

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

Funktionale Charakterisierung der ER-luminalen Proteine BiP,  
Grp170 und Sil1 hinsichtlich der Zellvitalität und der  
Protein-Biogenese

*Dissertation*

*zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von *Sabine Cappel*

geboren am 18.12.1979 in Saarbrücken

Tag des Promotionskolloquiums:	2011
Dekan:	Prof. Dr.
Vorsitzender:	Prof. Dr.
Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Zimmermann
	Prof. Dr.
Akademischer Mitarbeiter:	Dr.

**„Es ist nicht genug, zu wissen, man muss auch anwenden;  
es ist nicht genug, zu wollen, man muss auch tun.“**

Johann Wolfgang von Goethe

Meinen Eltern gewidmet

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
2.1 Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum.....	6
2.1.1 Das Sec61-Translokon .....	6
2.1.2 Cotranslationaler Transport.....	9
2.1.3 Posttranslationaler Transport .....	12
2.2 Das ER-Chaperonsystem .....	15
2.2.1 Das Hsp70 Chaperon-System .....	15
2.2.1.1 Hsp70 und der ATPase-Zyklus .....	17
2.2.1.2 Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Hsp40 Cochaperone .	17
2.2.2 Das Hsp70 Chaperon BiP.....	20
2.2.3 Kar2p, das Hsp70-Homog im ER der Hefe .....	23
2.2.4 Das molekulare Chaperon Grp170.....	23
2.2.5 Weitere Chaperone des Endoplasmatischen Retikulums.....	25
2.2.5.1 Die Hsp90-Familie .....	25
2.2.5.2 Lektine.....	26
2.2.5.3 Faltungsenzyme.....	27
2.2.6 Der Nukleotidaustauschfaktor Sil1 .....	28
2.2.6.1 Sil1 als Regulator des Hsp70 Chaperons BiP .....	29
2.2.6.2 Sil1 und das Marinesco-Sjögren Syndrom (MSS).....	29
2.3 Chaperon/Co-Chaperon-assoziierte Krankheiten.....	31
2.4 Die „Unfolded Protein Response“ .....	32
2.5 Zielsetzung der Arbeit.....	34
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>36</b>
3.1 Material .....	36
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
3.1.2 Chemikalien .....	37
3.1.3 Enzyme.....	38
3.1.4 Bakterienstämme.....	39
3.1.5 Antikörper .....	39
3.1.6 Oligonukleotide.....	40
3.1.7 Plasmide .....	42
3.1.8 Zelllinien .....	43
3.2 Methoden.....	44
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) .....	44
3.2.2 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)	46
3.2.2.1 „Nass-Blot“-Methode.....	46
3.2.3 Immunologische Detektion von Proteinen.....	46

3.2.4 Ablösen von Antikörpern von der PVDF-Membran.....	48
3.2.5 Autoradiographie, Phosphorimaging und Densitometrie.....	48
3.2.5.1 Autoradiographie und Phosphorimaging .....	48
3.2.5.2 Densitometrie .....	49
3.2.6 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in verschiedenen Zelllinien ....	49
3.2.7 <i>In vitro</i> Synthese von Proteinen .....	51
3.2.7.1 <i>In vitro</i> Transkription .....	51
3.2.7.2 <i>In vitro</i> Translation.....	52
3.2.8 Transport <i>in vitro</i> synthetisierter Proteine in Hundepankreasmikrosomen (RM) und semi-permeabilisierten Säugerzellen (Zell-ER).....	53
3.2.8.1 Präparation von Säugerzell-ER und Transportansatz.....	53
3.2.8.2 Sequestrierung.....	54
3.2.8.3 Transportstudien über Messung der Lumineszenz von pGluc .....	57
3.2.9 Zellkulturversuche.....	59
3.2.9.1 Kultivierung von Zellen .....	59
3.2.9.2 Zellextraktzubereitung .....	59
3.2.9.3 Stress-Induktion durch Behandlung mit Tunicamycin.....	60
3.2.9.4 Transfektion von Zelllinien.....	61
3.2.9.4.1 Plasmid-Transfektion mit FuGENE HD .....	61
3.2.9.4.2 Plasmid-Transfektion mit Effectene.....	61
3.2.9.4.3 Plasmid-Transfektion mit HiPerFect.....	61
3.2.9.4.4 siRNA-Transfektionen (RNA-Interferenz).....	62
3.2.9.5 Methoden zur Untersuchung der Zellvitalität und Morphologie .....	64
3.2.9.5.1 Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> -Kit zur Bestimmung der Nekrose (LDH-Assay) .....	64
3.2.9.5.2 WST-1 Assay.....	65
3.2.9.5.3 Zellwachstumsanalyse (xCELLigence).....	66
3.2.9.5.4 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	67
3.2.9.5.4.1 CFSE-Lebendzell-Färbung.....	68
3.2.9.5.4.2 Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung .....	69
3.2.9.5.5 ER-Tracker <sup>TM</sup> - Färbung.....	70
3.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	72
3.2.11 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	73
3.2.12 Quantitative „real-time“ PCR .....	74
3.2.13 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen .....	76
3.2.14 Behandlung von Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase .....	76
3.2.15 Agarosegelelektrophorese .....	77
3.2.16 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Fällung .....	77
3.2.18 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	79
3.2.19 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	80

3.2.20 Kultivierung der Bakterien.....	80
3.2.21 Isolierung von Plasmiden mittels Plasmid-DNA-Minipräparation.....	80
3.2.22 DNA-Reinigung mit dem „SureClean-Kit“ .....	82
3.2.23 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Midipräparation („JETSTAR-Kit“) .....	82
3.2.24 Bestimmung von Reinheit und Konzentration isolierter DNA.....	83
3.2.25 RNA-Präparation aus Säugerzellen.....	83
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
4.1 Das HSP70 Chaperon BiP.....	85
4.1.1 Depletion des HSP70 Chaperons BiP mittels RNA-Interferenz.....	86
4.1.2 Wachstums- und Zellvitalitäts-Assays BiP depletierter Zellen .....	88
4.1.2.1 Bestimmung der Zellzahlen BiP depletierter HeLa- und PC3-Zellen	88
4.1.2.2 CFSE-Färbung BiP-depletierter Zellen.....	91
4.1.2.3 WST-1 Assay BiP depletierter HeLa- und PC3-Zellen .....	93
4.1.3 Einfluss der Suppression von BiP auf die Zellmorphologie.....	95
4.1.3.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen BiP depletierter Zellen.....	95
4.1.3.2 Untersuchung der Stabilität Aktin-bindender Cytoskelettproteine ....	97
4.1.3.3 ER-Färbung BiP-depletierter Zellen .....	99
4.1.4 Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Depletion von BiP.....	100
4.1.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose und Nekrose nach BiP Depletion.....	103
4.1.6 Transportstudien in BiP depletierte Zellen .....	106
4.1.7 Komplementationsstudien mit <i>BIP</i> überexprimierenden Zellen.....	110
4.1.8 Einfluss der Überexpression von <i>BIP</i> auf die Zellvitalität .....	111
4.2 Kar2p, das Hefeortholog zu BiP .....	113
4.2.1 Expression von <i>KAR2</i> in Säugerzellen.....	114
4.2.2 Einfluss der Expression von <i>KAR2</i> auf die Vitalität von Säugerzellen ..	117
4.2.3 Auswirkungen der Expression von <i>KAR2</i> auf den Proteinimport von Säugerzellen .....	119
4.3 Der Nukleotidaustauschfaktor Sil1 .....	123
4.3.1 Depletion von Sil1 mittels RNA-Interferenz .....	123
4.3.1.1 Nachweis der Depletion von Sil1 mittels Immunfluoreszenz- Mikroskopie .....	126
4.3.2 Zellspezifische Folgen des Ausfalls von Sil1 .....	127
4.3.3 Einfluss der Depletion von Sil1 auf die Zellmorphologie .....	132
4.3.4 Untersuchungen zur Akkumulation und Ubiquitinierung von Proteinen nach Depletion von Sil1 .....	135
4.3.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose und Nekrose nach Sil1 Depletion.....	138

4.3.6 Untersuchungen zum Einfluss der Depletion von Sil1 auf den Proteintransport .....	140
4.3.7 Überexpression von <i>SIL1</i> in Säugerzellen .....	141
4.3.8 Einfluss der Überexpression von <i>SIL1</i> auf die Zellvitalität .....	143
4.3.9 Gehalt an Sil1 in verschiedenen Zelllinien .....	145
4.4 Das molekulare Grp170 Chaperon.....	148
4.4.1 Depletion von Grp170 mittels RNA-Interferenz.....	148
4.4.2 Zellspezifische Folgen des Ausfalls von Grp170 .....	151
4.4.3 Einfluss der Depletion von Grp170 auf die Zellmorphologie.....	155
4.4.4 Untersuchungen zur Akkumulation und Ubiquitinierung von Proteinen nach Depletion von Grp170 .....	158
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>161</b>
5.1 Charakterisierung des Hsp70 Chaperons BiP .....	161
5.1.1 BiP-depletierte Zelllinien .....	161
5.1.2 Auswirkungen des Verlustes von BiP auf das Zellwachstum und die zelluläre Stressreaktion .....	163
5.1.3 Der Einfluss des Verlustes von BiP auf die Zellmorphologie .....	167
5.1.4 Der Einfluss des Verlustes von BiP auf den Proteintransport.....	169
5.2 Charakterisierung der Rolle von Kar2p in Säugerzellen.....	172
5.3 Charakterisierung der Rolle von Sil1 .....	176
5.3.1 Sil1-depletierte Zelllinien .....	176
5.3.2 Auswirkungen des Verlustes von Sil1 auf das Zellwachstum und die zelluläre Stressreaktion .....	177
5.3.3 Der Einfluss des Verlustes von Sil1 auf die Zellmorphologie.....	182
5.3.4 Der Einfluss des Verlustes von Sil1 auf den Proteintransport .....	183
5.4 Charakterisierung der Funktion von Grp170 in Säugerzellen.....	185
5.4.1 Grp170-depletierte Zelllinien.....	185
5.4.2 Auswirkungen des Verlustes von Grp170 auf das Zellwachstum und die zelluläre Stressreaktion .....	186
5.4.3 Der Einfluss des Verlustes von Grp170 auf die Zellmorphologie .....	188
5.5 Modell des Wirkmechanismus von BiP-Sil1-Grp170 .....	189
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>190</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>214</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (1Å = 0,1 nm)
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
ADPLD	Autosomal dominant polycystic liver disease
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BD	Bindedomäne
bidest	bidestilliert
BiP	Immunoglobulin-schwere Kette bindendes Protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure
CFDASE	<u>C</u> arboxy <u>f</u> luorescein <u>D</u> iacetat <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
CFSE	<u>C</u> arboxy <u>f</u> luorescein <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
Ci	Curie
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DBD	DNA-bindende Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	„double-stranded“
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	„endoplasmic reticulum associated protein degradation“
<i>et al.</i>	et alii = und andere
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Enzym
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	„green fluorescent protein“
GTP	Guanosintriphosphat
Grp78 (BiP)	„glucose-regulated protein“ 78 (kDa)
Grp94	„glucose-regulated protein“ 94 (kDa)
Grp170	„glucose-regulated protein“ 170 (kDa)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
Kan	Kanamycin
Kar2	Karyogamie-Mutante 2
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	Molarität (mol/l)
mA	milli-Ampere
$\mu$ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
$\mu$ m	Mikrometer
mm	Millimeter
$\mu$ M	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	„messenger“- Ribonukleinsäure

---

MSS	Marinesco Sjögren Syndrom
MVP	Mikrosomenverdünnungspuffer
MW	Molecular weight = Molekulargewicht
n	nano ( $10^{-9}$ )
NAC	„nascent polypeptide-associated complex“
NEF/NAF	Nucleotide exchange factor = Nukleotidaustauschfaktor
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	“open reading frame” = offener Leserahmen
P	Proteinase K
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polyethylenglycol
pGluc	Prä-Gaussia-Luziferase
pL	Prolaktin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
ppL	Präprolaktin
PRKCSH	„protein kinase C substrate 80 K-H“
PT	Proteinase K + Triton X-100
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RM	Rauhe Hundepankreasmikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAsin	Ribonukleaseinhibitor
RNC	“ribosome-nascent chain-complex”
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Saccharose
Sbh1p	Sec sixty-one beta homolog
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae

SDS	Natriumdodecylsulfat
SPC	Signalpeptidasekomplex
SPPase	Signalpeptidpeptidase
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signal recognition particle = Signalerkennungspartikel
Ssh1p	Sec sixty-one homolog
Sss1p	Sec sixty-one suppressor
SubAB	Subtilase AB5 Zytotoxin
TB	"Terrific Broth"
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranhelix
TRAM	„Translocating chain-associated membrane protein“
TRAP	„Translocon-associated protein complex“
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Units, relative Enzymeinheiten
UdS	Universität des Saarlandes
UPR	„unfolded protein response“
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumenprozent (volume/volume)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent (weight/volume)

Ein- beziehungsweise Dreibuchstabencode 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
X		beliebige Aminosäure			

## 1. Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit wurden BiP und Grp170, zwei wichtige Chaperone im ER-Lumen, sowie der Nukleotidaustauschfaktor Sil1 funktionell charakterisiert. Für die Charakterisierung wurde die siRNA-basierte Depletion dieser Proteine in verschiedenen Zelllinien etabliert. Unter Verwendung unterschiedlicher molekularbiologischer Assays wurden die mit dem Verlust dieser Proteine einhergehenden Phänotypen bestimmt. Die funktionelle Bedeutung von BiP und Sil1 bezüglich des Proteintransportes wurde über *in vitro* Translation von Vorstufenproteinen in permeabilisierten, depletierten Zellen untersucht.

