiligung von ERj7p an der UPR erfolgen.

4.1.4. Zusammenfassung der Interaktionen des HSP70-HSP40-Chaperonsystems des ER aus Säugerzellen

Das HSP70-Chaperonsystem des rauen endoplasmatischen Retikulums aus Hundepankreas-Gewebe wurde in den vergangenen Jahren im Rahmen mehrerer Arbeiten charakterisiert (Tsai und Douglas, 1996; Chevalier *et al.* 2000; Tyedmers *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002; Dudek *et al.*, 2002; Bies, Dissertation, 2002; Weitzmann, Dissertation, 2007). Dabei wurden die verschiedenen Proteine in rauen Mikrosomen quantifiziert und ihre Interaktionen untereinander mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und ATPase-Experimenten untersucht. Die gesammelten Ergebnisse sind in Tab. 4.1. zusammengestellt, wobei die während dieser Arbeit gewonnenen Daten grün unterlegt sind.

Tab. 4.1.: aus Weitzmann, Dissertation, 2007.

Zusammenfassung der Interaktionsdaten der HSP70-Chaperone des Säuger ERs und ihren Co-Chaperonen.

Die grün unterlegten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit gewonnen, die anderen Daten stammen aus früheren Arbeiten (Tyedmers *et al.*, 2000; Dudek *et al.*, 2002; Bies, Dissertation, 2002; Weitzmann, Dissertation, 2007). Nb: nicht bestimmt.

	Konz. in RM Suspension [μ M]	rekombinantes Protein	Affinität für BiP bei Anwesenheit von ATP (K_D [μ M])	Stimulation der ATPase-Aktivität von BiP (fach)	weitere Stimulation durch Grp170	UPR Induktion
BiP	5,00	BiP-His ₆	-	-	-	+
Grp170	0,50	-	Nb	keine	-	+
ERj1p	0,36	GST-J	0,12	5,17	5,60	-
ERj2p	1,98	GST-J	5,00	3,53	5,70	-
ERj3p	0,29	GST-ERj3	3,60	1,84	1,90	+
		GST-J+G/F	3,50	Nb	Nb	
ERj4p	nb	GST-ERj4	6,07	1,59	1,50	+
ERj5p	2,00	GST-J	0,45	3,87	Nb	+
		GST-J	0,59	1,84	Nb	
ERj7p	2,30	GST-J	1,13	2,00	2,50	?

Aus Tabelle 4.1. wird ersichtlich, dass ERj7p als neues Mitglied der HSP70-Chaperon Familie sich in das schon vorhandene Chaperonnetzwerk des endoplasmatischen Retikulums einreihet. So zeigt es eine ähnliche Konzentration wie ERj2p/Sec63p und ERj5p, die beide mit BiP interagieren. ERj2p/Sec63p ist an der Translokation von Proteinen durch den Sec61p-Translokation-Komplex beteiligt (Corsi und Schekman, 1997; Zimmermann, 1998; Tyedmers *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Dudek *et al.*, 2002) und ERj5p hilft beim Erhalt der Faltungskapazität im ER (Carla Famá *et al.*, 2007). Auch die Stimulierung der ATPase-Aktivität von BiP ist für die beiden Proteine wie für ERj7p annähernd gleich. Allerdings zeigt sich ein Unterschied für die Affinität der Interaktion: ERj7p und ERj5p zeigen eine hohe Affinität zu BiP, ERj2p/Sec63p hingegen nicht. Dies spricht für eine Beteiligung von ERj2p/Sec63p für die Translokation von Proteinen über den Translokation-Komplex und für die beiden anderen ERj-Proteine bei der Faltung von Proteinen. In Bezug auf die anderen ERj-Proteine wie ERj3p und ERj4p zeigen sich bis auf eine ähnliche Stimulierung der ATPase-Aktivität von BiP keine großen Gemeinsamkeiten; die Affinität dieser Proteine zu BiP ist relativ niedrig. Auch ihre Quantität im ER des Hundepankreas ist relativ gering. ERj1p zeigt im Vergleich zu ERj7p eine geringere Quantität, jedoch eine viel höhere Affinität und Stimulierung. ERj7p scheint aufgrund seiner Charakteristika eine ähnliche Rolle wie ERj5p im Rahmen des Chaperonnetzwerks des ERs zu übernehmen, wobei hier die räumliche Verteilung des ERj7p in Bezug auf den Translokationkomplex und BiP genauer untersucht werden sollte. Eine Verringerung der Konzentration von BiP, GRP170, ERj3p, ERj4p und ERj5p aufgrund von ER-Stress löst die UPR aus, ERj1p und ERj2p/Sec63p hingegen sind an der UPR nicht beteiligt. ERj7p zeigt wie ERj4p eine Induktion der UPR bei ER-Stress ausgelöst durch Tunicamycin nicht jedoch Thapsigargin. Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung von ERj7p an einer bestimmten UPR sein. Dieses Verhalten von ERj7p sollte jedoch noch genauer untersucht werden. Die Induktion einer UPR aufgrund einer Reduzierung des Proteinsgehalts von ERj7p konnte nicht wirklich beobachtet werden. Der Einsatz der siRNA #2 gegen ERj7 zeigte eine Induktion, allerdings sollten diese Ergebnisse noch einmal überprüft werden. In Anbetracht der funktionellen Daten aus Tab. 4.1. stellt ERj7p somit ein neues Mitglied der Familie der HSP40-Chaperone des ER dar.

4.2. Charakterisierung von Calumenin

Calumenin wurde als EF-Hand-Protein (Kretsinger *et al.*, 1973 und 1987) mit geringer Affinität zu Calcium innerhalb des endoplasmatischen Retikulums von Yabe *et al.* (1997) erstmalig beschrieben. Calumenin verteilt sich nach Vorum *et al.* (1998) ubiquitär auf alle Zelltypen. Honoré *et al.* (1999) konnten zeigen, dass Calumenin trotz seines ER-Retentionsmotivs im gesamten sekretorischen Weg vorkommt. Calumenin verfügt neben dem HDEF-Motiv über eine Signalsequenz für den Transport in das ER sowie über sieben EF-Hand-Motive. Yabe *et al.* (1997) ordneten Calumenin daher in die Protein-Familie der „CREC“ (Cab45, Reticulocalbin, ERC-55 und Calumenin) ein. Allen Proteinen dieser Familie ist neben dem EF-Hand-Motiv, einer Signal- (von Heijne, 1981; Nielsen *et al.*, 1997) und Rückhaltesequenz (Pelham, 1990; Vorum *et al.*, 1999) die Lokalisierung innerhalb des sekretorischen Weges gemein (Ozawa und Muramatsu, 1993; Weis *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1996; Koivu *et al.*, 1997; Yabe *et al.*, 1997; Vorum *et al.*, 1998; Yabe *et al.*, 1998; Hseu *et al.*, 1999; Vorum *et al.*, 1999). Vorum *et al.* (1999) allerdings zeigten, dass Calumenin trotz seines HDEF-Motives auch in das umgebende Medium sekretiert werden kann. Das HDEF-Motiv von Calumenin ist daher im Vergleich zum HDEL-Motiv von ERC-55 ein eher ineffizientes Rückhaltmotiv. So konnte durch Lehmann *et al.* (2001) gezeigt werden, dass die RNase LX aus Tomate, die ebenfalls ein HDEF-Retentionssignal besitzt, über den gesamten sekretorischen Weg verteilt ist. Neben einer Funktion bei der Amyloidose (Pepys und Baltz, 1983; Pepys *et al.*, 1985; Steel und Whitehead, 1994; Vorum *et al.*, 2000) scheint Calumenin eine Rolle bei der Blutgerinnung (Wajih *et al.*, 2004; Nelsestuen und Ostrowski, 1999; Wallin *et al.*, 2001), der Bildung atherosklerotischer Läsionen (Coppinger *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2009), der Thrombose (Ostergaard *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2009) sowie weiteren Erkrankungen zu spielen.

Neben den oben erwähnten Rollen von Calumenin fanden Tyedmers *et al.* (2005), dass Calumenin mit der Protein-Translokase, bestehend aus dem Sec61p-Trimer und den assoziierten Proteinen Sec62p und Sec63p, interagiert. Es wird angenommen, dass die gebildete Translokationspore Ionenkanal-Charakter besitzt (Simon *et al.*, 1989 und 1991; Wirth *et al.*, 2003). Der Sec61p-Translokation-Komplex ist durchlässig für neutrale und polare Moleküle (Heritage und Wonderlin, 2001). Dabei ist die Pore des Translokation-Komplexes allerdings immer noch mit dem Ribosom verbunden, befindet sich aber nicht in einem translozierenden Zustand.

Johnson und van Weas (1999) sowie Johnson (2003) fordern für diesen Fall einen Verschluss der Pore durch BiP auf luminaler Seite zum Erhalt der Permeabilitätsbarriere. Alder *et al.* (2005) konnten zeigen, dass BiP während seines ATPase Zyklus den Sec61p-Translokon-Komplex verschließt. Haigh und Johnson (2002) kommen zu einem ähnlichen Modell für den Verschluss der Translokon-Pore durch BiP. In ihrem Versuch verweisen sie jedoch darauf, dass Ionen oder polare Moleküle unabhängig von BiP durch die Pore diffundieren können. Der Ribosom-Translokon-Komplex scheint daher einen Calcium-Leckstrom aus dem ER zu vermitteln (Van Coppenolle *et al.*, 2004). Dies zeigte ein Versuch mit Puromycin, bei dem eine reduzierte lumenale Calcium-Konzentration in Anwesenheit von Heparin und Ryanodin festgestellt wurde. Heparin und Ryanodin inhibieren den Calcium-Ausstrom über die IP₃R und RyR, so dass hier nur der Translokon-Komplex als Vermittler des Leckstroms gesehen werden kann. Bei Behandlung durch Anisomycin (einem Inhibitor der Peptidyl-Transferase) konnte die Wirkung von Puromycin aufgehoben werden. Da der Puromycin-Effekt spezifisch für den Sec61p-Translokon-Komplex ist, folgerten Van Coppenolle *et al.* (2004), dass das Translokon die Hauptkomponente des Calcium-Leckstroms darstellt.