Mit Hilfe der siRNA-Interferenz-Technologie konnte der zelluläre Gehalt der Proteine erfolgreich minimiert werden. Für das Hsp70 Chaperon BiP wurden in HeLa-Zellen durchschnittliche Depletionsraten von mehr als 85%, in PC3-Zellen von ca. 80% erzielt. Der Restproteingehalt des Nukleotidaustauschfaktors Sil1 lag in HeLa-Zellen unter 10%, während der von Grp170 in HeLa-Zellen im Durchschnitt 13% und in PC3-Zellen 18% betrug. Der Verlust von Sil1 und Grp170 konnte zudem über Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden. Zusätzlich ließ sich auf mRNA-Ebene die Depletion von Sil1 nachweisen.

Für das Hsp70 Chaperon BiP konnte mit Hilfe von Zellwachstums- und Zellvitalitäts-Assays gezeigt werden, dass es sowohl für HeLa- als auch für PC3-Zellen essentiell ist. Untersuchungen hinsichtlich ER-Stress lieferten eindeutige Hinweise auf eine Induktion der „unfolded protein response“ (UPR). Eine Induktion der Apoptose konnte ebenso detektiert werden. Zellmorphologische Auswirkungen wurden dagegen nicht beobachtet. Mittels der durchgeführten Transportstudien konnte eine Beteiligung von BiP am Proteintransport in Säugerzellen nicht nachgewiesen werden. Anhand des erbrachten Nachweises, dass der Verlust von BiP in Zellen letal ist, konnte demnach die in *in vitro* Studien beschriebene Funktion von BiP als wichtiger Regulator die Homöostase des ER aufrechtzuerhalten, bestätigt werden. Die durch Alder *et al.* (2005) *in vitro* gemachte Beobachtung des dominant-negativen Effektes von Kar2p hinsichtlich des Verschließens der Translokationspore konnte mit den hier durchgeführten Transportstudien nach Überexpression von *KAR2* in Säugerzellen nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus wurde erstmals gezeigt, dass Sil1 in HeLa-Zellen essentiell ist. Entgegen den Annahmen von Weitzmann *et al.* (2007), dass Grp170 möglicherweise als alternativer Nukleotidaustauschfaktor zu Sil1 agiert, kann Grp170 den Funktionsausfall von Sil1 nicht kompensieren. In PC3-Zellen wurde auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse kein Sil1 nachgewiesen. Dies lässt auf ein zell-/gewebespezifisches Vorkommen des Proteins schließen und zeigt, dass das Protein dort offenbar nicht essentiell ist. Diese Annahme wird durch die innerhalb der MSS-Patienten sowie der „woozy“-Mäuse beobachteten selektiven Betroffenheit unterstützt. Die Wachstums- und Vitalitätsstudien von Grp170 in PC3-Zellen ließen erkennen, dass das Protein essentiell ist, was vor diesem zellulären Hintergrund darauf schließen lässt, dass Grp170 in PC3-Zellen die Funktion von Sil1, als Nukleotidaustauschfaktor von BiP zu agieren, übernimmt. Für HeLa-Zellen wurde bei Depletion des Chaperons hingegen keine essentielle Funktion nachgewiesen.

Die erhobenen Daten führen zur Annahme, dass die Nukleotidaustauschaktivität von BiP nur durch Sil1 reguliert wird und dass Grp170 lediglich in den Zellen die Funktion als alternativer Nukleotidaustauschfaktor übernimmt, die *per se* kein Sil1 enthalten. Die beobachtete Letalität nach Verlust der Nukleotidaustauschfaktoren scheint womöglich auf eine gestörte Funktion von BiP zurückzuführen zu sein, womit die Wichtigkeit eines funktionierenden Zusammenspiels verschiedener Komponenten des ER-ständigen Hsp70 Chaperonnetzwerks gezeigt werden konnte.

Darüber hinaus konnten innerhalb dieser Arbeit erstmals Plasmide hergestellt werden, über die *BIP*, das Hefehomolog *KAR2* sowie *SIL1* erfolgreich in Säugierzellen überexprimiert werden. Zellwachstums- sowie Zellvitalitätsstudien führten hierbei zu keinen phänotypischen Konsequenzen. Hinweise auf ER-Stress durch Induktion der UPR ergaben sich ebenfalls nicht. Diese Plasmide können für weiterführende Studien, wie beispielsweise für Komplementationsstudien, eingesetzt werden. Ein interessanter Ansatzpunkt hierzu wäre, ob der letale Effekt nach Verlust von Grp170 in PC3-Zellen möglicherweise durch Überexpression von *SIL1* kompensiert werden könnte, wie es bereits in Hefen für *Aire1* *Alhs1* Doppelmutanten beschrieben wurde (Tyson & Stirling, 2000).

## Summary

### Functional characterization of the ER-luminal proteins BiP, Grp170 and Sil1 regarding cell vitality and protein biogenesis

The two important chaperones BiP and Grp170 as well as the nucleotide exchange factor Sil1 were functionally characterized. For this characterization siRNA-based depletion of these proteins was established. Using different molecular biological assays, phenotypes associated with the loss of these proteins were determined. The functional meaning of BiP and Sil1 concerning the protein transport into the ER was examined by *in vitro* synthesis of precursor proteins in the presence of permeabilized depleted cells.

Using siRNA interference technology, cellular content of proteins could be effectively minimized. Average depletion rates of more than 85% in HeLa-cells and about 80% in PC3-cells were achieved. Residual protein content of nucleotide exchange factor Sil1 was less than 10% in HeLa-cells, while the one of Grp170 in these cells was averaged 13% and in PC3-cells about 18%. Loss of Sil1 and Grp170 could also be approved by immunofluorescence microscopy. Additionally, depletion of Sil1 on the mRNA-level was demonstrated.

Essentiality of the Hsp70 chaperone BiP for HeLa- as well as PC3-cells could be shown by cell growth assays and cell vitality assays. Analysis of ER stress provided clear indication of induction of the unfolded protein response (UPR). Induction of apoptosis was detected as well, while cell morphological effects couldn't be observed. Involvement of BiP in protein transport in mammalian cells was not detected in transport studies. Thus, with the help of the evidence that loss of BiP in cells is lethal the function of BiP described in *in vitro* studies as an important regulator to keep up homeostasis could be affirmed. However, the dominant negative effect of Kar2p in reference to closing the translocation pore observed *in vitro* by Alder *et al.* (2005) could not be verified by performed transport studies after over-expression of *KAR2* and in mammalian cells.

Moreover, for the first time, essentiality of Sll1 in HeLa-cells was shown. Against assumptions of Weitzmann *et al.* (2007), that Grp170 might act as an alternative nucleotide exchange factor, loss of Sll1's function couldn't be compensated by Grp170. In PC3 cells Sll1 wasn't detected by western blot analysis on protein level. This suggests cell/tissue specific occurrence of the protein and non-essentiality that is supported by the selective concernment observed in „woozy“ mice as well as MSS patients. Growth and vitality studies of PC3-cells showed that Grp170 is essential suggesting that Grp170 regulates the nucleotide exchange activity of BiP in these cells. In contrast depletion of Grp170 in HeLa cells wasn't essential.

These data led to the assumption that nucleotide exchange activity of BiP is regulated by Sll1 only and Grp170 assumes the function as an alternative nucleotide exchange factor only in cells which *per se* don't contain Sll1. Observed lethality after loss of nucleotide exchange factors appears to be traced back to faulty function of BiP, illustrating the importance of a well-regulated interaction of different components of the ER resident Hsp70 Chaperone network.

Furthermore, for the first time, plasmides were built, allowing over-expression of *BIP*, yeast homolog *KAR2* as well as *SIL1* in mammalian cells. Cell growth and cell vitality studies led to no phenotypical consequences. Indication of ER stress by induction of UPR was lacking as well. Thus, these plasmids can be used for future studies such as complementation studies.

## 2. Einleitung

Die korrekte Faltung, Assemblierung sowie postrtranslationale Modifikation von Transmembranproteinen und sekretorischen Proteinen, welche mehr als ein Drittel der neu synthetisierten Proteine einer Zelle ausmachen, erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Kaufman, 1999) und ist ein essentieller Bestandteil im Syntheseweg von Proteinen. Voraussetzung für den Proteinimport in das ER ist das Vorhandensein einer meist N-terminalen Signalsequenz (Blobel & Dobberstein, 1975a & b; Görlich & Rapoport, 1993), mit deren Hilfe die Substrate zielgerichtet zur cytosolischen Seite der ER-Membran gesteuert werden. Der anschließende Import erfolgt über eine Translokationspore innerhalb der ER-Membran. Hierbei ist zwischen dem co- und posttranslationalen Transport zu unterscheiden. Während beim posttranslationalen Transport die Proteine im Cytosol vollständig synthetisiert und anschließend importiert werden, werden sie beim cotranslationalen Transport bereits während ihrer Synthese in das Lumen importiert.

Die reifen Proteine werden anschließend über den vesikulären Transport zu ihrem Bestimmungsort transportiert, wohingegen ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine von der Qualitätskontroll-Maschinerie des ER erkannt, zurückgehalten und gegebenenfalls nach retrogradem Transport im Cytosol proteasomal degradiert werden (ERAD) (Hiller *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1996). Kann das Prozessierungspotential die Proteinsyntheseleistung des ER nicht verarbeiten, wird die „Unfolded Protein Response“ (UPR) induziert (Kozutsumi *et al.*, 1988), welche als Folge die Translation zur Entlastung des ER herabsetzt und die Synthese von Chaperonen zur Steigerung der Faltungskapazität erhöht (McMillan *et al.*, 1994; Shamu *et al.*, 1994; Harding *et al.*, 1999). Reichen diese Parameter zur Entlastung nicht aus, leitet die Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein (Zhang & Kaufman, 2004; Kim *et al.*, 2006). In alle Prozesse sind molekulare Chaperons involviert, die neben der Membrantranslokation sowohl die Prozessierung der Vorläuferproteine als auch die Qualitätskontroll-Maschinerie des ER unterstützen.

## 2.1 Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum

Die Information, welcher Transportweg eingeschlagen wird, liegt in der Signalsequenz eines sekretorischen Proteins, welche zwischen 13 und 36 Aminosäuren enthält und sich aus einem positiv geladenen Aminoterminus, einem hydrophoben Kern bestehend aus mindestens sechs Aminosäuren sowie einem hydrophilen Abschnitt zusammensetzt (Von Heijne 1985 & 1986), welcher als Erkennungssequenz für den Signalpeptidase-Komplex (SPC) zwei kurzkettige ungeladene Aminosäuren enthält (Perlman & Halvorson, 1983). Proteine mit hydrophileren Signalsequenzen werden in der Hefe meist posttranslational transportiert, da diese vermutlich auf Grund der geringeren Affinität zum Signalerkennungspartikel (SRP) eine weniger feste Bindung eingehen, wodurch eine Translationspause ausbleibt, welche den cotranslationalen Transport einleiten würde (Ng, *et al.*, 1996). Proteine mit hydrophoberen Signalsequenzen werden demnach bevorzugt cotranslational importiert. Die anschließende Insertion in die Membran erfolgt über die Translokationspore, deren Hauptkomponente in Eukaryoten durch den hoch konservierten Sec61-Komplex gebildet wird.

### 2.1.1 Das Sec61-Translokon

Das Sec61-Translokon des Säugers ist ein trimerer Komplex bestehend aus den Transmembranproteinen Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$  und Sec61 $\gamma$  (Simon & Blobel, 1991; Görlich & Rapoport, 1993; Hartmann, *et al.*, 1994). Sec61 $\alpha$  bildet hierbei mit seinen zehn Transmembrandomänen den proteinführenden Kanal (Mothes *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 1996). Sowohl Sec61 $\beta$  als auch Sec61 $\gamma$  sind Transmembranproteine mit nur einer membrandurchspannenden Domäne und einem luminal liegenden C-Terminus (Görlich *et al.*, 1992a; Görlich & Rapoport, 1993). Sie gehören zur Gruppe der „tail anchor“-Membranproteine, die über ihr C-terminal gelegenes hydrophobes Segment inseriert werden (Hartmann *et al.*, 1994). Elektronenmikroskopische (EM) Analysen sowie Cryo-EM Aufnahmen weisen darauf hin, dass der aktive Sec61-Komplex aus zwei bis vier solcher heterotrimerer Sec61-Subkomplexe besteht (Hanein, *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1997; Menetret *et al.*, 2000; Beckmann *et al.*, 2001; Menetret *et al.*, 2005).

In der Hefe wurde neben dem Sec61-Komplex, bestehend aus Sec61p, Sbh1p (Sec sixty-one beta homolog) und Sss1p (Sec sixty-one suppressor) zusätzlich der

Ssh1-Komplex identifiziert, welcher aus den drei Proteinen Ssh1p (Sec sixty-one homolog), Sbh2p sowie Sss1p besteht (Deshaies & Schekman, 1987; Stirling *et al.*, 1992; Görlich *et al.*, 1992; Esnault *et al.*, 1993; Görlich & Rapoport, 1993; Hartmann *et al.*, 1994; Panzner *et al.*, 1995). Während der Sec61-Kanal zusammen mit Sec62 und Sec63 sowohl für den co- als auch für den posttranslationalen Transport verantwortlich ist, vermittelt der Ssh1-Kanal nur den cotranslationalen Transport. Die drei Komponenten des Hefe-Sec61-Komplexes zeigen eine signifikante Konservierung ihrer Sequenz zu ihren Säugerhomologen Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$  und Sec61 $\gamma$  auf (Hartmann *et al.*, 1994; Van den Berg *et al.*, 2004). Bei den beiden Untereinheiten Sec61p und Sss1p handelt es sich um essentielle Proteine sowohl des co- als auch des posttranslationalen Transportes (Stirling *et al.*, 1992; Esnault *et al.*, 1993). Analog zu Sec61 $\alpha$  durchspannt Sec61p mit seinen zehn Transmembrandomänen die Lipid-Doppelschicht des ER und bildet so die Hauptkomponente des proteinleitenden Kanals (Wilkinson *et al.*, 1996). Von Osborne *et al.* (2005) wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem innerhalb des Kanals eine Art „Stöpsel“ vorhanden ist, welcher während der Proteintranslokation den Kanal auf der luminalen Seite öffnet und schließt. Sowohl Sbh1p als auch Sss1p sind C-terminal inserierte Membranproteine in naher Assoziation mit Sec61p (Panzner *et al.*, 1995). Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass das Translokon selbst einen wässrigen, Ionen-durchlässigen Kanal, von dynamischer Struktur bildet, dessen innerer Durchmesser im inaktiven, Ribosomen-ungebundenen Zustand 9-15 Å, und im aktiven, Ribosomen-gebundenen Zustand, 40-60 Å beträgt (Hamman *et al.*, 1997 & 1998; Wirth *et al.*, 2003). Studien von Hanein *et al.* (1996) haben gezeigt, dass die Bindung eines Ribosoms zur Oligomerisierung mehrerer solcher heterotrimerer Sec61-Komplexe führt.

In *E. coli* erfolgt der Proteintransport durch den SecYEG-Komplex (Brudage *et al.*, 1990), dessen Kern aus zwei in einer Ringstruktur angeordneten heterotrimeren Komplexen besteht (Mitra *et al.*, 2005). Basierend auf der Kristallstruktur des inaktiven SecYE $\beta$ -Komplexes aus dem Archaeen *Methanococcus janaschii* sowie anhand von Cryo-EM Studien mit an nicht-translatierenden Ribosomen gebundenem SecY wurde postuliert, dass ein einzelnes Heterotrimer den proteinführenden Kanal bildet (Van den Berg *et al.*, 2004; Menetret *et al.*, 2007). Die zehn Transmembranhelices von SecY bilden auch hierbei die proteinleitende Pore, welche aus zwei spiegelbildlich angeordneten Domänen aus jeweils fünf Transmembranhelices, TM1-TM5 bzw. TM6-TM10, bestehen, deren N- sowie C-Terminus ins Cytosol exponiert sind. Eine kleine Helix

(TM2a), welche von der extrazellulären Seite in den Kanal ragt, verschließt zudem im inaktiven Zustand den Kanal. Unter der Annahme, dass nur ein heterotrimerer Komplex den proteinleitenden Kanal bildet, würde eine Interaktion mit einem Transmembransegment und einer hydrophoben Domäne der naszierenden Kette zur Verlagerung von TM2a führen und somit den Kanal öffnen (Van den Berg *et al.*, 2004). Derzeitigen Erkenntnissen zufolge, scheint ein einzelner heterotrimerer SecY-Komplex an nichttranslatierende Ribosomen zu binden (Menetret *et al.*, 2007), während der aktive, Peptid-inserierende Komplex, vermutlich ein Oligomer aus zwei bis vier Heterotrimeren bildet (Osborne & Rapoport, 2007). Ob die Translokation der naszierenden Kette hierbei durch ein Heterotrimer oder durch eine fusionierte Pore aus zwei Komplexen erfolgt, bleibt zu klären.

Neben dem Transport löslicher Proteine vom Cytosol ins ER-Lumen vermittelt das Translokon auch den Transfer der Transmembrandomänen von Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht der ER-Membran. Zudem scheint es auch an der Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine oder am Transport bakterieller Toxine, wie beispielsweise das K28-Toxin, vom ER-Lumen in das Cytosol, involviert zu sein (Meusser *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass die essentiellen Komponenten des Sec61/Y-Translokons konservierte Homologe in Säugerzellen besitzen, lässt darauf schließen, dass der Translokationsmechanismus ebenfalls konserviert ist. *Tabelle 1* gibt eine Übersicht über die Komponenten der verschiedenen Sec-Komplexe.

Genetische und biochemische Studien haben zudem gezeigt, dass für die Translokation von Proteinen durch das Translokon zusätzliche Proteine wie BiP/Kar2p in Eukaryoten oder SecA in Bakterien mit dem Kanal assoziiert sind, welche wichtige Funktionen während der Protein-Translokation erbringen. In Hefen konnte ferner für die Proteine Sec62p, Sec63p, Sec71p sowie Sec72p eine entscheidende Rolle bei der Translokation nachgewiesen werden (Deshaies & Sheckman, 1989; Sadler *et al.*, 1989; Young *et al.*, 2001; Feldheim *et al.*, 1994; Green *et al.*, 1992).

**Tabelle 2.1: Übersicht der Komponenten der Translokationspore der ER-Membran von Archeen bis zum Säuger**

<i>Archea</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>
SecYE $\beta$ -Komplex	SecYEG-Komplex	Sec61-Komplex	Sec61-Komplex
SecY	SecY	Sec61p	Sec61 $\alpha$
Sec $\beta$	SecG	Sbh1p	Sec61 $\beta$
SecE	SecE	Sss1p	Sec61 $\gamma$

### 2.1.2 Cotranslationaler Transport

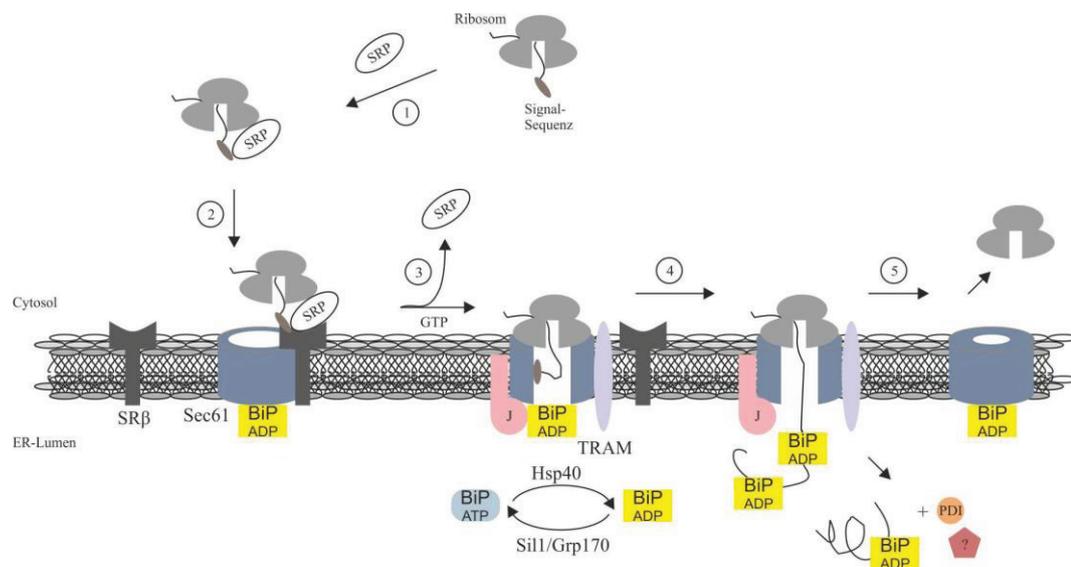
Der cotranslationale Transportmechanismus, welcher von der Mehrheit der sekretorischen Proteine von Säugern genutzt wird, wurde erstmals von Blobel und Dobberstein im Jahre 1975 beschrieben. Der Transportprozess beginnt mit der spezifischen Erkennung der N-terminalen Signalsequenz eines am Ribosom synthetisierten sekretorischen Proteins. Unmittelbar nach Austritt der Signalsequenz aus dem ribosomalen Tunnel wird diese vom Signalerkennungspartikel (SRP) gebunden, einem löslichen cytosolischen Ribonukleoproteinkomplex, welcher im Säuger aus den Proteinen SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 und SRP72 sowie einer 7s RNA besteht (Walter & Blobel, 1982; Walter & Johnson, 1994). Hierbei werden durch Bindung der SRP9- und SRP14-Untereinheit innerhalb der Interaktionsfläche zwischen der 40 S- und der 60 S-Untereinheit der Ribosomen die Elongationsfaktoren verdrängt, was einen Translationsarrest bewirkt (Walter & Blobel, 1981; Walter *et al.*, 1981; Krieg *et al.*, 1986). Dieser Prozess verhindert eine erschwerte Translokation auf Grund einer zu großen Länge der naszierenden Kette (Walter & Johnson, 1994). Der Komplex aus Ribosomen und naszierender Kette, kurz RNC, wird durch die Interaktion mit SRP zum membranständigen SRP-Rezeptor (SR) zum ER rekrutiert, welcher aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht (Gilmore *et al.*, 1982a & 1982b). Die Bindung von GTP ist für die Ausbildung einer stabilen Komplexbildung aus SR $\alpha$ , SR $\beta$ , SRP und RNC entscheidend (Legate *et al.*, 2000; Schwartz & Blobel, 2003). Neben der SRP54-Untereinheit sind auch die beiden Untereinheiten des SRP-Rezeptors GTPasen, deren Bindung und Hydrolyse von GTP wechselseitig sowie durch den Sec61-Komplex und das Ribosom reguliert werden (Römisch *et al.*, 1989; Bernstein *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1995). Die Bindung der Komponenten an die ER-