In Acinar-Zellen wurde gezeigt, dass der Calcium-Leckstrom in Anwesenheit der Inhibitoren Thapsigargin (SERCA), Heparin (IP₃R) und Ruthenium Rot (RyR) unverändert bleibt (Kopach *et al.*, 2005). Daher wird der Leckstrom nicht über SERCA, IP₃R oder RYR vermittelt. Bei Zugabe von Puromycin hingegen ergab sich eine Intensivierung des Calcium-Leckstroms. Dies bestätigt die Funde von Roy und Wonderlin (2003), Le Gall (2003) und Van Coppenolle (2004), welche auf eine Beteiligung des Sec61p-Translokon-Komplexes hinweisen. Es wurde durch Erdmann (Dissertation, 2009) *via* elektrophysiologischer Messungen gezeigt, dass der Sec61p-Translokon-Komplex Calcium-Ionen über eine Lipidmembran leitet. Diese Translokation von Calcium-Ionen konnte durch die Zugabe von Calmodulin zu dem Sec61p-Kanal blockiert werden. Bei Zugabe von EGTA zu dem Versuchsaufbau konnte kein Calmodulin Effekt mehr beobachtet werden. Calmodulin scheint daher ein Modulator des Calcium-Leckstroms des Sec61p-Translokon-Komplexes zu sein. Allerdings konnte in diesen Versuchen bisher nicht geklärt werden, ob Calmodulin an eine cytosolische Bindungsstelle bindet oder artifiziell an eine luminal. Calmodulin ist wie Calumenin ein Calcium-bindendes, regulatorisches Protein. Calmodulin ist jedoch ein Protein des Cytosols (Copley *et al.*, 1999) und spielt in Calcium abhängigen Signalkaskaden des Cytosols eine wichtige Rolle. Ähnlich wie die Proteine der CREC Familie verfügt Calmodulin über EF-Hand-Motive (Strynadka und James, 1989).

Da Calmodulin nur cytosolisch vorliegt und bei Tyedmers *et al.* (2005) eine Assoziation von Sec63p mit Calumenin, einem luminalen EF-Hand-Protein, gefunden wurde, stellt sich die Frage, ob nicht Calumenin oder ein anderes Protein der CREC-Familie eine regulatorische Funktion in Hinsicht auf die Calcium-Permeabilität des Sec61p-Translokon-Komplexes besitzt. Für Calumenin konnte bisher eine Calcium-abhängige Interaktion mit zwei an der Calcium-Homeostase beteiligten Transportern nachgewiesen werden: Calumenin interagiert mit dem Ryanodin-Rezeptor-1 (Jung *et al.*, 2006) wie auch der SERCA (Sahoo und Kim, 2008). Die Interaktion von Calumenin mit RyR-1 findet in millimolaren Konzentrationen an Calcium über die sechs EF-Hände des Calumenins statt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bei Überexpression von Calumenin in C2C12 Zellen der Koffein induzierte Calcium-Ausstrom erhöht war, wohingegen der durch Depolarisation induzierte Calcium-Ausstrom reduziert war. Calumenin scheint in diesem Falle die Konzentration an freiem Calcium stark zu puffern. Diese Eigenschaften der RyR-1 und Calumenin-Interaktion haben so einen Einfluss auf die idiopathisch ausgedehnte Cardiomyopathie (Grzeskowiak *et al.*, 2003). Im Gegensatz hierzu scheint die Interaktion von Calumenin und der SERCA inhibierend zu sein, da die Calcium-Aufnahme in das sarcoplasmatische Retikulum gestört ist. Calumenin scheint hier eine Rolle bei der Muskelkontraktion zu spielen.

Calumenin kann somit in Blick auf den Calcium-Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums und auf die Calcium-Homeostase eine Wirkung haben. Da alle anderen Proteine der CREC Familie aber über die gleichen Eigenschaften verfügen wie Calumenin, stellt sich zudem die Frage, ob nicht ein anderes Mitglied der Familie eine Wirkung auf den Calcium-Leckstrom besitzt. Parallel zu der Assoziation von Calumenin an Sec63p konnte Tyedmers *et al.* (2005) auch eine Assoziation an Reticulocalbin nachweisen.

4.2.1. Calumenin lokalisiert im ER von PC3-Zellen

Calumenin wird in Importtests in rauen Mikrosomen transportiert. Dieses Ergebnis entspricht den Entdeckungen von von Heijne (1981) sowie Nielsen *et al.* (1997) in Bezug auf die Notwendigkeit einer Signalsequenz für den gerichteten Transport in das ER. Der Verbleib des translatierten und transportierten Calumenins in rauen Mikrosomen demonstriert die Wirkung der ER-Rückhaltesequenz HDEF (Pelham, 1990; Vorum *et al.*, 1999). Die von Yabe *et al.* (1997) und Honoré *et al.* (1998) festgestellte Lokalisierung von Calumenin im ER wurde mittels Importversuch und Immunfluoreszenz bestätigt.

4.2.1.1. Calumenin kann *via* Immunfluoreszenz im ER nachgewiesen werden.

Um das Vorkommen von Calumenin in PC3-Zellen zu untersuchen, wurde eine immunologische Detektion mit polyklonalen Antikörpern, die aus Kaninchenblut gewonnen wurden, durchgeführt. Dabei wurden PC3-Zellen kultiviert und für eine Immunfluoreszenzfärbung herangezogen. Calumenin zeigt innerhalb der Immunfluoreszenz Färbung ebenso wie Sec62p eine Färbung des endoplasmatischen Retikulums. Diese Färbung bestätigt die von Yabe *et al.* (1997) und Vorum *et al.* (1999) durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen. Zwar zeigte der Antikörper gegen Calumenin in einem Western Blot noch zwei markante, unbekannte Banden in einer Kreuzreaktion, welche für die Färbung innerhalb der Immunfluoreszenz verantwortlich sein könnten, allerdings konnte derselbe Antikörper rekombinantes Calumenin wie Calumenin in RMs spezifisch erkennen. Daher ist anzunehmen, dass Calumenin innerhalb der Immunfluoreszenz für die Färbung des ER verantwortlich ist. Daher scheint Calumenin im ER zu lokalisieren.

4.2.1.2. Calumenin wird in raue Mikrosomen importiert.

Um die Funktion der Signalsequenz für den Transport in das ER sowie des Retentionssignals (HDEF, Pelham, 1990; Vorum *et al.*, 1999; Honoré *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2005) von Calumenin zu testen, wurde ein radioaktiver Importtest durchgeführt, bei dem der Import von Calumenin *via* SDS-PAGE und „PhosphoImaging“ überprüft wurde. Ein Protein in Höhe von 37 kDa, welches Calumenin sein könnte, wird in raue Mikrosomen transportiert und ist vor Proteinase K-Verdau geschützt. Erst die Zugabe von Triton-X 100, das die rauen Mikrosomen auflöst, erlaubt einen Abbau des Proteins. Yabe *et al.* (1979) und Vorum *et al.* (1999) beschreiben für Calumenin eine putative N-Glykosylierungsstelle; eine Glykosylierung konnte für das 37 kDa große Proteine allerdings hier nicht beobachtet werden. Durch den Importtest konnte der Transport (Signalsequenz) wie der Verbleib (HDEF-Retentionsmotiv) von Calumenin in das ER wie aus der Literatur bekannt (von Heijne, 1981; Nielsen *et al.*, 1997; Pelham, 1990; Vorum *et al.*, 1999; Honoré *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2005) bestätigt werden. In Zusammenhang mit 4.2.1.1. bestätigte sich somit die Lokalisierung von Calumenin im ER (Yabe *et al.*, 1997; Honoré *et al.*, 1998).

4.2.2. Rekombinante Expression und Reinigung von Calumenin

Um die Interaktion von Calumenin mit Sec63p *in vitro* zu charakterisieren, wurde Calumenin ohne seine Signalsequenz als His₆-Fusionsprotein in einem RTS 100 System (Roche) bzw. als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert. Calumenin wurde durch die Firma RZPD aus humanem Gewebe kloniert. Das in *E. coli* synthetisierte GST-Calumenin lag nach Synthese in löslicher Form vor und konnte nach einer Umpufferung und einer Konzentrationsbestimmung direkt für nachfolgende Versuche verwendet werden. Das in *E. coli* synthetisierte Calumenin lag bei den gegebenen Parametern in einer Form vor, bei der die einfache Reinigung über GSH-Sepharose ausreichte. Daher wurde das rekombinante Protein direkt nach einer Umpufferung in den Interaktionsstudien eingesetzt.

Die Synthese von Calumenin-His₆ im RTS 100-System (Roche) war wie die Synthese im *E. coli* System erfolgreich. Allerdings konnte GST-Calumenin an GSH-Sepharose gebunden werden, Calumenin-His₆ hingegen zeigte keine Bindung an eine Ni-Agarose. Die Synthese des Fusionsproteins in *E. coli* führte zu einem nativen Protein, das auch nach Spaltung des Fusionsproteins durch TEV-Protease im nativen Zustand erhalten blieb. Dies bestätigte sich in einer Interaktion von GST-Calumenin mit Sec63p aus dem Extrakt von rauen Mikrosomen sowie der Interaktion von in *E. coli* synthetisierter GST-Sec63 J-Domäne bzw. GST-Sec63 C-Terminus mit Calumenin. Obwohl die Bindungsversuche visuell kaum eine Bindung zeigten, konnte die Funktionalität des Fusionsproteins in den Peptidfilter-Versuchen bestätigt werden.

Das RTS 100-System (Roche) wurde in der Vergangenheit schon häufiger innerhalb des Labors für die Synthese von Proteinen erfolgreich eingesetzt (Völzing, Dissertation, 2004). Weshalb nun diese Schwierigkeiten bei der Bindung des Fusionsproteins an die Ni-Agarose auftraten, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Vielleicht wurde hier der His₆-„tag“ vom Protein verdeckt, so dass es zu keiner Bindung kam. Da jedoch Calumenin auch als GST-Fusion vorlag, wurde dieses für die Arbeit benutzt.

4.2.3. Calumenin interagiert Calcium-unabhängig mit Sec63p

Wie schon durch Tyedmers *et al.* (2005) gezeigt, co-immunpräzipitiert Calumenin mit Sec63p. Da Sec63p über eine putative Bindestelle für Calmodulin (Calmodulin, ein EF-Hand-Protein des Cytosols) verfügt, könnte Calumenin ebenfalls Ca²⁺-abhängig mit dieser Bindestelle interagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Calumenin Ca²⁺-unabhängig mit Sec63p, einer Komponente des Sec61p-Translokon-Komplexes, interagiert. Calumenin wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und an GSH-Sepharose immobilisiert. Eine Inkubation des immobilisierten Proteins mit einem Extrakt aus rauen Mikrosomen führte in Anwesenheit wie in Abwesenheit von Calcium zur Bindung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Das Calcium-unabhängige Bindungsverhalten war ein unerwartetes Ereignis, da eine Calcium-Abhängigkeit der Protein-Interaktion zuvor beschrieben wurde (Jung *et al.*, 2006; Sahoo und Kim, 2008). Das Protein ließ sich mit einem α -Sec63p-Antikörper immunologisch detektieren. Die gewonnenen Daten erlaubten den vorsichtigen Schluß auf eine Calcium-unabhängige Interaktion zwischen Sec63p und Calumenin. Um eine weitere Bestätigung der Calcium-abhängigen oder -unabhängigen Interaktion von Calumenin mit Sec63p zu erhalten, sollte eine weitere Methode benutzt werden. Diese bestand im Einsatz von Peptidfiltern. Dabei diente Calmodulin als positive Kontrolle. Hierbei sollte die Bindung von GST-Calmodulin wie GST-Calumenin an verschiedene putative Calmodulin-Bindestellen aus diversen Membranproteinen des ER (vor allem Sec61p-Translokon-Komplex und Sec63p) untersucht werden. Für Calmodulin konnte bereits eine Calcium-abhängige Bindung an den Sec61p-Translokon-Komplex mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden (Erdmann, Dissertation, 2009).

Es wurden dafür Peptidfilter mit 10 verschiedenen Peptidsequenzen hergestellt. Sechs dieser Sequenzen entsprachen hierbei putativen Calmodulin-Bindestellen auf dem Sec61p α sowie dem Sec63p (Abb. 4.2; Tab. 4.2.). Die weiteren putativen Bindestellen befanden sich auf dem N-Terminus des Sec61p γ , sowie dem N- wie C-Terminus des ERj1p. Nach einer Analyse der Peptidfilter mittels „PhosphoImaging“ zeigte sich eine teilweise Bindung der [¹⁴C]-markierten Fusionsproteine an die Peptidspots.

Die gebundenen Peptidspots entsprachen dem cytosolischen, N-terminalen Calmodulin-Bindemotiv des Sec61p α , der lumenalen J-Domäne des Sec63p (Abb. 4.2. und Tab. 4.2.) und der ersten cytosolischen Bindestelle auf dem C-Terminus des ERj1p (Abb. 3.19. und Tab. 3.2.). Keine Bindung zeigte der Versuch für den lumenalen Teil des Sec61p α wie auch für die dritte Bindestelle im Sec63p (Tab. 4.2.). Calumenin interagiert mit vorhergesagten putativen Bindemotiven des Calmodulin. Die Bindung von Calumenin an Sec63p J-Domäne ist vor allem ein Indiz für die Interaktion nach Tyedmers *et al.* (2005). Der C-Terminus spielt in Hinsicht auf den Calcium-Leckstrom eher eine untergeordnete Rolle, da eine Regulierung des Leckstroms auf der lumenalen Seite des ERs erfolgen sollte (Giunti *et al.*, 2007; Amer *et al.*, 2009). Die Bindung von Calumenin an die erste cytosolische Domäne des Sec63p scheint unspezifisch zu sein, da Calumenin wie auch GST gleich stark mit der Bindestelle interagieren. Im Nachfolgenden konnte jedoch eine spezifische Bindung der beiden Fusionsproteine an die jeweiligen Peptide der putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p gezeigt werden. Ob diese Bindestelle eine regulierende Funktion ausübt, verbleibt jedoch offen. Es scheint daher tatsächlich eine Interaktion zwischen Calumenin und Sec63p vorzuliegen.

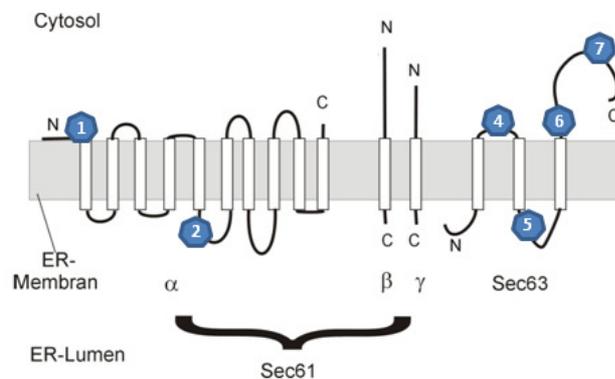


Abb. 4.2.: Nach Julia Benedix (Diplomarbeit, 2007).

Übersicht über die gefundenen positiven Spots für Sec61p und Sec63p. Nach Tabelle 4.2. finden Bindungen an die putativen Calmodulin Bindemotive 1, 5 und 9 statt; 2 und 6, hier fand weder für Calumenin noch Calmodulin eine Bindung statt.

Tab. 4.2.: Zusammenfassung der Interaktionsdaten von Calumenin bzw. Calmodulin mit putativen Calmodulin-Bindemotiven von Sec61p α und Sec63p.

Die Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit gewonnen, die Sequenzen der putativen Bindestellen wurden bioinformatisch bestimmt. + = Bindung; - = keine Bindung; - / + = Unterschiede für 3.2.4.3.1. und 2.; Nb: nicht bestimmt.

Protein	Peptidsequenz der putativen Bindestelle	# in Abb. 4.2.	Bindung von Calumenin bei CaCl ₂	Bindung von Calumenin bei EGTA	Bindung von Calmodulin bei CaCl ₂
Sec61p α N-Terminus	IQKPERKIQFKEKV	1	+	Nb	+
Sec61p α 3. lumenale Domäne	ATRTDKVRALREAFYQR	2	-	Nb	-
Sec63p 1. cytosolische Domäne	LKNIRKVYGRRCMWYR	4	- / +	+	+
Sec63p J-Domäne	TVAEIKKQYRLLSLKYHP	5	+	+	+
Sec63p 2. cytosolische Domäne	WWYRSIRYSGDQILIRT	6	- / +	+	- / +
Sec63p C-Terminus	EEREHKYKIKTIQDLV	7	- / +	+	+

Um ein genaueres Bild der Interaktion von Calumenin mit den putativen Calmodulin-Bindestellen des Sec63p zu erhalten, wurden Peptidfilter mit dem gesamten Sec63p hergestellt und mit [¹⁴C]-markierten Fusionsproteinen in Anwesenheit von Calcium (oder zusätzlich mit EGTA im Falle von Calumenin) inkubiert (vgl. Tab. 4.2.).

Die Analyse mittels „PhosphoImaging“ zeigte eine Bindung von [¹⁴C]-markiertem Calumenin an die gleichen Bindestellen wie [¹⁴C]-markiertes Calmodulin. Ein wichtiges Ergebnis war auch hier die Bindung von Calumenin an die zweite putative Calmodulin-Bindestelle des Sec63p in Anwesenheit sowohl von Calcium als auch von EGTA. Diese Bindestelle liegt in der luminalen J-Domäne des Sec63p. Es konnte damit eine Calcium-unabhängige Interaktion von Calumenin mit der J-Domäne des Sec63p nachgewiesen werden. Auch die erste cytosolische Domäne wie der C-Terminus des Sec63p wurden bei Anwesenheit von Calcium (oder EGTA) durch die markierten Fusionsproteine gebunden. Diese Calcium-unabhängigen Interaktionen sind konform mit dem Ergebnis der „pulldown“-Versuche.

Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich auch eine Bindung der Fusionsproteine an zwei weitere Peptidsequenzen des Sec63p, die keine Sequenzähnlichkeit mit einer putativen Calmodulin-Bindestelle besitzen (Abb. 4.3.). Sie folgen jeweils der dritten bzw. der vierten, putativen Calmodulin-Bindestelle des Sec63p. Diese Bindungen sind für Calumenin ebenfalls Calcium-unabhängig. Es zeigte sich jedoch bei beiden eine starke Bindung in Anwesenheit von EGTA, so dass sich die Frage stellt, ob Calumenin nicht eine regulatorische Rolle über diese Bindungen spielt oder ob es einfach aufgrund der Ladungen (Abb. 4.3.A.) oder einer bestimmten Konformation zu einer unspezifischen Bindung kommt. Für die Calcium-unabhängige Bindung der Fusionsproteine wurden zudem weitere Bereiche gefunden: die putative NLS, die „coiled coil“-Domäne sowie die Sec62p-Interaktionsdomäne des Sec63p. Da diese Bereiche über stark positive Ladungen verfügen, ist die Interaktion von Calumenin kritisch zu betrachten; es könnte hier ebenfalls eine unspezifische Bindung vorliegen.

Calumenin ist den vorliegenden Ergebnissen nach ein Calcium-bindendes EF-Hand-Protein des sekretorischen Weges (Yabe *et al.*, 1979; Vorum *et al.*, 1999), welches im Gegensatz zu den von Jung *et al.* (2006) sowie Sahoo und Kim (2008) untersuchten Proteinen Calcium-unabhängig mit einem Protein der ER-Membran interagiert.

A

```

50 L I M V L A G A S E F D P Q Y N K D A T
51 A G A S E F D P Q Y N K D A T S R P T D
52 F D P Q Y N K D A T S R P T D N I L I P
53 N K D A T S R P T D N I L I P Q L I R E
54 S R P T D N I L I P Q L I R E I G S I N
55 N I L I P Q L I R E I G S I N L K K N E
56 Q L I R E I G S I N L K K N E P P L T C
57 I G S I N L K K N E P P L T C P Y S L K
58 L K K N E P P L T C P Y S L K A R V L L
59 P P L T C P Y S L K A R V L L L S H L A

```

B

```

91 S Q V L D D E D S N N I T V G S L V T V
92 D E D S N N I T V G S L V T V L V K L T
93 N I T V G S L V T V L V K L T R Q T M A

```

Abb. 4.3.: Übersicht über Peptidsequenzen des Sec63p Peptidfilters.

Gezeigt werden die Peptidsequenzen der Spots des Sec63p Peptidfilters, welche keine direkte Calmodulin-Bindestelle aufweisen. Rot markiert sind Histidine, Arginine und Lysine.

Jung *et al.* (2006) konnten in GST-Bindungstests wie in Co-Immunpräzipitationsversuchen eine Calcium-abhängige Interaktion von Calumenin mit dem Ryanodin Rezeptor 1 nachweisen. Zudem konnte Jung *et al.* (2006) mittels einer Adenovirus-vermittelten Überexpression von Calumenin in C2C12 Myoblasten einen erhöhten Koffein-induzierten Calcium-Ausstrom sowie eine verminderte Depolarisations-induzierte Calcium-Aufnahme beobachten. Sahoo und Kim (2008) nutzten ebenfalls ein Adenovirus-System, um den Effekt einer Überexpression von Calumenin auf die Calcium-Ströme in neonatalen Rattenherzen zu untersuchen. Parallel führten Sahoo und Kim (2008) eine Co-Immunpräzipitationsstudie durch, die eine Interaktion von Calumenin und der SERCA zeigte. Es sollte daher im Rahmen einer Weiterbearbeitung der Calumenin-Sec63p-Interaktion ein Überexpressionsexperiment für Calumenin in Zusammenhang mit einer Hemmung der SERCA durchgeführt werden, um eine Wirkung des erhöhten Pegels an Calumenin auf den Leckstrom durch die Pore des Sec61-Translokation-Komplexes zu untersuchen. Eine weitere Möglichkeit wäre die „black lipid bilayer“ Methode (Römer, 2004), bei der gereinigte Sec61p-Komplexe zusammen mit Sec63p in eine Lipid-Doppelschicht eingebaut werden. Durch Zugabe von Calumenin und eines Calcium-Gradienten könnte der Leckstrom bzw. die Interaktion der Proteine elektrophysiologisch gezielt untersucht werden. Welche Funktion die Interaktion zwischen Calumenin und Sec63p nun erfüllt muss noch genauer untersucht werden. Abbildung 4.4. verdeutlicht die sich aus den Ergebnissen ergebenden Deutungsmöglichkeiten:

- a) Calumenin könnte in diesem System ein einfacher Calcium-Puffer sein, oder
- b) Calumenin ändert die Konformation des Sec63p durch Bindung an die J-Domäne und variiert dadurch die Funktion des Sec63p innerhalb des Sec61p-Translokation-Komplexes, oder
- c) Calumenin reguliert durch die Bindung an die J-Domäne des Sec63p die Interaktion von BiP und Sec63p.

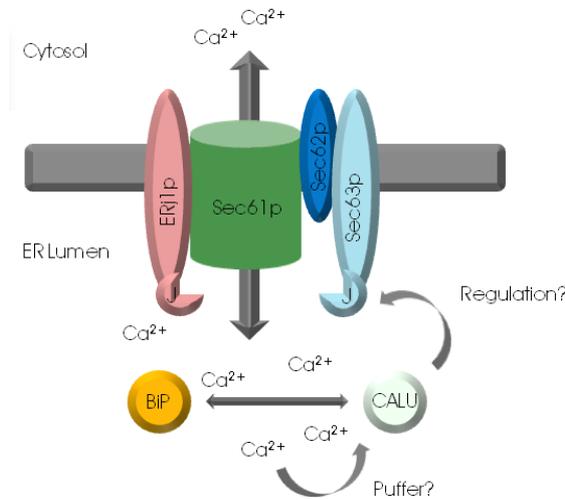


Abb. 4.4.: Systematische Darstellung des Sec61p-Translokon-Komplex mit Calumenin und BiP. Calumenin reguliert Calcium unabhängig Sec63p, dient als Calcium-Puffer oder interagiert mit BiP.

Für STIM1 konnte durch Liou *et al.* (2005) sowie Zhang *et al.* (2005) gezeigt werden, dass die Bindung von Calcium an die EF-Hand des Proteins den Calcium-Einfluss in das ER sowie die Aktivierung der CRAC-Kanäle beeinflusst. Hierbei öffnet die nicht Calcium-gebundene Konformation die CRAC-Kanäle, wohingegen die Calcium-gebundene Form zu keiner Aktivierung führt. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei Calumenin mit seinen sieben EF-Hand-Motiven im Falle des Sec63p vorliegen. Dabei wäre es egal, ob Calumenin Sec63p in An- / Abwesenheit von Calcium bindet: Bei gebundenem Calcium könnte wie oben bereits erwähnt eine Konformationsänderung innerhalb der Interaktion zwischen Sec63p und Calumenin auftreten. Die Änderung der Konformation könnte daraufhin Auswirkungen auf den Leckstrom oder die Proteinsynthese nach sich ziehen. Ebenso könnte eine Trennung der Funktionen bezüglich der Calcium-Bindung und der Interaktion von Calumenin mit Sec63p vorliegen. So konnten Chigri *et al.* (2006) für Tic32p, ein Protein des inneren Transportkomplexes bei Chloroplasten, zeigen, dass dessen Dehydrogenase-Aktivität von seiner Calcium-abhängigen Bindung an Calmodulin entkoppelt ist. Tic32p kann somit entweder NADPH reduzieren oder mit Calmodulin Calcium-abhängig den Transport von Proteinen regulieren. Im Falle von Calumenin und Sec63p könnte ebenfalls eine solche Entkopplung in Bezug auf die umgebende Calcium-Konzentration bestehen: Calumenin dient hier dann als Calcium-Speicher und interagiert wie in den Ergebnissen gezeigt Calcium-unabhängig mit Sec63p.

4.2.4. Calumenin wird bei ER-Stress nicht überproduziert

Unter Einsatz von Stressoren des ERs (Tunicamycin und Thapsigargin) sollte die Regulierung von Calumenin in PC3-Zellen untersucht werden. Nach einer Wachstumsphase der Zellen wurde ein ER-Stress durch Zugabe von Tunicamycin oder Thapsigargin ausgelöst, die gestressten Zellen geerntet und *via* SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich keine Regulierung von Calumenin. Calumenin ist daher ein ER-ständiges Protein, welches nicht an der UPR aufgrund von Tunicamycin und Thapsigargin beteiligt zu sein scheint.

Tunicamycin inhibiert die Glykosylierung von Proteinen (Cronin, Rao und Hampton, 2002; Reimertz, *et al.*, 2003) und führt somit zur Aktivierung der UPR. Da Calumenin ein EF-Hand-Protein des ER darstellt, jedoch kein Chaperon ist, ist keine Regulierung bei Tunicamycin induziertem ER-Stress zu erwarten. Im Gegensatz zu Tunicamycin löst Thapsigargin einen Stress des ERs durch die Blockierung der SERCA aus und reduziert damit die Calcium-Aufnahme in das ER (Thastrup *et al.*, 1990). Im Folgenden wird daher der Calcium-Leckstrom in das Cytosol erhöht. Ong *et al.* (2007) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass bei Inhibierung der SERCA durch Thapsigargin sowie bei gleichzeitiger Inhibierung der Initiationsphase der Proteinsynthese durch Pactamycin, es zu einer sichtbaren Entleerung des ER-internen Calcium-Speichers kommt. Gleichzeitig wird die „store operated Ca²⁺ entry“ Antwort (SOCE) aktiviert, welche zu einer Translokierung des Proteins STIM1 zu der Plasmamembran führt. Hier interagiert STIM1 mit Orai1 und aktiviert so den SOCE-assoziierten Einstrom von Calcium (Zhang *et al.*, 2005; Spassova *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2008; Calahan, 2009; Yuan *et al.*, 2009).