Membran hat eine Konformationsänderung der SPR54-Untereinheit zur Folge, wodurch L23a, ein ribosomales Protein, freigelegt und die Übergabe des Ribosoms an den Sec61-Kanal ermöglicht wird (Halic *et al.*, 2006). Die Bindung der Ribosomen mit dem Sec61-Komplex wird durch Interaktion der  $\alpha$ -Untereinheit des Translokons mit der 28 S rRNA der großen ribosomalen Untereinheit sowie der ribosomalen Proteine L23a und L35 im Bereich des Tunnelausgangs, vermittelt (Kalies *et al.*, 1994; Raden *et al.*, 2000; Prinz *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2001). Die Dissoziation von SRP, SR $\alpha$  und SR $\beta$  vom Ribosom und die Übergabe des RNC-Komplexes an den Translokationsapparat erfolgt unter GTP-Hydrolyse (Conolly & Gilmore, 1989; Rapiejko & Gilmore, 1997). Die Hydrolyse von GTP bewirkt auch eine festere Bindung des Ribosoms an den Sec61-Kanal. Die Insertion der naszierenden Kette erfolgt über den N-Terminus der Signalsequenz in Form einer Schleife. Die Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon führt über eine Konformationsänderung zum Öffnen der Pore auf der luminalen Seite. Die anschließende Translokation der naszierenden Kette erfordert einen zweiten, für eine effiziente Translokation entscheidenden Erkennungsschritt der Signalsequenz durch Komponenten des Sec61-Kanals (Crowley *et al.*, 1994; Jungnickel & Rapoport, 1995; Plath *et al.*, 1998). Im Säugersystem konnte in Rekonstitutionsexperimenten gezeigt werden, dass unter anderem TRAM (translocating chain-associated membrane protein) oder TRAP (Translocon-associated protein complex) benötigt werden, um Proteine cotranslational zu transportieren. (Görllich & Rapoport, 1993; Fons *et al.*, 2003). Auch für Sec63p wurde in der Hefe eine Beteiligung am cotranslationalen Transport beschrieben. Untersuchungen mit Proteoliposomen haben zudem gezeigt, dass BiP die Transporteffizienz von Proteinen in das ER von Säugern erhöht (Tyedmers *et al.*, 2003). Während der Translokation muss die Barrierenfunktion der ER-Membran für Ionen aufrechterhalten werden. Auf der cytosolischen Seite wird der Kanal durch das gebundene Ribosom versiegelt, während das ER residente Hsp70 Chaperon BiP die luminalen Seite verschließt, bis die naszierende Kette eine Länge von 70 Aminosäuren erreicht hat. (Crowley *et al.*, 1994; Hamman *et al.*, 1998). Während der Integration von Membranproteinen verschließen das Ribosom und das Translokon abwechselnd die cytosolischen und luminalen Enden der Pore durch streng regulierte Konformationsänderungen (Liao *et al.*, 1997; Haigh & Johnson, 2002; Alder & Johnson, 2004; Woolhead *et al.*, 2004). Das BiP-vermittelte Schließen der Pore benötigt die Anwesenheit von Nukleotiden (Hamman *et al.*, 1998; Haigh & Johnson, 2002). Nach Alder

*et al.* (2005) sind für das Verschließen des Translokons funktionelle Interaktionen zwischen der Substratbindungsregion und der J-Domänen-Bindungsregion von BiP sowie von Translokon-assoziierten Proteinen notwendig, wobei ein Verschließen der Pore ausschließlich in der ADP-gebundenen Form von BiP erfolgt. Eine mögliche Rolle könnten hierbei die beiden mit dem Sec61-Translokon assoziierten Transmembranproteine ERj1 und Sec63 des Säugers, auf Grund ihrer über ihre luminaire J-Domäne bereits gezeigten funktionellen Interaktion mit BiP, übernehmen (Tyedmers *et al.*, 2000; Dudek *et al.*, 2002; Dudek *et al.*, 2005; Weitzmann *et al.*, 2007) sowie die luminalen Nukleotidaustauschfaktoren Sil1 und Grp170.

Studien von Dudek *et al.* (2002) haben gezeigt, dass das Hsp40 Chaperon ERj1, welches in Hefen nicht existiert, zusätzlich eine cytosolische Domäne besitzt, welche mit der 28 S rRNA der ribosomalen 60 S Untereinheit assoziieren kann und einen Arrest der Translation verursacht. Verantwortlich für diesen Effekt ist ein innerhalb der cytosolischen Domäne vorhandenes positiv geladenes nona-Peptid. Durch die gleichzeitige Interaktion von ERj1 mit einem Ribosom und BiP zu interagieren, kann der von ERj1 verursachte Translationsarrest aufgehoben werden (Dudek *et al.*, 2005).

In Quervernetzungsexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass Faltungskatalysatoren wie PDI (Proteindisulfidisomerase) und Cyclophiline translozierende Proteine in späten Schritten des Transportes binden (Klappa *et al.*, 1995; Volkmer *et al.*, 1997). Die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt noch während des Transportes durch den Signalpeptidasekomplex (SPC) (Mothes *et al.*, 1994; Nicchitta *et al.*, 1995). Nach der Termination der Transportreaktion kommt es zunächst zum Dissoziieren der kleinen ribosomalen Untereinheit vom Ribosom, welche somit für die Initiation einer erneuten Translation zur Verfügung steht. Die 60 S-Untereinheit bleibt mit der ER-Membran und dem Translokon assoziiert, wodurch eine erneute Initiation der Translation eines sekretorischen Proteins ermöglicht wird, ohne einen erneuten SRP-Zyklus zu durchlaufen. Die Synthese eines nicht-sekretorischen Proteins führt dagegen zur Dissoziation des Komplexes (Potter & Nicchitta, 2000; Potter & Nicchitta, 2002).



**Abb. 2.1: Modellhafte Darstellung des cotranslationalen Proteintransports eines sekretorischen Proteins in das ER von Säugerzellen**

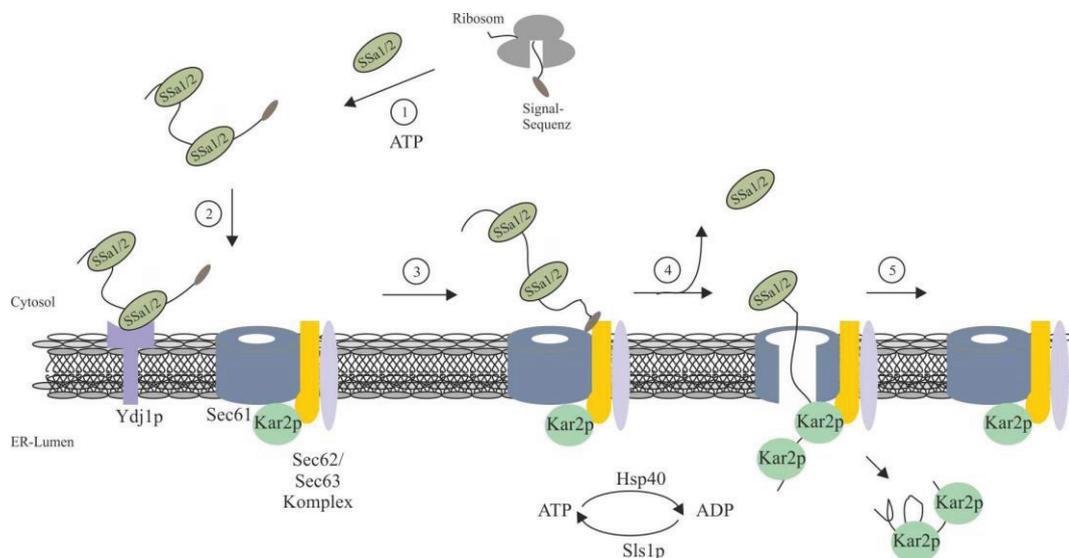
(1) Die N-terminale Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette wird durch den löslichen, cytosolischen Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt und gebunden. (2) Der Komplex aus Ribosom und naszierender Kette wird über SRP durch Bindung an den SRP-Rezeptor (SR) an die ER-Membran rekrutiert. (3) Bindung des Ribosoms mit dem Sec61-Komplex. Übertragung der Signalsequenz vom SRP auf den Sec61-Komplex unter Hydrolyse von GTP und Dissoziation des SRP. (4) Öffnen des Translokons und Translokation der naszierenden Kette und Bindung von luminalen Komponenten wie BiP und TRAM. Noch während des Transportes wird die Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex abgespalten. Mit Hilfe von molekularen Faltungs-Chaperonen wie z.B. PDI wird das Substrat in seine aktive Konformation überführt. (5) Termination der Transportreaktion. Die luminalen Seite des Translokons wird von BiP versiegelt.

### 2.1.3 Posttranslatonaler Transport

Der Transport der meisten Hefepoteine in das ER erfolgt posttranslational, also nach Beendigung ihrer Synthese im Cytosol der Zelle. Lediglich für einige kleine sekretorische Proteine sowie bei carboxyterminal verankerten „tail anchored“-Membranproteinen wie Asn1 wurde auch bei Säugern ein posttranslatonaler Transport beschrieben (Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Müller & Zimmermann, 1987; Kutay *et al.*, 1993; Rabu *et al.*, 2009; Favaloro *et al.*, 2010). Rekonstitutionsexperimente mit aufgereinigten Komponenten aus Mikrosomen der Hefen zeigten, dass der Transportapparat zur posttranslationalen Translokation sekretorischer Proteine neben dem luminalen Hsp70 Chaperon Kar2p und ATP ein hetero-heptamerer Membrankomplex enthält. Bei diesem Komplex handelt es sich um den Sec-

Komplex, welcher sich aus dem trimeren Sec61- und dem tetrameren Sec62/Sec63-Komplex zusammensetzt, der wiederum aus den integralen Membranproteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p und dem membranassoziierten Sec72p besteht (Panzner *et al.*, 1995). Für die Insertion und Translokation durch das Translokon müssen die Transportsubstrate in einen translokationskompetenten Zustand vorliegen, was in Hefen durch die Bindung der cytosolischen Chaperone Ssa1p und Ssa2p der Hsp70-Familie (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988) erreicht wird. Zusätzlich findet eine Interaktion dieser Chaperone mit dem über einen Farnesylrest in der ER-Membran verankerten Hsp40 Chaperon Ydj1p statt, wodurch vermutlich die Zielsteuerung des Hsp70-Protein-Komplexes zum ER ermöglicht wird (Chirico *et al.*, 1988; Caplan *et al.*, 1992; Becker *et al.*, 1996). Studien von Wilkinson *et al.* (2010) haben gezeigt, dass Sss1p essentiell für die Translokation von Proteinen ist. Im Säuger werden die Substrate mit Hilfe von Hsc70, ATP und einem weiteren cytosolischen Hsp40 Cochaperon in einem transportkompetenten Zustand gehalten (Zimmermann & Meyer, 1986; Wiech *et al.*, 1987). Der eigentliche Transport der Proteine durch die ER-Membran erfolgt in zwei Schritten. Zuerst bindet das zu transportierende Protein ATP-unabhängig durch direkte Interaktion der Signalsequenz an den Sec-Komplex, wobei die cytosolisch liegenden Komponenten Sec62p, Sec71p und Sec72p des Sec62/Sec63-Subkomplexes vermutlich eine Art Erkennungsrezeptor in der ER-Membran bilden (Müsch *et al.*, 1992; Matlack *et al.*, 1997). Anders als beim cotranslationalen Transport, wird beim posttranslationalen Weg die Oligomerisierung des Sec61-Komplexes nicht durch das Ribosom, sondern vielmehr durch den Sec62/Sec63-Subkomplex stimuliert (Hanein *et al.*, 1996). Durch Interaktion der Signalsequenz mit der Bindungsstelle am Translokon, welche zwischen Sec61p, Sec62p, Sec71p, Sec72p und den Lipiden der Membran lokalisiert ist, kommt es zur Konformationsänderung im Kanal, welche zur Öffnung der Pore führt (Plath *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003). Genetische Studien von Pilon *et al.* (1998) haben für Sec61p eine wichtige Funktion während des Öffnens der Translokationspore beschrieben. Zudem scheint auch Kar2p in Verbindung mit Sec63p bei diesem Prozess involviert zu sein (Sanders *et al.*, 1992; Brodsky & Scheckman, 1994; Brodsky *et al.*, 1995; Pilon *et al.*, 1998). Im zweiten Schritt des Transportprozesses wird die gebundene Polypeptidkette durch den vom Sec61-Komplex gebildeten Kanal transloziert, wobei für einen effizienten Transport zusätzlich Kar2p, ATP sowie Sec63p benötigt werden (Matlack *et al.*, 1997; Plath *et al.*, 1998; Matlack *et al.*, 1999). Durch die über die J-Domäne von Sec63p vermittelte

Interaktion mit Kar2p wird dessen ATPase-Aktivität stimuliert, was zur Substratbindung führt (Brodsky & Schekman, 1993; Corsi & Schekman, 1997; Misselwitz *et al.*, 1999). Der Nukleotidaustauschfaktor Sls1p komplettiert den ATP-Zyklus von Kar2p, welches nach dem Prinzip der „Brown’schen Ratsche“ den gerichteten Transport von sekretorischen Proteinen antreibt. Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass auch das Hsp70 Chaperon Lhs1p die Funktion des Nukleotidaustauschs übernehmen kann (Kabani *et al.*, 2000; Tyson & Stirling, 2000). In Säugern wurde für den posttranslationalen Transport in rekonstruierten Proteoliposomen eine Beteiligung von BiP in Analogie zu Kar2p gezeigt (Tyedmers *et al.*, 2003).



**Abb. 2.2: Modellhafte Darstellung des posttranslationalen Proteintransports eines sekretorischen Proteins in das ER von Hefen**

(1) Das zu transportierende, sekretorische Protein wird vollständig im Cytosol synthetisiert und durch Bindung von cytosolischen Chaperone der Hsp70-Familie wie Ssa1 und Ssa2 in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. (2) Interaktion dieser Chaperone mit dem über einen Farnesylrest in der ER-Membran verankerten Hsp40 Chaperon Ydj1p, wodurch vermutlich die Zielsteuerung zum ER ermöglicht wird. (3) Die Signalsequenz wird vom Sec-Komplex erkannt und gebunden. Sec62p, Sec71p und Sec72p dienen vermutlich als Erkennungsrezeptor. (4) Öffnen der Pore und ATP- und Kar2p-abhängige Translokation der Polypeptidkette. (5) Termination der Translokation. Der Kanal schließt sich. Das Substrat wird mit Hilfe von molekularen Chaperonen in seine aktive Konformation überführt.

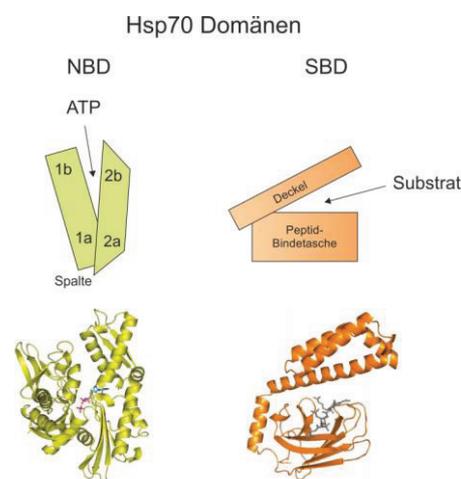
## 2.2 Das ER-Chaperonsystem

Zellen jeglicher Art reagieren auf eine über ihre normale Wachstumstemperatur gesteigerte Temperaturerhöhung mit der Synthese einer bestimmten Klasse von Molekülen, welche das Überleben der Zelle unter diesen extremen Bedingungen begünstigen. Anfang der 60-iger Jahre wurde dieses Phänomen erstmalig von dem italienischen Entwicklungsbiologe F. Ritossa beschrieben. Tissieres und seine Mitarbeiter identifizierten ca. 10 Jahre später aus *Drosophila melanogaster* die für diese, als Hitzeschockantwort benannte Reaktion, verantwortlichen Proteine, welche als Hitzeschockproteine, kurz Hsp, bezeichnet wurden (Tissieres *et al.*, 1974). Es zeigte sich, dass Zellen auf eine ganze Reihe von Stressoren mit dieser Antwort reagieren, so z.B. auch auf Alkohol, giftige Metalle sowie eine Reihe von Stoffwechselgiften, wodurch der Begriff „zelluläre Stressantwort“ bzw. „Stressprotein“ geprägt wurde. Die bedeutendste Gruppe der Hitzeschockproteine sind die molekularen Chaperone, die auch bei Zellprozessen wie dem Transport, der Translokation, der Faltung und der Assemblierung von Proteinen eine entscheidende Rolle spielen. Auch bei der Regulation der „Unfolded protein response“ (UPR) durch ER-Stress konnte eine Beteiligung von Chaperonen nachgewiesen werden.

### 2.2.1 Das Hsp70 Chaperon-System

Die Hsp70 Familie ist die in der Evolution am stärksten konservierte Proteinfamilie unter den Hitzeschockproteinen. Die Mitglieder dieser molekularen Proteinfamilie weisen eine zu mindestens 45%ige Sequenzhomologie auf (Bukau & Horwich, 1998) und machen unter normalen Bedingungen 1-2% des Proteinanteils einer Zelle aus (Herendeen *et al.*, 1979). Die Proteine spielen eine essentielle Rolle in einer Vielzahl verschiedener zellulärer Funktionen, eingeschlossen Faltung und Assemblierung neu synthetisierter Proteine sowie Transport von Proteinen durch Membranen. Sie erkennen und binden vor allem hydrophobe Segmente neu synthetisierter oder ungefalteter Polypeptidketten und verhindern so ein Fehlfalten sowie eine Aggregationsbildung. Die molekularen Chaperone des Hsp70-Typs bestehen aus distinkten Domänen: Einer hoch konservierten N-terminalen ATPase Domäne von 45 kDa, der eine weniger konservierte C-terminal gelegene Polypeptid-Bindungsdomäne von 18 kDa folgt, welche ungefaltete Proteine und kurze lineare

Peptide mit hydrophoben Segmenten in einer Peptidbindetasche bindet. Der äußerste C-Terminus von 10 kDa ist variabel und dient der Substraterkennung bzw. der Stabilisierung der Substratbindung. Er wird aus fünf  $\alpha$ -Helices gebildet, wobei eine Helix eine Art Deckel bildet, welcher die Peptidbindetasche verschließen kann (Abb. 2.3) (Flaherty *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Boorstein *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2005). Kristall-Strukturen haben gezeigt, dass die Nukleotidbindedomäne aus zwei Flügeln, welche eine tiefe Spaltöffnung umschließen, besteht. Die Bindung des Nukleotids erfolgt am Boden der Öffnung. Jeder Flügel lässt sich nochmals in zwei Subdomänen unterteilen (Abb. 2.3) (Flaherty *et al.*, 1990).



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung der NBD und SBD von Hsp70**

Die Hsp70 Nukleotidbindedomäne (NBD) ist in zwei Flügel unterteilt, welche wiederum aus je zwei Unterdomänen zusammengesetzt sind (1a, 1b, 2a, 2b). In der Öffnung ist ATP gebunden (Flaherty *et al.*, 1990). Die Spalte zwischen den Domänen 1a und 2a könnte die regulatorische Interaktionsstelle sein. Die Substrat- oder Peptid-Bindedomäne (SBD) besteht aus einer Bindetasche, welche aus  $\beta$ -Faltblätter besteht und einem Deckel, welcher aus  $\alpha$ -Helices gebildet wird (Zhu *et al.*, 1996).

Eine Beteiligung von Chaperonen der Hsp70-Familie wurde unter anderem bei der Stabilisierung von Proteinen, welche durch Membranen transportiert werden müssen, der Faltung und Assemblierung von Proteinen in Zellorganellen, sowie an physiologischen Vorgängen wie Thermotoleranz, Kälteschock-Antwort oder der allgemeinen Stress-Antwort beschrieben. Das ER von Säugern enthält die beiden Hsp70 Chaperone BiP und Grp170, deren Homologe in der Hefe Kar2p und Lhs1p sind (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989).

### 2.2.1.1 Hsp70 und der ATPase-Zyklus

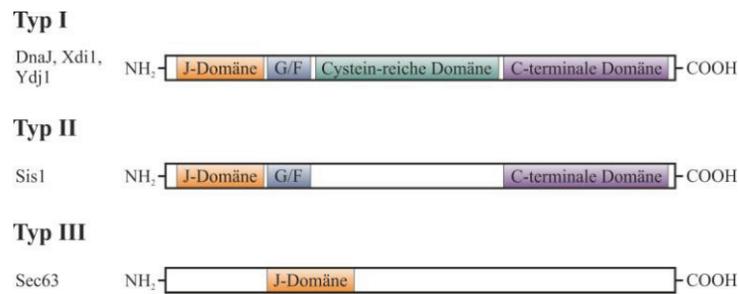
Die Aktivität der Hsp70 Chaperone wird durch die Aktivität der ATPase Domäne kontrolliert, welche einen Reaktionskreislauf von ATP-Bindung, Hydrolyse und Nukleotidaustausch durchläuft. Diese Reaktion wird durch molekulare Co-Chaperone der Hsp40-Proteinfamilie sowie von Nukleotidaustauschfaktoren reguliert. Der für die Funktion von Hsp70 Chaperone zugrunde liegende Mechanismus wurde erstmals für DnaK aus *E. coli* beschrieben. DnaK ist eine ATPase, welche hydrophobe Peptide nicht korrekt gefalteter Proteine erkennt und bindet. Für die Bindung und Freisetzung dieser Substrate wechselt das Protein zwischen einem ATP- und einem ADP-gebundenen Zustand. In der ATP-gebundenen Form liegt die Peptidbindetasche in einer geöffneten Konformation vor, was eine schnelle Bindung und Dissoziation der Substrate ermöglicht. In der ADP-gebundenen Form die Tasche durch eine Art Deckel verschlossen, wodurch die Peptide fest gebunden bleiben (Schmid *et al.*, 1994; Greene *et al.*, 1995). Der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Hsp70-Reaktionszyklus ist die Hydrolyse von ATP nach der Peptidbindung (McCarty *et al.*, 1995; Karzai & McMacken, 1996). Das Protein selbst besitzt eine zu schwache intrinsische ATPase-Aktivität, um eine effiziente Proteinfaltung zu gewähren. Eine Interaktion mit dem Hsp40 Cochaperon DnaJ stimuliert die ATPase-Aktivität, wohingegen GrpE als Nukleotidaustauschfaktor fungiert, und somit eine Freisetzung von ADP und folglich des Substrates reguliert (Libereck *et al.*, 1991).

### 2.2.1.2 Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Hsp40 Cochaperone

Die Mitglieder der Hsp40 Cochaperone sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, denen eine 70 Aminosäuren lange J-Domäne mit einem konservierten His-Pro-Asp (HPD)-Motiv gemeinsam ist, über die sie die Aktivität der Hsp70-Proteine regulieren, indem sie deren ATPase-Aktivität stimulieren (Cheetham & Caplan, 1998; Hennessy *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006). Auf Grund ihrer charakteristischen J-Domäne werden sie auch als J-Proteine bezeichnet. Sie enthalten zudem eine Anzahl unterschiedlicher Domänen, die eng mit ihrer Funktion oder ihrer Zugehörigkeit zu einzelnen Unterfamilien verbunden sind und ihre Einteilung in drei Klassen bedingt (Cheetham & Caplan, 1998). DnaJ, Haupt-Hsp40 Cochaperon im Cytosol von *E. coli*, weist neben der J-Domäne zudem eine ca. 35 AS große Glycin/Phenylalanin-reiche

Region (G/F-Region) sowie ein Cystein-reiches Segment mit zwei Zinkzentren auf, das eine Bindung von Substraten ermöglicht (Szabo *et al.*, 1996; Linke *et al.*, 2003). Cochaperone die diese Strukturmerkmale aufweisen werden als Typ I klassifiziert. Typ II Proteine enthalten neben der J-Domäne die G/F-Region, während Proteine vom Typ III lediglich die J-Domäne aufweisen (*Abb. 2.4*). Vertreter der Typ III Hsp40 Cochaperone wie beispielsweise Sec63 zeigen keine direkte Interaktion mit ungefalteten Proteinen. Mit ihrer Hilfe werden Hsp70 Chaperone beispielsweise zu Transportprozessen über Membranen rekrutiert (Walsh *et al.*, 2004). Sec63 ist ein membranständiges Protein, welches in der Hefe eine essentielle Komponente des posttranslationalen Translokationsapparates der ER-Membran darstellt (Sadler *et al.*, 1989; Feldheim *et al.*, 1992; Panzner *et al.*, 1995). In der Hefe interagiert Sec63 funktional über seine J-Domäne mit dem Hsp70 Chaperon Kar2p (Brodsky *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2001). Eine Beteiligung der beiden Proteine wurde auch für den cotranslationalen sowie den retrograden Proteintransport beschrieben (Plempner *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999).