In Zusammenhang mit der Inhibierung der SERCA und der Proteinsynthese, sollten die Calcium-speichernden Proteine des ERs, vor allem die EF-Hand-Proteine wie Calumenin, den Calcium-Leckstrom stärker regulieren. Da Calumenin jedoch nicht hochreguliert vorliegt stellt sich die Frage, ob auch die anderen Mitglieder der CREC-Familie (Yabe *et al.* 1998; Honoré, 2009) eine Rolle bei dem Erhalt der Calcium-Homeostase spielen.

4.3. Calcium-Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Interaktion von Calumenin, einem ER-luminalen EF-Protein, und Sec63p, einem J-Domänen-Protein, welches mit dem Sec61p-Translokation-Komplex assoziiert, genauer untersucht werden. Calumenin wurde mit Sec63p in einem Versuch von Tyedmers et al. (2005) co-immunpräzipitiert. Durch Erdmann (Dissertation, 2009) wurde eine Beteiligung des cytosolischen EF-Hand-Proteins Calmodulin an dem Calcium-Strom über den Sec61p-Translokation-Komplex nachgewiesen. Eine Beteiligung des Sec61p-Translokation-Komplexes am basalen Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums wurde durch Heritage und Wonderlin (2001) gezeigt. Diese Beteiligung wurde in jüngster Zeit mehrfach bestätigt (Pinton und Rizzuto, 2006; Vanden Abeele *et al.*, 2006; Guinti *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007; Verbert *et al.*, 2008; Chami *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2009).

Eine Frage, die sich nun stellte, war, ob Calumenin über Sec63p einen Einfluß auf den Leckstrom des endoplasmatischen Retikulums besitzt. Es konnte eine Calcium-unabhängige Interaktion von Calumenin und Sec63p über ein putatives Calmodulin-Bindemotiv an der J-Domäne des Sec63p festgestellt werden. Eine Kontrolle mit Calmodulin kam zu einem vergleichbaren Ergebnis. Daher stellt sich nun die Frage, in welchem Zusammenhang die Calcium-Unabhängigkeit der Interaktion mit der erhöhten Konzentration an Calcium bei einem Leckstrom erklärt werden kann. Zeigt Calumenin vielleicht eine ähnliche Funktionalität wie Tic32p (Chigri *et al.*, 2006) in Abhängigkeit des gebundenen Calciums? Wirkt sich dies auf die Konformation des Sec63p aus? Diese Fragen sollten durch weitere Versuche zur Interaktion von Sec63p mit Calumenin in Bezug auf unterschiedliche Beladungen der EF-Hände mit Calcium oder mit Deletionsmutanten von Calumenin beantwortet werden. Es bieten sich weiterhin elektrophysiologische Untersuchungen mit den Mutanten von Calumenin an.

Eine Alternative zu dem Calcium-Leckstrom über den Sec61p-Translokation-Komplex stellt ein Calcium-Strom über Presenilin dar (Thinakaran und Sisodia, 2006; Tu *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007). Die Preseniline PS1 und PS2 spielen bei der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle. Presenilin wird ubiquitär exprimiert und ist das katalytische Kernstück des γ -Sekretase-Komplexes, der die *intra*-membrane Proteolyse der β -Amyloid Vorläuferproteine durchführt (Thinakaran und Sisodia, 2006). Tu *et al.* (2006) konnten zeigen, dass PS1 und PS2 einen passiven Calcium-Kanal im endoplasmatischen Retikulum ausbilden können, der bis zu 80% des Calcium-Leckstroms ausmacht. Die Aktivität als Kanal ist jedoch unabhängig von der Aktivität innerhalb der γ -Sekretase. Mutation innerhalb der PS1 und PS2 führen nach Nelson *et al.* (2007) zu einer gestörten Calcium-Homeostase.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ERj7p als Bestandteil des HSP70 / HSP40-Netzwerkes des endoplasmatischen Retikulums charakterisiert. Das HSP40-Homolog ERj7p wurde in *E. coli* synthetisiert und eine HSP70 / HSP40-typische Interaktion von ERj7p mit BiP nachgewiesen, bei der die ATPase-Aktivität von BiP stimuliert wurde. Die Affinität von ERj7p zu BiP wurde im Biacore-System bestimmt. Aufgrund einer Hochregulierung von ERj7p bei Tunicamycin-induziertem ER-Stress kann spekuliert werden, ob ERj7p eine ähnliche Funktion wie ERj4p bei der Regulierung der Faltung von Proteinen einnimmt. Es wurde daher ein weiteres Element des HSP70 / HSP40-Chaperonnetzwerk des ERs charakterisiert.

Darüber hinaus wurde die Interaktion von Calumenin, einem EF-Hand-Protein des ERs, mit Sec63p, einer Einheit des Sec61p-Translokon-Komplexes, in Bezug auf ihre Calcium-Abhängigkeit untersucht. Calumenin wurde in *E. coli* synthetisiert und seine Funktionalität durch die Interaktion mit Sec63p aus rauen Mikrosomen des ERs gezeigt. Die Interaktion von Calumenin und Sec63p war jedoch Calcium-unabhängig. Eine Interaktion von rekombinantem Sec63p und Calumenin konnte nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Bindung von Calumenin an putative Bindemotive innerhalb des Sec63p untersucht. Es wurde eine Bindung von Calumenin an ein putatives lumenales Bindmotiv innerhalb der J-Domäne des Sec63p nachgewiesen. Die Bindung erfolgte für Calumenin Calcium-unabhängig. Aus diesen Daten kann man vorsichtig den Schluss ziehen, dass eine direkte Interaktion zwischen Calumenin und Sec63p gibt.

5. Summary

In the present work ERj7p was characterised as a component of the HSP70 / HSP40 network of the endoplasmic reticulum. A typical HSP70 / HSP40 interaction could be shown between ERj7p and BiP, and the ATPase activity of BiP was stimulated by this interaction. The affinity of ERj7p to BiP was determined in the Biacore system. Because of the upregulation of ERj7p during tunicamycin induced ER stress, one can speculate, that the function of ERj7p is similar to ERj4p in regulating the (re-)folding of proteins.

In addition, the interaction of Calumenin, an EF-hand protein of the ER, with Sec63p, a subunit of the Sec61p translocon complex, was examined concerning its calcium dependency. Calumenin interacted calcium independently with Sec63p from rough microsoms of the ER. This interaction could not be shown for recombinant Sec63p and Calumenin. Furthermore the interaction of Calumenin with putative binding motives within the Sec63p was examined. A binding of Calumenin to the putative luminal binding motive within the J-domain of the Sec63p could be shown. The binding was calcium independent for Calumenin. So from this data, it can be carefully concluded, that Calumenin is interacting directly with Sec63p.

6. Literatur

Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM and Johnson AE (2005) The molecular mechanism underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **168**: 389-399

Alvarez J and Montero M (2002) Measuring $[Ca^{2+}]$ in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium* **32**: 251–260

Austin RC (2009) The Unfolded Protein Response in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*.

Amer MS, Li J, O'Regan DJ, Steele DS, Porter KE, Sivaprasadarao A and Beech DJ (2009) Translocon closure to Ca^{2+} leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**: 910-916.

Anttonen AK, Mahjneh I, Hämäläinen RH, Lagier-Tourenne C, Kopra O, Waris L, Anttonen M, Joensuu T, Kalimo H, Paetau A, Tranebjaerg L, Chaigne D, Koenig M, Eeg-Olofsson O, Udd B, Somer M, Somer H and Lehesjoki AE (2005) The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nat Genet* **37**: 1309-1311

Bardo S, Robertson B, and Stephens GJ (2002) Presynaptic internal Ca^{2+} stores contribute to inhibitory neurotransmitter release onto mouse cerebellar Purkinje cells. *Br J Pharmacol* **137**: 529–537

Benedix J (2006) "Untersuchungen zur Bedeutung der ER-Translocon-Komponenten in Säugerzellen mit Hilfe von RNAi und Immunfluoreszenz", Universität des Saarlandes, Diplomarbeit

Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**: 11-21

Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 517-529

Berridge MJ (2006) Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* **40**: 405-412

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP and Ron (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**: 326-332

Bies C (2002) Qualitative und quantitative Untersuchungen zur Interaktion der Hsp40-Homologen des Endoplasmatischen Retikulums mit dem Hsp70-Chaperon BiP. Universität des Saarlandes, Dissertation

Blau M, Mullapudi S, Becker T, Dudek J, Zimmermann R, Penczek PA and Beckmann R (2005) ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat Struc Mol Biol* **12**: 1015-1016

Borgese D, Blobel G and Sabatini DD (1973) In vitro exchange of ribosomal subunits between free and membrane-bound ribosomes. *J Mol Biol* **74**: 415-438

Bukau B, Weissman J and Horwich A (2006) Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell* **125**: 443-451

Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat Cell Biol* **11**: 669-677

Calbiochem (2009) „calcium “signaling / calcium metabolism“. Website: http://www.emdbiosciences.com/html/cbc/calcium_signaling.htm

Camello C, Lomax R, Petersen OH and Tepikin AV (2002) Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* **32**: 355 - 361

Carla Famá M, Raden D, Zacchi N, Lemos DR, Robinson AS and Silberstein S (2007) The *Saccharomyces cerevisiae* YFR041C/ERJ5 gene encoding a type I membrane protein with a J domain is required to preserve the folding capacity of the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 232-242

Castagna A, Antonioli P, Astner H, Hamdan M, Righetti SC, et al. (2004) A proteomic approach to cisplatin resistance in the cervix squamous cell carcinoma cell line A431. *Proteomics* **4**: 3246-3267

Chami M, Oulès B, Szabadkai G, Tacine R, Rizzuto R and Paterlini-Bréchet P. (2008) Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol Cell* **32**: 641-651

Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, and Mattson MP (2000) Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem* **275**: 18195–18200

Chen JJ, Reid CE, Band V and Androphy EJ (1995) Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* **269**: 529 – 531

Chen X, Easton D, Oh HJ, Lee-Zoon D, Liu X and Subject J (1996) The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **380**: 68-72

Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC and Blond SY (2000) Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem* **275**: 19620–19627

Chigri F, Hörmann F, Stamp A, Stammers DK, Bölter B, Soll J and Vothknecht UC (2006) Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 16051-16056

Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047-1058

Copley RR, Schultz J, Ponting CP and Bork P (1999) Protein families in multicellular organisms. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 408-415

Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ and Maguire PB (2004) Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* **103**: 2096-2104

Corsi AK and Schekman R (1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **137**: 1483-1493

Cronin SR, Rao R and Hampton RY (2002) Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J Cell Biol* **157**: 1017-1028

Dong D, Ko B, Baumeister P, Swenson S, Costa F, Markland F, Stiles C, Patterson JB, Bates SE and Lee AS (2005) Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Res* **65**: 5785–5791

Dudek J, Volkmer J, Bies C, Guth S, Müller A, Lerner M, Feick P, Schäfer KH, Morgenstern E, Hennessy F, Blatch GL, Janoscheck K, Heim N, Frien M, Nastainczyk W and Zimmermann R (2002) A novel type of cochaperone mediates transmembrane recruitment of Dank-like chaperones to ribosomes. *EMBO J* **21**: 2958-2967

Dudek J, Greiner M, Müller A, Hendershot LM, Kopsch K, Nastainczyk W and Zimmermann R (2005) ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 1008-1014

Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L and Zimmermann R (2009) Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1556-1569

Easton DP, Kaneko Y and Subject JR (2000) The Hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress & Chap* **5**: 276-290

Ellgaard L and Ruddock LW (2005) The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* **6**: 28-32

Erdmann F (2009) Zur Regulation der Proteintranslokase des Endoplasmatischen Retikulums in Eukaryoten. Universität Osnabrück, Dissertation.

Erickson RR, Dunning LM, Olson DA, Cohen SJ, Davis AT, Wood WG, Kratzke RA and Holtzman JL (2005) In cerebrospinal fluid ER chaperones ERp57 and calreticulin bind beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* **332**: 50-57

Faitova J, Krekac D, Hrstka R and Vojtesek B (2006) Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cellular & Molecular Biology Letters* **11**: 488-505

Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R and Prevarskaya N (2006) Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* **20**: 1215-1217

Flynn GC, Pohl J, Flocco MT and Rothman JE (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* **353**: 726-730

Fu Y and Lee AS (2006) Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* **5**: 741-744.

Garbi N, Tanaka S, Momburg F and Hammerling GJ (2006) Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol* **7**: 93–102

Gerasimenko JV, Flowerdew SE, Voronina SG, Sukhomlin TK, Tepikin AV, Petersen OH and Gerasimenko OV (2006) Bile acids induce Ca²⁺ release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J Biol Chem* **281**: 40154-40163

Giunti R, Gamberucci A, Fulceri R, Bánhegyi G and Benedetti A (2007) Both translocon and a cation channel are involved in the passive calcium leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **462**: 115–121

Green KN, Demuro A, Akbari Y, Hitt BD, Smith IF, Parker I and LaFerla FM (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J Cell Biol* **181**: 1107-1116

Gross SA, Wissenbach U, Philipp SE, Freichel M, Cavalié A and Flockerzi V (2007) Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *J Biol Chem* **282**: 19375-19384

Grzeskowiak R, Witt H, Drungowski M, Thermann R., Hennig S, et al. (2003) Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **59**: 400-411

Guo Q, Furukawa K, Sopher BL, Pham DG, Xie J, Robinson N, Martin GM, and Mattson MP (1996) Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport* **8**: 379–383

Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, and Mattson MP (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* **17**: 4212–4222

Haas IG and Wabl M (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**: 387-389

Haigh NG and Johnson AE (2002) A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol* **156**: 261–270

Hansen GA, Vorum H, Jacobsen C, Honoré B (2009) Calumenin but not reticulocalbin forms a Ca^{2+} -dependent complex with thrombospondin-1. A potential role in haemostasis and thrombosis. *Mol Cell Biochem* **320**: 25-33

Harding HP, Zhang Y and Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**: 271-274

Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381** (6583): 571-579

Heritage D and Wonderlin WF (2001) Translocon Pores in the Endoplasmic Reticulum Are Permeable to a Neutral, Polar Molecule *J Biol Chem* **276**: 22655-22662

Hermes J, Schneider I, Dewachter I, Caluwaerts N, Kretzschmar H and Van Leuven F (2003) Capacitive calcium entry is directly attenuated by mutant presenilin-1, independent of the expression of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **278**: 2484-2489

Hetz C, Russelakis-Carneiro M, Walchli S, Carboni S, Vial-Knecht E, Maundrell K, Castilla J and Soto C (2005) The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci* **25**: 2793-2802

Hoshino T, Nakaya T, Araki W, Suzuki K, Suzuki T and Mizushima T (2007). Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid-beta peptides. *Biochem J* **402**: 581-589

Honoré B and Vorum H (2000) The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca^{2+} -binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett* **466**: 11-18

Honoré B (2009) The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays* **31**: 262-277

Hseu MJ, Yen CH and Tzeng MC (1999) Characterization of isoforms and genomic organization of mouse calumenin *FEBS Lett* **445**: 440-444

Huang TJ, Sayers NM, Fernyhough P, and Verkhratsky A (2002) Diabetes-induced alterations in calcium homeostasis in sensory neurones of streptozotocin-diabetic rats are restricted to lumbar ganglia and are prevented by neurotrophin-3. *Diabetologia* **45**: 560-570

Jiménez CR, Stam FJ, Wan Li K, Gouwenberg Y, Hornshaw MP, et al. (2005) Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration. *Mol Cell Proteomics* **4**: 120-132

Johnson AE and van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 799–842

Johnson AE (2003) Maintaining the permeability barrier during protein trafficking at the endoplasmic reticulum membrane. *Biochemical Society Transactions* **31**: 1227–1231

Jouset H, Frieden M and Demaurex N (2007) STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to sarco/endoplasmic Ca²⁺ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **282**: 11456-11464

Jung DH, Mo SH and Kim DH (2006) Calumenin, a multiple EF-hands Ca²⁺-binding protein, interacts with ryanodine receptor-1 in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* **343**: 34-42

Kamei J, Taki K, Ohsawa M and Hitosugi H (2000) Modulation of the formalin-induced nociceptive response by diabetes: possible involvement of intracellular calcium. *Brain Res* **862**: 257-261

Kang SW, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Taunton J and Hegde RS (2006) Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* **127**: 999-1013

Kent J, Lee M, Schedl A, Boyle S, Fantes J, Powell M, Rushmere N, Abbott C, van Heyningen V and Bickmore WA (1997) the reticulocalbin gene maps to the WAGR region in human and to the small eye. Harwell deletion in mouse. *Genomics* **42**: 260-267

Khachaturian ZS (1987) Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiol Aging* **8**: 345–346

Kiselyov K, Wang X, Shin DM, Zang W and Muallem S (2006) Calcium signaling complexes in microdomains of polarized secretory cells. *Cell Calcium* **40**: 451-459

Kmoníčková E, Melkusová P, Harmatha J, Vokác K, Farghali H and Zídek Z (2008) Inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase thapsigargin stimulates production of nitric oxide and secretion of interferon-gamma. *European journal of pharmacology* **588**: 85-92

Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ and Mori K (1993) The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **13**: 877-890

Koivu T, Laitinen S, Riento K and Olkkonen VM (1997) Sequence of a human cDNA encoding Cab45, a Ca²⁺-binding protein with six EF-hand motifs. *DNA sequence: the journal of DNA sequencing and mapping* **7**: 217-220

Kopach O, Kruglikov I, Kostyuk P, Voitenko N and Fedirko N (2005) Mechanisms Underlying Leakage of Calcium from the Endoplasmic Reticulum of Acinar Cells of the Submandibular Salivary Gland. *Neurophysiology* **37**: 296-302

Korkotian E, Schwarz A, Pelled D, Schwarzmans G, Segal M, and Futerman AH (1999) Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *J Biol Chem* **274**: 21673–21678

Kretsinger CE et al. (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* **248**: 3313-3326

Kretsinger CE (1987) Calcium coordination and the calmodulin fold: divergent versus convergent evolution. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **52**:487-510

Kurusu J, Honma A, Miyajima H, Kondo S, Okumura M and Imaizumi K (2003) MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppress cell death induced by ER stress. *Genes Cells* **8**: 189-202