ERj1 (ER j-containing 1) oder auch Mtj1 (murine tumor cell dnaj-like protein 1) genannt, gehört ebenfalls zu den Typ III Cochaperonen. ERj1 ist ein Transmembranprotein, welches über seine positiv geladenen Oligopeptide innerhalb seiner cytosolischen Domäne mit dem ribosomalen Tunnelausgang über die rRNA und die Proteine L23a und L35 assoziiert ist und BiP zu translatierenden Ribosomen sowie zu naszierenden Polypeptidketten durch funktionale Interaktion seiner N-terminal gelegenen luminalen J-Domäne rekrutiert (Dudek *et al.*, 2002; Dudek *et al.*, 2005). *In vivo* Untersuchungen haben gezeigt, dass ERj1 nahe der Ribosomen in der ER-Membran lokalisiert ist und dass die Ribosomen-Bindungs-Affinität von ERj1 durch Interaktion mit BiP drastisch verändert wird (Benedix *et al.*, 2010). ERj1 ist zudem in der Lage, die Initiation der Translation in Abwesenheit von BiP zu inhibieren. Somit könnte gewährleistet sein, dass bei Überladung des ER mit ungefalteten Proteinen und einer dadurch bedingten verringerten Verfügbarkeit von BiP zusätzlicher ER-Stress minimiert wird.

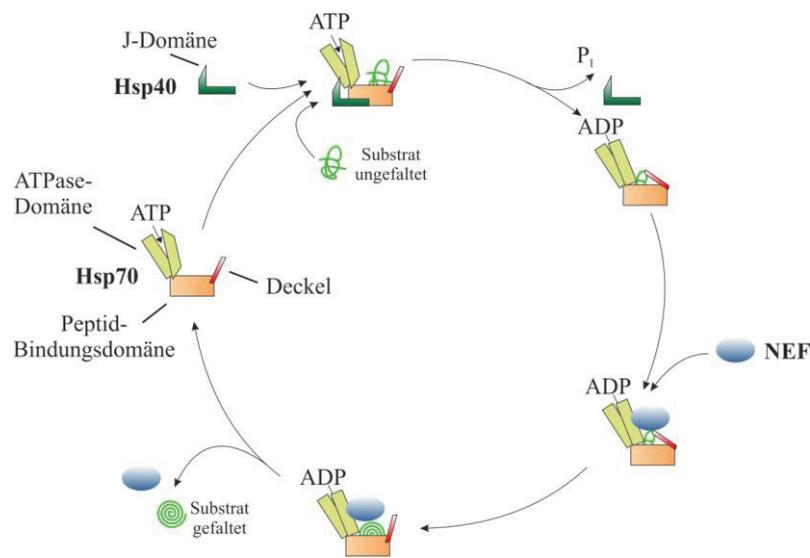


**Abb. 2.4: Aufbau von Hsp40 Cochaperonen**

Einteilung der Hsp40 Cochaperone in drei Klassen mit entsprechender Domänenstruktur und Angabe einiger Vertreter.

### 2.2.1.3 Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Nukleotidaustauschfaktoren

Die Freisetzung von ADP und des Substrates vom Hsp70 Chaperon wird durch Nukleotidaustauschfaktoren reguliert. GrpE ist der Nukleotidaustauschfaktor von DnaK in *E. coli*, welcher den ADP-ATP-Austausch katalysiert (Liberek *et al.*, 1991). Nach Bindung des Austauschfaktors kommt es durch eine Rotation einer Unterdomäne der ATPase-Domäne von DnaK zur Öffnung der Peptidbindetasche, was die Freisetzung des Substrates bewirkt (Harrison *et al.*, 1997). Die Affinität von DnaK für ADP wird durch Assoziation von GrpE mit DnaK in seiner ADP-gebundenen Form nahezu um den Faktor 200 reduziert bei gleichzeitiger Erhöhung der Nukleotidaustauschaktivität um das ca. 500-Fache (Packschies *et al.*, 1997). In Säugern wurde eine GrpE-analoge Funktion für die Proteine BAP (BiP-assoziertes Protein) und Grp170 beschrieben (Chung *et al.*, 2002; Weitzmann *et al.*, 2006), deren Hefehomologe Sls1p/Sil1 und Lhs1p sind (Kabani *et al.*, 2000; Tyson & Stirling, 2000). Die Interaktion dieser Proteine erfolgt mit dem Hsp70 Chaperon BiP bzw. dem Hefehomolog Kar2p. Im Cytosol gibt es mit HspBP1 (Hsp70 binding protein 1) ein zu Sls1p/Sil1 homologes Protein, welches den Nukleotidaustausch von cytosolischen Hsp70 Chaperons katalysiert (Kabani *et al.*, 2002). Obgleich die hohe Konservierung von Strukturmerkmalen sowohl der Hsp70 Chaperone als auch der Hsp40 Cochaperone darauf schließen lässt, dass der Hsp70/Hsp40-Reaktionsmechanismus einheitlich verläuft, ist es dennoch vorstellbar, dass eukaryotische Hsp70 Proteine gegenüber seinen bakteriellen Vertretern unterschiedliche strukturelle Zustandsformen ausbilden. Abb. 2.5 zeigt schematisch einen Hsp70/Hsp40/NEF-Reaktionszyklus.



**Abb. 2.5: Modellhafte Darstellung des Hsp70/Hsp40/NEF-Reaktionszyklus**

Das Hsp70 Chaperon besitzt in der ATP gebundenen Form eine geringe Substrat-Affinität. Die Interaktion mit der J-Domäne eines Cochaperons der Hsp40-Proteinfamilie bewirkt die Hydrolyse des in der ATPase-Domäne gebundenen ATP zu ADP. Diese Reaktion führt zu einer Konformationsänderung innerhalb der Peptid-Bindungsdomäne des Hsp70 Chaperons. Die Peptidbindetasche schließt sich, wodurch das Substrat mit hoher Affinität gebunden wird. Der durch die Aktivität des Nukleotidaustauschfaktors (NEF) bedingte Austausch von ADP zu ATP führt zur Öffnung der Peptidbindetasche und somit zur Freisetzung des Substrates, womit der Zyklus von Bindung und Freisetzung erneut durchlaufen werden kann.

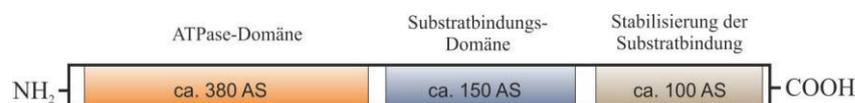
### 2.2.2 Das Hsp70 Chaperon BiP

Das ER-luminale Hsp70 Chaperon BiP – Immunglobulin-heavy chain Binde-protein oder auch Glucose-reguliertes Protein (Grp78) genannt (Pouyssegur *et al.*, 1977; Haas & Wabl, 1983; Munro & Pelham, 1986; Hendershot *et al.*, 1988) – ist ein wichtiger Regulator zur Erhaltung der Homöostase des Endoplasmatischen Retikulums. Mit einer Konzentration im millimolaren Bereich ist BiP das am meisten vorkommende Mitglied der Hsp70-Familie im ER (Guth *et al.*, 2004). Wie alle Vertreter der Hsp70 Chaperonfamilie enthält BiP eine N-terminale ATPase-Domäne sowie eine C-terminale Polypeptid-Bindedomäne (Abb. 2.6) (Bukau & Horwich, 1998; Gething, 1999; King *et al.*, 2001), über die es ungefaltete Peptide unter Hydrolyse von ATP bindet und somit die korrekte Faltung ermöglicht und eine Aggregation verhindert (Kleizen & Braakma, 2004). Die Bindung der Substrate erfolgt über ein exponiertes heptameres Hy-(W/X)-Hy-X-Hy-X-Hy-Motiv (Hy steht für einen aromatischen oder

hydrophoben, X für einen beliebigen Aminosäurerest), welches in nativen Proteinen in aller Regel nicht exponiert wird (Flynn *et al.*, 1991; Blond-Elguindi *et al.*, 1993a; Fewell *et al.*, 2001). Die Geschwindigkeit der Faltung neu synthetisierter Proteine sowie die Stabilität der Faltungsintermediate sind ausschlaggebende Parameter für eine Interaktion von BiP. Bevorzugt werden hierbei Proteine gebunden, die sich langsam oder instabil falten (Hellman *et al.*, 1999). Eine weitere Funktion von BiP ist die durch Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$  gewährleistete Erhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase des ER (Liu *et al.*, 1997; Lee, 2001). *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass BiP eine Rolle bei der Permeabilitäts-erhaltung spielt, indem es die luminalen Seite des Translokationskanals versiegelt (Hamman *et al.*, 1998; Haigh & Johnson, 2002; Wirth *et al.*, 2003). Der dieser Funktion zu Grunde liegende Mechanismus verläuft analog zur Bindung und Freisetzung von Substraten. Die Versiegelung des Translokons erfolgt in der ADP-gebundenen Form von BiP unter funktionellen Interaktionen seiner Polypeptid-Bindungsdomäne mit einer J-Domäne des Translokons oder daran assoziierte Proteine, während das Öffnen der Pore die ATP-gebundene Form von BiP erfordert (Alder *et al.*, 2005). Untersuchungen von Alder *et al.* (2005) haben gezeigt, dass Kar2p in einem *in vitro*-System aus Säuger-RMs einen dominant negativen Effekt hinsichtlich der Funktion von BiP beim Schließen des Translokons ausübt.

Die korrekte Faltung, Assemblierung und Modifizierung von Proteinen ist ein essentieller Schritt während ihrer Biogenese. Nur Proteine, die in ihrer nativen Konformation vorliegen, werden zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten transportiert. Das ER verfügt über eine Qualitätskontroll-Maschinerie, die Proteine in ihrer nicht-nativen Konformation erkennt, korrekt faltet oder ins Cytosol transportiert, wo sie nach Ubiquitinierung proteasomal degradiert werden, ein Prozeß, der ER-assoziierte Protein-Degradation, kurz ERAD, genannt wird (Hiller *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1996). Somit wird verhindert, dass die Last an fehlgefalteten Proteinen im ER zu hoch wird. Ist das Gleichgewicht zwischen Protein-Import, korrekter Faltung oder Export fehlgefalteter Proteine zur proteasomalen Degradation gestört, führt dies zu ER-Stress und zur Aktivierung der „Unfolded protein response“ (UPR). Die UPR wirkt auf zwei Ebenen: Der Arretierung der Translation und der Induktion der Transkription bestimmter Proteine (Ma & Hendershot, 2001; Zhang *et al.*, 2004). Sind diese Prozesse zur Behebung der Stresssituation nicht ausreichend, leitet die Zelle den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein. Neben den Proteinen der Hsp90- (Muresan & Arvan, 1997; Randow & Seed, 2001), Lektin- (De Virgilio *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000;

Helenius & Aebi, 2001) und Proteindisulfidisomerase- Familie (Gillece *et al.*, 1999; High *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2001) ist auch BiP ein wichtiger Regulator innerhalb dieser Qualitätskontrollmaschinerie des ER. Das Hsp70 Chaperon fungiert als Modulator der UPR, indem es unter normalen zellulären Bedingungen mit ER-Stresssensoren wie PERK, Ire1p und ATF6 assoziiert ist und dadurch deren Aktivierung inhibiert (Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002). Durch Anhäufung fehlgefalteter Proteine dissoziiert BiP zur Unterstützung der korrekten Proteinfaltung von den UPR-Mediatoren, wodurch die UPR-Reaktion eingeleitet wird und nachgeschaltete Kaskaden aktiviert werden. BiP selbst wird ebenfalls durch Aktivierung der UPR hochreguliert. Eine Beteiligung von BiP und seinem Hefehomolog Kar2p wurde ferner beim Abbau von ERAD-Substrate beschrieben (Beggah *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1999 Chilláron & Haas, 2000; Jin *et al.*, 2000). Die Funktion der Proteine könnte hierbei in der exportkompetenten Zustandserhaltung der Substrate (Nishikawa *et al.*, 2001; Winkeler *et al.*, 2003) sowie in der Öffnung der Translokationspore vor der Retrotranslokation liegen (Brodsky & McCracken, 1999). Für das Hsp70 Chaperon und sein Hefehomolog wurde auch eine Beteiligung am retrograden Transport einiger Toxine beschrieben (Simpson *et al.*, 1999; Eisfeld *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000). Die Bedeutung von BiP wurde durch kürzliche Studien hervorgehoben, die zeigten, dass die Inaktivierung von BiP durch ein bakterielles Zytotoxin lebensbedrohliche Komplikationen wie das hämolytische-urämische Syndrom hervorruft (Paton *et al.*, 2006; Montecucco & Molinari, 2006), dessen klinisches Bild durch eine rapide Abnahme der Thrombozyten, eine Zerstörung feiner Blutgefäße sowie durch akutes Nierenversagen geprägt ist.