Laude AJ and Simpson AW (2009) Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS J* **276**: 1800-1816

Le Gall S, Neuhof A and Rapoport T (2004) The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Mol Biol Cell* **15**: 447-55

Lehmann K, Hause B, Altmann D and Köck M (2001) Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiol* **127**: 436-449

Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL and Birnbaumer L (2008) Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 2895-2900

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr and Meyer T (2005) STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol* **15**: 1235-1241

Liu B, Dai J, Zheng H, Stoilova D, Sun S and Li Z (2003) Cell surface expression of an endoplasmic reticulum resident heat shock protein gp96 triggers MyD88-dependent systemic autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15824–15829

Lomax RB, Camello C, Van Coppenolle F, Petersen OH and Tepikin AV (2002) Basal and physiological Ca^{2+} leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells: Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem* **277**: 26479-26485

Luo S, Mao C, Lee B and Lee AS (2006) GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* **26**: 5688–5697

Macario AJ and Conway de Macario E. (2007) Chaperonopathies and chaperonotherapy. *FEBS Lett* **581**: 3681-3688

Marchler-Bauer A, et al. (2009), CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37** (D): 205-210

Mayer MP and Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 670-684

McMillan DR, Gething MJ and Sambrook J (1994) The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. *Curr Opin Biotechnol* **5**: 540-545

Meldolesi J and Pozzan T. (1998) Jan.; The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* **23**: 10-14

Meyer HA, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehn S, Kalies KU and Hartmann E (2000) Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* **275**: 14550-14557

Murray FE, Landsberg JP, Williams RJ, Esiri MM, and Watt F (1992) Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using proton-induced X-ray analysis. *Ciba Found Symp* **169**: 201-210

Nakazawa T, Nakajima A, Seki N, Okawa A, Kato M, et al. (2004) Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res* **22**: 520-525

Nelsestuen GL and Ostrowski BG (1999) Membrane association with multiple calcium ions: vitamin-K-dependent proteins, annexins and pentraxins. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 433-437

Nelson O, Tu H, Lei T, Bentahir M, de Strooper B and Bezprozvanny I (2007) Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt calcium leak function of presenilin 1. *The journal of clinical investigation* **117**: 1230-1239

Ni M and Lee AS (2007) ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* **581**: 3641-3651

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S and von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**: 1-6

Nixon RA, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, and Beermann M (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* **747**: 77-91

Ong HL, Liu X, Sharma A, Hedge R and Ambudkar IS (2007) Intracellular calcium release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* **453**: 797-808

Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P and Mueckler M (2003) Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem* **278**: 52755-52762

Ostergaard M, Hansen GA, Vorum H and Honoré B (2006) Proteomic profiling of fibroblasts reveals a modulating effect of extracellular calumenin on the organization of the actin cytoskeleton. *Proteomics* **6**: 3509-3519

Ouardouz M, Nikolaeva MA, Coderre E, Zamponi GW, McRory JE, Trapp BD, Yin X, Wang W, Woulfe J, and Stys PK (2003) Depolarization-induced Ca^{2+} release in ischemic spinal cord white matter involves L-type Ca^{2+} channel activation of ryanodine receptors. *Neuron* **40**: 53–63

Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, Harding HP, Goodman AG, Harant H, Garrison JL, Taunton J, Katze MG and Ron D (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* **126**: 727-739

Ozawa M and Muramatsu T (1993): Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca^{2+} -binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J Biol Chem* **268**: 699-705

Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S and Rapoport TA (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**: 561-570

Park J, Easton DP, Chen X, MacDonald IJ, Wang XY and Subject JR (2003) The chaperoning properties of mouse grp170, a member of the third family of hsp70 related proteins. *Biochemistry* **42**: 14893-14902

Paschen W (1996) Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmicreticulum may contribute to the development of ischemic-cell damage. *Med Hypotheses* **47**: 283–288

Paschen W (2001) Dependence of vital cell function on endoplasmic reticulum calcium levels: implications for the mechanisms underlying neuronal cell injury in different pathological states. *Cell Calcium* **29**: 1–11

Paschen W (2003) Mechanisms of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various subcellular compartments. *Cell Calcium* **34**: 305–310

Paschen W (2003) Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* **34**: 365–383

Paschen W, Douthel J, Gissel C, and Treiman M (1996) Depletion of neuronal endoplasmic reticulum calcium stores by thapsigargin: effect on protein synthesis. *J Neurochem* **67**: 1735–1743

Pass HI, Liu Z, Wali A, Bueno R, Land S, Lott D, Siddiq F, Lonardo F, Carbone M and Draghici S (2004) Gene expression profiles predict survival and progression of pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* **10**: 849-859

Pelham HR (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* **15**: 483-486

Singh P, Tang BL, Wong SH and Hong W (1993) Transmembrane topology of the mammalian KDEL receptor. *Mol Cell Biol* **13**: 6435–6441

Pepys MB and Baltz ML (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* **34**: 141-212

Pepys MB, Rowe IF and Baltz ML (1985) C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int Rev Exp Pathol* **27**: 83-111

Pinton P and Rizzuto R (2006) Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* **13**: 1409-1418

Potter MD and Nicchitta CV (2000) Ribosome-independent regulation of translocon composition and Sec61alpha conformation. *J Biol Chem* **275**: 2037-2045

Pouyssegur J, Shiu RPC and Pastan I (1977) Induction of two transformation-sensitive membrane-polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* **11**: 941-947

Rahmatullah M, Ginnan R and Robishaw JD (1995) Specificity of G protein alpha-gamma subunit interactions. N-terminal 15 amino acids of gamma subunit specifies interaction with alpha subunit. *J Biol Chem* **270**: 2946-2951

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM and Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* **276**: 33869–33874

Rapoport TA, Jungnickel B and Kutay U (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**: 271-303

Ray K, Kunsch C, Bonner LM and Robishaw JD (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J Biol Chem* **270**: 21765-21771

Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ and Lee AS (2003) Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* **278**: 20915–20924

Reimertz C, Kögel D, Rami A, Chittenden T and Prehn JH (2003) Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Cell Biol* **162**: 587-597

Robson A and Collinson I (2006) The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation. *EMBO Rep* **7**: 1099-1103

Roemer W (2004) Impedance analysis and single ion channel recordings on pore-suspending lipid bilayers based on highly ordered pore arrays. Universität Regensburg, Dissertation

Roy B and Lee AS (1999) The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stressinducible complex. *Nucl. Acids Res* **27**: 1437-1443

Roy A and Wonderlin WF (2003) The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *J Biol Chem* **278**: 4397-4403

Rutter GA (2006) Moving Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum to mitochondria: is spatial intimacy enough? *Biochemical Society Transactions: Biochemical Society Focused Meetings* **34**: 351–355

Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, and Greene LA (2002) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* **22**: 10690–10698

Sahoo SK and Kim do H (2008) Calumenin interacts with SERCA2 in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol Cells* **26**: 265-269

Schaletzky J and Rapoport TA (2006) Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **17**: 3860-3869

Schatz G and Dobberstein B (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**: 1519-1526

Scherer PE, Lederkremer GZ, Williams S, Fogliano M, Baldini G and Lodish HF (1996) Cab45, a novel Ca²⁺-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol* **133**: 257-268

Schnell DJ and Hebert DN (2003) Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* **112**: 491-505

Seiser RM and Nicchitta CV (2000) The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *J Biol Chem* **275**: 33820-33827

Senderek J, Krieger M, Stendel C, Bergmann C, Moser M, Breitbach-Faller N, Rudnik-Schöneborn S, Blaschek A, Wolf NI, Harting I, North K, Smith J, Muntoni F, Brockington M, Quijano-Roy S, Renault F, Herrmann R, Hendershot LM, Schröder JM, Lochmüller H, Topaloglu H, Voit T, Weis J, Ebinger F and Zerres K (2005) Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjögren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet* **37**: 1312-1314

Shamu CE, Cox JS and Walter P (1994) The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol* **4**: 56-60

Shen C, Hui-Zhao, Wang D, Jiang G, Wang J and Zhang G (2002) Molecular cloning, identification and analysis of lung squamous cell carcinoma-related genes. *Lung Cancer* **38**: 235-241

Shen J, Chen X, Hendershot L and Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Dev Cell* **3**: 99-111

Shen Y, Meunier L and Hendershot LM (2002) Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem* **277**: 15947–15956

Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L and Wek RC (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol* **18**: 7499-7509

Shoshan-Barmatz V and Israelson A (2005) The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: Characterization, modulation and possible function. *The journal of Membrane biology* **204**: 57-66

Simon SM, Blobel G and Zimmerberg J (1989) Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6176-6180

Simon SM and Blobel G (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**: 371-380

Skowronek MH, Rotter M and Haas IG (1999) Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem* **380**: 1133-1138

Small DH (2009) Dysregulation of Calcium Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res.*

Smith IF, Boyle JP, Vaughan PF, Pearson HA, Cowburn RF, and Peers CS (2002) Ca²⁺ stores and capacitative Ca²⁺ entry in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells expressing a familial Alzheimer's disease presenilin-1 mutation. *Brain Res* **949**: 105–111

Spassova MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA and Gill DL (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4040-4045

Srivastava PK (2006) Therapeutic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* **18**: 201–205

Steel DM and Whitehead AS (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* **15**: 81-88

Strynadka NC and James MN (1989) Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **58**: 951-998

Stutzmann GE, Caccamo A, LaFerla FM, and Parker I (2004) Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J Neurosci* **24**: 508–513

Takahashi R and Imai Y (2003) Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease. *J Neurol* **250** Suppl 3: III-25–III-29

Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL, Hayden MR, and Bezprozvanny I (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* **39**: 227–239

Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR and Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2466-2470

Thinakaran G and Sisodia SS (2006) Presenilins and Alzheimer disease: the calcium conspiracy. *Nat Neurosci* **9**: 1354-1355

Tsai J and Douglas MG (1996) A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J Biol Chem* **271**: 9347–9354

Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G and Bezprozvanny I (2006), Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* **126**: 981-993.