**Abb. 2.6: Domänenstruktur eines Hsp70 Chaperons**

Modellhafte Darstellung der Domänenstruktur eines Hsp70 Chaperons. Am N-Terminus des Protein ist die hochkonservierte ATPase-Domäne von ca. 44 kDa lokalisiert, der ein weniger gut konservierter 18 kDa-Bereich folgt, welcher ungefaltete Proteine und kurze lineare Peptide mit großen, hydrophoben Resten bindet. Die C-terminale 10 kDa-Domäne ist variabel und dient der Substrat-erkennung bzw. der Stabilisierung der Substratbindung.

### 2.2.3 Kar2p, das Hsp70-Homolog im ER der Hefe

Kar2p ist das Hefehomolog zu BiP (Rose *et al.*, 1989; Normington *et al.*, 1989). Untersuchungen haben gezeigt, dass Kar2p essentiell für die co- und posttranslationale Translokation von Polypeptiden durch die ER-Membran (Vogel *et al.*, 1990; Brodsky *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2001), die Faltung sowie Reifung sezernierter Glykoproteine und Lipoproteine (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989; Simons *et al.*, 1995; Kuznetsov *et al.*, 1997; Linnik *et al.*, 1998) sowie für die Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine und Membranproteine (Machamer *et al.*, 1990) ist. Zudem wurde eine Rolle von Kar2p während der Karyogamie, der Verschmelzung der beiden Kernmembranen, beschrieben (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989; Latterich & Schekman, 1994). Studien von Alder *et al.* (2005) haben gezeigt, dass Kar2p sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ATP nicht in der Lage ist, die Translokationspore in Säugermikrosomen zu verschließen. Vielmehr führt es in Anwesenheit von BiP zu einem dominant-negativen Effekt hinsichtlich der Porenversiegelung.

### 2.2.4 Das molekulare Chaperon Grp170

Bei Grp170 (glucose-regulated protein of 170 kDa bzw. „oxygen“-reguliertes Protein mit 150 kDa, Orp150) handelt es sich um ein Hsp70-verwandtes Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums, welches als eigene Gruppe zu der Hsp70-Superfamilie gezählt wird, zu der auch die Hsp110-Familie gehört (Chen *et al.*, 1996; Kuwabara *et al.*, 1996; Easton *et al.*, 2000). Das Protein besitzt zwei unabhängige Peptidbindungsdomänen am C-Terminus, ein ER-Retentionsmotiv (KNDDEL) (Naved *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996) und eine am N-Terminus befindliche glykosylierte Domäne, welche eine zu 30%ige Übereinstimmung mit der ATPase-Domäne von DnaK aufweist. Der Rest des Proteins zeigt eine Verwandtschaft mit Hsp110, einem cytosolischen Chaperon der Hsp110/SSE-Familie. Grp170 interagiert mit nichtassemblierten Immunglobulinen und wurde in Assoziation mit BiP und Grp94 gefunden, was eine Rolle bei der Assemblierung und Faltung von sekretorischen Proteinen nahelegt (Lin *et al.*, 1993; Kuznetsov *et al.*, 1997). Studien von Park *et al.* (2003) haben gezeigt, dass das Protein durch Bindung an denaturierte Proteine eine Hitze-induzierte Protein-Aggregation verhindert. Stress- Bedingungen wie Hypoxie, Ischämie oder eine Störung der Calcium-Homöostase führen zur Induktion der

Synthese von Grp170 (Lin *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996; Easton *et al.*, 2000). Grp170 stimuliert zudem den Nukleotidaustausch von BiP (Weitzmann *et al.*, 2006), wie es auch für sein Hefe-Homolog Lhs1p (Luminal Hsp Seventy) für Kar2p beschrieben wurde (Steel *et al.*, 2004). Das Protein alleine besitzt keine oder nur eine sehr geringe intrinsische ATPase-Aktivität. Die ATPase ist im Gegensatz zu BiP nicht durch die J-Domäne von ERj1 stimulierbar, vielmehr wird sie durch das Hsp70 Chaperon bei gleichzeitiger Anwesenheit eines J-Proteins angeregt (Weitzmann *et al.*, 2006). Durch diesen koordinierten Mechanismus sind beide Chaperone in der Lage, verschiedene Regionen desselben Substrates zu binden und die Faltungseffizienz zur nativen Konformation zu erhöhen (Steel *et al.*, 2004). Wie BiP steht Grp170 unter der Kontrolle der UPR (Craven *et al.*, 1996). Untersuchungen in der Hefe haben gezeigt, dass Lhs1p im Gegensatz zu Sec63p und Kar2p nicht essentiell ist, obgleich eine Nullmutation Defekte in der post-translationalen Translokation (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996) sowie bei der Reparatur fehlgefalteter Proteine im ER hervorruft (Saris *et al.*, 1997). Eine Doppelmutation von *LHS1* und *SILI* ist dagegen letal und führt zu einer vollständigen Blockade des Proteintransportes in das ER (Tyson & Stirling, 2000). Eine Überexpression von *SILI* ist in der Lage, die nach *LHS1* Deletion beobachtete Akkumulation von präsekretorischen Proteinen im Cytosol zu unterdrücken. Keyzer *et al.* (2009) haben gezeigt, dass die Nukleotid-Bindung an Lhs1p essentiell für dessen Nukleotidaustauschaktivität ist.

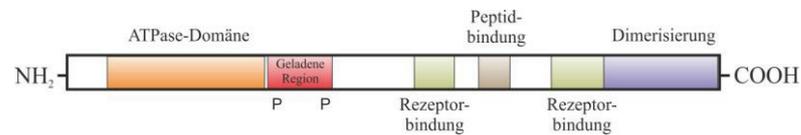
Für Grp170 wurde zudem eine Rolle in der Therapie von Krebs zugeschrieben. Der Nutzen liegt hierbei in seiner Aktivität als Stimulator der Immunantwort. Grp170 kann sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort induzieren (Manjili *et al.*, 2006). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Immunisierung von Mäusen mit Grp170 aus tumorbefallenen Zellen nach Transplantation des Tumors dessen Wachstum inhibiert, eine Metastasen-Bildung reduziert und die Lebenserwartung Tumor-tragender Mäuse erhöht (Wang *et al.*, 2001 & 2003).

## 2.2.5 Weitere Chaperone des Endoplasmatischen Retikulums

### 2.2.5.1 Die Hsp90-Familie

Hitzeschockproteine der Hsp90-Familie sind ubiquitär in Pro- und Eukaryonten verbreitet und bilden ein dem Hsp70-System nachgeschaltetes Chaperonsystem. Die Hsp90 Chaperone haben einen weiten Wirkungsbereich und interagieren sowohl mit Steroidhormon-Rezeptoren, Proteinkinasen (Nathan *et al.*, 1997) als auch mit Actin und Tubulin. Sie bestehen aus einer N-terminalen ATPase-Domäne, welche die Bindung sowie Freisetzung der Substrate reguliert (Obermann *et al.*, 1998), einer zentralen Substratbindungsdomäne sowie einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (Abb. 2.7) (Stebbins *et al.*, 1997). In Eukaryoten endet die C-terminale Domäne von cytosolischen Hsp90-Proteinen mit einem konservierten EEVD-Motiv, welches essentiell für die Interaktion mit Cofaktoren, die eine  $\alpha$ -helikale TRP- (tetratricopeptid repeat) Domäne enthalten. Der genaue Regulations-Mechanismus von Hsp90 ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Aktivität von Hsp90 die Mitwirkung anderer Chaperon-Systeme wie Hsp70 und Hsp40 sowie verschiedene Co-Faktoren benötigt. Hierbei ist der am besten untersuchte Funktionszyklus der für den Steroidhormon-Rezeptor. Es wird angenommen, dass der monomere inaktive Rezeptor durch das Hsp70/40 Chaperonsystem erkannt und anschließend zu Hsp90 transferiert wird. Die Hsp70/Hsp90-Komplex-Bildung wird hierbei durch das Gerüstprotein Hop/p60 bzw. Sti1 in Hefen, vermittelt. In Hefen ist Sti1 ein Aktivator der ATPase von Hsp70 und ein Inhibitor der Hsp90 ATPase (Richter *et al.*, 2003; Wegele *et al.*, 2003). Cyclophiline wie Crp6 und Crp7 der Hefe sowie Immunophiline wie Cns1 (Hefe) und das Co-Chaperon p23 (Sba1 in Hefen) interagieren ferner mit dem Hsp70/40-Hop-Hsp90-Substrat-Komplex, was die Freisetzung von Hsp70/40 und Hop bewirkt. p23 stabilisiert den Hsp90-Rezeptor-Komplex im ATP-gebundenen Zustand. Nach Zelleintritt des Hormons bindet der Rezeptor an dieses wobei er durch Hydrolyse des Chaperon-gebundenen ATP zu ADP von Hsp90 dissoziiert (Zhao *et al.*, 2000). Cytosolisches Hsp90 ist in Eukaryoten essentiell für das Überleben der Zelle (Wegele *et al.*, 2004; Kanzaki *et al.*, 2003). Ein Vertreter der Hsp90 Chaperone ist Grp94, welches in höheren Eukaryoten zusammen mit BiP im ER gefunden wurde. Das Protein interagiert mit späten Faltungsintermediaten (Melnick *et al.*, 1992). Wie bereits für BiP beschrieben, wird die

Expression von Grp94 durch Akkumulation ungefalteter Proteine im ER hochreguliert (Nathan *et al.*, 1997; Kotzutsumi *et al.*, 1998). Ebenso konnte eine Beteiligung innerhalb der ER-assoziierten Degradation nachgewiesen werden (Christianson *et al.*, 2008).



**Abb. 2.7: Domänenstruktur eines Hsp90 Chaperons**

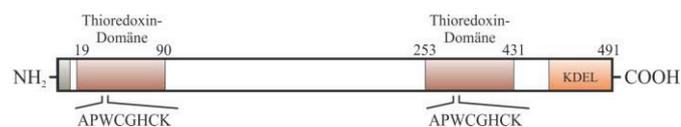
Modellhafte Darstellung einer Domänenstruktur eines Hsp90 Chaperons. Hsp90 enthält eine N-terminale ATPase-Domäne, welche die Bindung sowie Freisetzung der Substrate reguliert, eine zentrale Substratbindungsdomäne sowie eine C-terminale Dimerisierungsdomäne.

### 2.2.5.2 Lektine

Ein wichtiger Schritt während der Reifung von Proteinen ist neben der korrekten Faltung auch deren Modifizierung. Im ER vermittelt der Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST) die Anheftung von  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Zuckerketten an viele sekretorische Proteine (Struck *et al.*, 1978). Diese N-glykosylierten Proteine werden von den Lektinen Calnexin oder Calretikulin, die deren korrekte Faltung unterstützen, erkannt und gebunden. Calnexin ist ein Typ I Membranprotein nahe des Translokons (Degen & Williams, 1991; Hochstenbach *et al.*, 1992), während Calretikulin ein lösliches ER-Protein (Ostwald & McLennan, 1974; Michalak *et al.*, 1999) ist. Nach Abspaltung zweier Glukosereste von den neu-synthetisierten Glykoproteinen durch die  $\alpha$ -Glykosidasen I und II kommt es zur Bindung von Calnexin oder Calretikulin an das entstandene monoglykosylierte Glykan, wodurch dessen korrekte Faltung unter Mitwirkung der Oxidoreduktase ERp57, die die Ausbildung von Disulfidbrücken katalysiert, unterstützt wird (Hammond *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 1995; Zapun *et al.*, 1998). Nach Abspaltung des dritten Glukoserestes kommt es zur Dissoziation des Substrat-Lektin-Komplexes. Während nativ gefaltete Glykoproteine von ERGIC-53, ein Membranprotein, erkannt und über CopII-Vesikel zum Golgi-Apparat dirigiert werden (Schrag *et al.*, 2003), werden fehlgefaltete Proteine von der UDP-Glucose/Glykoprotein-Glykosyltransferase (UGGT) erneut monoglykosyliert (Sousa & Parodi, 1995), wodurch der Prozess der Lektin-vermittelten Faltung erneut durchlaufen werden kann.

### 2.2.5.3 Faltungsenzyme

Zusätzlich zu den Chaperonen sind zur Unterstützung der korrekten Faltung von Proteinen auch Faltungsenzyme wichtig. Hierzu gehören die Oxidoreduktasen, welche die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Isomerisierung von Substratproteinen gewähren. Diesem Prozess liegt die durch diese Enzyme katalysierte Thiol-Redox-Reaktionen zugrunde. Alle Vertreter dieser Familie enthalten ein gemeinsames Struktur-Motiv, die Thioredoxin-Domäne, die zwei redoxaktive Cystein-Reste (CxxC-Motiv) enthält (Abb. 2.8). Die Familie des ER umfasst mindestens 17 Proteine. Die Proteindisulfidisomerase (PDI) ist der bekannteste Vertreter der Familie der Oxidoreduktasen und macht 2% des Gesamtproteingehaltes des ER aus (Tu *et al.*, 2000). Es ist ein lösliches 56 kDa Protein im Lumen des ER, dessen funktionell aktive Form ein Homodimer ist. Das Enzym katalysiert die Oxidation, Reduktion sowie die Umlagerung von Disulfid-Brücken bei einer Vielzahl von Proteinen. Neben der PDI sind auch die Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPI) von entscheidender Bedeutung innerhalb des Faltungsprozesses von Proteinen. Große Proteine falten sich in der Regel eher langsam, was meist durch die Isomerisierung der Prolinimid-Bindung bedingt ist. Die meisten Aminosäuren sind über eine Amid-Bindung miteinander verknüpft, die sowohl eine cis- als auch trans-Konfiguration aufweisen kann, wobei die trans-Konfiguration bevorzugt ausgebildet wird. Eine Ausnahme bildet Prolin, das zur vorhergehenden Aminosäure eine Imid-Bindung eingeht, welche cis- und trans-Konfiguration gleichermaßen favorisiert. Diese ansonsten eher langsam verlaufende cis/trans-Isomerisierung wird durch die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPI) beschleunigt. Diese Reaktion stellt somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Proteinfaltung dar.



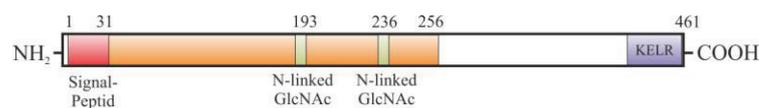
**Abb. 2.8: Domänenstruktur der Proteindisulfidisomerase (PDI)**

Modellhafte Darstellung der Domänenstruktur von PDI. Das Protein enthält zwei Thioredoxin-Domänen sowie ein C-terminales ER-Retentionsmotiv.

### 2.2.6 Der Nukleotidaustauschfaktor Sil1

Sil1 – oder auch BiP-associated protein, kurz BAP genannt – wurde ursprünglich von Tyson und Stirling (2000) als „Suppressor of the *Aire1 Δlhs1* double mutant number 1“ identifiziert. Die cDNA codiert ein 461 Aminosäure großes Protein mit N-terminaler ER-Targeting-Sequenz, zwei möglichen N-Glykosylierungsstellen sowie einem C-terminalen ER-Retentionssignal (KELR) (Abb. 2.9). Zudem wurden zwei Polyadenylierungs-Signal-Sequenzen innerhalb der humanen mRNA identifiziert (Chung *et al.*, 2002). Sil1 zeigt eine zu 29% übereinstimmende Sequenz zum cytosolischen Hsp70-Bindeprotein, HspBP1, welches die ATPase-Aktivität von Hsp70 inhibiert (Raynes *et al.*, 1998). Zudem weist die Region zwischen den Aminosäuren 70 und 108 eine hohe Homologie zu einer ähnlichen Region bei Sls1p auf, welches als ER residentes Protein in *Yarrowia lipolytica* und *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert wurde (Kabani *et al.*, 2000; Tyson & Stirling 2000). Sls1p bindet an die ATPase Domäne von Kar2p und stimuliert dessen Nukleotidaustausch.

*SIL1* ist ein ubiquitär exprimiertes Co-Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums, wobei der höchste Expressionslevel in sekretorischen Geweben wie Leber, Placenta und Niere beschrieben wurde (Chung *et al.*, 2002). Zusammen mit Hsp40 Chaperonen und dem molekularen Hsp70 Chaperon BiP und Grp170 bildet Sil1 ein funktionelles Netzwerk (Zimmermann *et al.*, 2006; Weitzmann *et al.*, 2007; Zahedi *et al.*, 2009).



#### Abb. 2.9: Domänenstruktur von Sil1

Modellhafte Darstellung der Domänenstruktur von Sil1. Die cDNA codiert ein 461 AS großes Protein mit N-terminaler ER-Targeting-Sequenz, zwei N-Glykosylierungsstellen sowie einem C-terminalen ER-Retentionssignal (KELR). Der Bereich bis AS 256 bildet die Interaktionsdomäne mit dem Hsp70 Chaperon BiP.

### 2.2.6.1 Sil1 als Regulator des Hsp70 Chaperons BiP

Sil1 wurde als erster Nukleotidaustauschfaktor von BiP identifiziert, welcher zusammen mit Chaperonen der Hsp40-Familie dessen ATPase Aktivität stimuliert. Das Protein interagiert innerhalb der ATPase Domäne mit der ADP-gebundenen Form von BiP und ist so für die Freisetzung von ADP verantwortlich. Diese Reaktion basiert auf einer Änderung in der Konformation der ATPase-Domäne von BiP nach Sil1 Bindung und ermöglicht so die Substrat-Freisetzung von BiP und die erneute Bindung von ATP (Tyson & Stirling, 2000; Kabani *et al.*, 2000, Chung *et al.*, 2002).

### 2.2.6.2 Sil1 und das Marinesco-Sjögren Syndrom (MSS)

2005 haben genetische Studien der Arbeitsgruppen von Anttonen und Senderek an finnischen Familien gezeigt, dass beide Allele betreffende Mutationen im *SIL1*-Gen beim Menschen, infolge einer verkürzten Proteinvariante durch Einbau eines verfrühten Stopp-Codons oder durch Defekte während des alternativen Splicings, als Ursache für das Marinesco-Sjögren-Syndrom gelten.

Bei MSS handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Multisystemerkrankung, welche im Jahre 1931 nach dem rumänischen Neurologen Gheorghe Marinesco und dem schwedischen Psychiater und Genetiker Karl Gustaf Torsten Sjögren, benannt wurde. Das klinische Krankheitsbild ist durch eine zerebelläre Ataxie mit Kleinhirnatrophie, früh auftretenden Katarakte sowie einer Myopathie geprägt (Anttonen *et al.*, 2005; Senderek *et al.*, 2005). Bei einigen der Betroffenen wurden zudem eine mentale Retardierung und zusätzliche Skelettauffälligkeiten wie Kleinwuchs oder eine verzögerte Sexualentwicklung durch hypergonadotropher Hypogonadismus beobachtet (Lagier-Tourenne *et al.*, 2003). Die meisten Betroffenen haben zudem einen erhöhten Kreatinkinasespiegel im Blut und myopathische Veränderungen in der Muskelbiopsie. Im Gegensatz zu anderen Chaperon-assoziierten Erkrankungen weist das MSS ein weites Spektrum an Symptomen, als Folge einer starken Heterogenität an Mutationen im *SIL1*-Gen, auf. Als Genort für das MSS wurde der lange Arm von Chromosom 5 innerhalb der Region q31 kartiert (Lagier-Tourenne *et al.*, 2003).

In Mäusen führt eine beide Allele betreffende Mutation von Sil1 durch Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen, sowohl im ER als auch im Zellkern, zu

ER-Stress und schließlich zur Degeneration der Purkinje-Zellen in den Lobuli I-VIII des Cerebellums. Die Tiere entwickeln zwischen dem 3. und 4. Lebensmonat eine schwere Atxie, weswegen sie als „woozy“- (wz) Mäuse beschrieben wurden. Als Ursache dieses „woozy“-Phänotyps wurde eine ETn Retrotransposon-Insertion im murinen *SIL1*-Gen nachgewiesen, was eine Verkürzung des Proteins zur Folge hat (Zhao *et al.*, 2005). Analog zum Marinesco-Sjögren Syndrom handelt es sich auch hier um eine autosomal-rezessive Erkrankung. Obgleich *SIL1* in weiten Bereichen des Gehirns exprimiert wird, konnte nach Mutationen im *SIL1*-Gen nur in Purkinje-Zellen eine Akkumulation von Proteinen und letztlich eine Degeneration der Zellen beobachtet werden. 2010 haben die Arbeiten von Zhao *et al.* gezeigt, dass eine Überexpression von ORP150, einen alternativen Nukleotidaustauschfaktor von BiP, ER-Stress verhindert und die in den *Sil1*<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtete Neurodegeneration vermindert. *Tabelle 2.2* gibt einen Überblick über Komponenten des molekularen Chaperon-Netzwerkes sowie daran beteiligter Co-Enzyme.

**Tabelle 2.2: Überblick über verschiedene Komponenten des molekularen Faltungnetzwerks des Endoplasmatischen Retikulums von Säugern und der Hefe *S. cerevisiae*.**

<i>Chaperon-Familie/ Faltungsenzyme</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Hsp40	ERj1 (Mtj1) Sec63 (ERj2) ERj3 ERj4 ERj5 (JPDI) ERj6 (p58IPK) ERj7 (Gng10)	- Sec63 Scj1 - - - -
Hsp70/Hsp70-verwandt	BiP (Grp78/HSPA5) Grp170 (Orp150, Hyou1)	Kar2 Lhs1
Hsp90	Grp94	-
Nukleotidaustauschfaktoren	Grp170 (Orp150, Hyou1) Sil1 (BAP)	Lhs1 Sil1
Lektine	Calnexin (Canx) Calretikulín (Calr)	Calnexin-Homolog (Cne1) -
Proteindisulfid- Isomerasen	PDI PDIA2 (PDIP) PDIA3 (ERP57) PDIA4 (ERP70) PDIA5 (PDIR) PDIA6 (ERP5) TMX3	PDI1 - - - - - -

## 2.3 Chaperon/Co-Chaperon-assoziierte Krankheiten

Im Verlauf der letzten Jahre wurden BiP und seine Interaktionspartner mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, wie beispielsweise mit einer Gruppe infektiöser Erkrankungen, welche durch das Shigella Toxin von *E. coli* verursacht werden. So führt beispielsweise die Subtilase AB (SubAB) durch ihre katalytische A-Untereinheit zur Spaltung und Inaktivierung des Chaperons (Paton *et al.*, 2006). Mutationen im Gen von *SEC63* konnten zusammen mit solchen in *PRKCSH* (protein kinase C substrate 80 K-H) mit der autosomal dominanten polycystischen Leber-Erkrankung (ADPLD) assoziiert werden (Davila *et al.*, 2004). ADPLD ist charakterisiert durch eine Lebervergrößerung mit Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Zysten. Hierbei wäre denkbar, dass Sec63 essentiell für den Import sowie die Faltung verschiedener sekretorischer oder Plasmamembran-Proteine ist, welche das Wachstum und die Proliferation von Gallenzellen kontrollieren. Ohne funktionales Sec63 würden diese Proteine nicht ihren Bestimmungsort erreichen, was ein unkontrolliertes Zellwachstum der betroffenen Zellen zur Folge haben könnte. Daneben wurden auch Mutationen von *SEC63* in verschiedenen mikrosatellitenstabilen Karzinomen beschrieben (Mori *et al.*, 2002). Darüber hinaus stehen auch weitere Komponenten der ER-Chaperon-Maschinerie in direktem Bezug zu weiteren Krankheiten. So konnte beispielsweise eine Überexpression von *SEC62* in Prostatakarzinomen beobachtet werden (Jung *et al.*, 2006). Die Überexpression von BiP, Calnexin und GRP170 unterdrückt dagegen die Bildung von  $\beta$ -Amyloid Peptiden, der Hauptkomponente extrazellulärer seniler Plaques der Alzheimer