Turano C, Coppari S, Altieri F and Ferraro A (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* **193**: 154–163.

Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, Haas IG, Heim N, Nastainczyk W, Volkmer J and Zimmermann R (2000) Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7214-7219

Tyedmers J, Lerner M, Nastainczyk W and Zimmermann R (2005) Calumenin and Reticulocalbin are Associated with the Protein Translocase of the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Sciences* **5**: 70-75

Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y and Lipton SA (2006) S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* **441**: 513–517

Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E and Prevarskaya N (2004) Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* **117**: 4135-4142

Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienki D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov D, Skryma R and Prevarskaja N (2006) Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol* **174**: 535-546

van de Hoef DL, Hughes J, Livne-Bar I, Garza D, Konsolaki M and Boulianne GL (2009) Identifying genes that interact with Drosophila presenilin and amyloid precursor protein. *Genesis* **47**: 246-260

Verbert L, Lee B, Kocks SL, Assefa Z, Parys JB, Missiaen L, Callewaert G, Fissore RA, De Smedt H and Bultynck G (2008) Caspase-3-truncated type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor enhances intracellular Ca²⁺ leak and disturbs Ca²⁺ signalling. *Biol Cell* **100**: 39-49

Verkhratsky A (2005). Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiol Rev* **85**: 201-279

von Heijne G (1981) On the hydrophobic nature of signal sequences. *Eur J Biochem* **116**: 419-422

Vorum H, Liu X, Madsen P, Rasmussen HH and Honoré B (1998) Molecular cloning of a cDNA encoding human calumenin, expression in *Escherichia coli* and analysis of its Ca²⁺-binding activity. *Biochim Biophys Acta* **1386**: 121-131

Vorum H, Hager H, Christensen BM, Nielsen S and Honoré B (1999) Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium. *Exp Cell Res* **248**: 473-481

Vorum H, Jacobsen C and Honoré B (2000) Calumenin interacts with serum amyloid P component. *FEBS Lett* **465**: 129-34

Völzing C (2004) Untersuchungen zur Biogenese von Proteinen am endoplasmatischen Retikulum. Universität des Saarlandes, Dissertation

Wagner R, Erdmann F, Harsman A and Honigsmann A. (2008) Structure of the Sec61-Complex. In: Zimmermann R (eds) *Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum*. Landes Bioscience, Austin

Wajih N, Sane DC, Hutson SM and Wallin R (2004) The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem* **279**: 25276-25283

Wajih N, Hutson SM and Wallin R (2006) siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production. *Blood* **108**: 3757-3760

Wajih N, Hutson SM, Wallin R (2007) Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem* **282**: 2626-2635

Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A and Sane DC (2001) A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J* **15**: 2542-2544

Walsh P, Bursac D, Law YC, Cyr D, and Lithgow T (2004) The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* **5**: 567-571

Weber JT, Rzigalinski BA and Ellis EF (2001) Neurons Causes Changes in Intracellular Calcium Stores and Capacitative Calcium Influx. *J Biol Chem* **276**: 1800-1807

Weber JT, Rzigalinski BA, and Ellis EF (2002) Calcium responses to caffeine and muscarinic receptor agonists are altered in traumatically injured neurons. *J Neurotrauma* **19**: 1433-1443

Weis K, Griffiths G and Lamond AI (1994): The endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55 kDa is a novel EF-hand protein retained in the endoplasmic reticulum by a carboxyl-terminal His-Asp-Glu-Leu motif. *J Biol Chem* **269**: 19142-19150

Weitzmann A, Volkmer J and Zimmermann R (2006) The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of S11 function in man and mouse. *FEBS Lett* **580**: 5237-5240

Weitzmann A, Baldes C, Dudek J and Zimmermann R (2007) The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *FEBS J* **274**: 5175-5187

Weitzmann A (2007) Untersuchungen zur Rolle der Komponenten der Hsp70/Hsp40-Chaperonsysteme im Cytosol und Endoplasmatischen Retikulum der Pankreazelle. Universität des Saarlandes, Dissertation

Wirth A, Jung M, Bies C, Frien M, Tyedmers J, Zimmermann R and Wagner R (2003) The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol Cell* **12**: 261-268

Wozniak AL, Wang X, Stieren ES, Scarbrough SG, Elferink CJ and Boehning D (2006) Requirement of biphasic calcium release from the endoplasmic reticulum for Fas-mediated apoptosis. *J Cell Biol* **175**: 709-714

Wuytack F, Raeymaekers L, and Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* **32**: 279–305

Yabe D, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K and Honjo T (1997) Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J Biol Chem* **272**: 18232-18239

Yabe D, Taniwaki M, Nakamura T, Kanazawa N, Tashiro K and Honjo T (1998) Human calumenin gene (CALU): cDNA isolation and chromosomal mapping to 7q32. *Genomics* **49**: 331-333

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS and Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same protease that process SREBPs. *Mol Cell* **6**: 1355-1364

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T and Mori K (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* **273**: 33741-33749

Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M and Mori K (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **20**: 6755-6767

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T and Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in Response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**: 881-891

Young BP, Craven RA, Reid PJ, Willer M and Stirling CJ (2001) Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *EMBO J* **20**: 262-71

Yu R and Hinkle PM (2000) Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators. *J Biol Chem* **275**: 23648-23653

Yurimoto S, Hatano N, Tsuchiya M, Kato K, Fujimoto T, Masaki T, Kobayashi R and Tokumitsu H (2009) Identification and Characterization of Wolframin, the Product of the Wolfram Syndrome Gene (WFS1), as a Novel Calmodulin-Binding Protein. *Biochemistry* **48**: 3946–3955

Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA and Cahalan MD (2005) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* **437**: 902-905

Zhao L, Long-Guess C, Harris BS, Lee JW und Ackerman SL (2005) Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Gen* **37**: 974-979

Zimmermann R (1998) The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **379**: 275-282

Zimmermann R, Müller L and Wullich B (2006) Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends Mol Med* **12**: 567-573

Zimmermann R and Blatch GL (2009) A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends Parasitol* **25**: 147-150

Zupicich J, Brenner SE and Skarnes WC (2001) Computational prediction of membrane-tethered transcription factors. *Genome Biol* **2**: RESEARCH0050

Publikationen

Zahedi RP^{1*}, Völzing C^{2*}, Schmitt A^{2*}, Frien M^{2*}, Jung M², Dudek J², Wortelkamp S¹, Sickmann A^{1,3} and Zimmermann R² (2009) Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics* **9**: 1-11

* These authors contributed equally to this work.

¹ Department of Bioanalytics, Institute for Analytical Sciences (ISAS), Dortmund, Germany

² Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University, Homburg, Germany

³ Medizinisches Proteom-Center (MPC), Ruhr-Universität Bochum, Bochum, Germany

Lebenslauf

Andreas Schmitt

Geboren 31. Oktober 1977 in Saarlouis

Verheiratet, eine Tochter

07/2006 – 08/2009 Universität des Saarlandes, Homburg
Fakultät für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Graduiertenkolleg 1326 „Calcium signaling and cellular nanodomains“
Prof. Dr. Richard Zimmermann

Promotion

Thema der Doktorarbeit: "Charakterisierung von Interaktionen der HSP40-Proteine Sec63p und ERj7p"

10/1998 - 11/2005 Albert-Ludwigs Universität, Freiburg
Fakultät für Biologie II
Mikrobiologie
Prof. Dr. Jürgen Weckesser

Dipl. Biologe

Thema der Diplomarbeit: "Hemmung proteolytischer Enzyme durch die cyanobakteriellen Peptide Microginine und Oscillamid Y"

08/1988 - 07/1997 Gymnasium am Stefansberg, Merzig

Abitur

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Zimmermann angefertigt. Die experimentellen Arbeiten wurden von Juli 2006 bis April 2009 durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann, für die Vergabe des interessanten Themas, seine Geduld und für seine ruhige und unermüdliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dieter Bruns und Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi danke ich für Ihre Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Simone Aaman, Frau Dr. Johanna Dudek, Herrn Dr. Markus Greiner und Frau Dipl. Biologin Linda Müller für die Überlassung von Vektoren, RMs, gereinigten Proteinen und Antikörpern bedanken.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen danke ich sehr Herrn PD Dr. Martin Jung, Herrn Dr. Markus Greiner, Frau Dr. Johanna Dudek, Herrn Dipl. Biologen Carsten Burgard und Frau Dipl. Biologin Linda Müller sowie allen Kollegen und Kolleginnen.

Bei allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Zimmermann und PD Dr. Gabriel Schlenstedt bedanke ich mich für das nette Arbeitsklima und die sehr gute Zusammenarbeit sowie die immense Hilfsbereitschaft, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank auch an die Mitglieder des GraKo 1326 und alle Stipendiaten für ein anregendes und angenehmes Arbeitsklima.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. Markus Greiner und Frau Dr. Stephanie Caesar.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meiner Frau Vita und meiner Tochter Maria, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachten.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG.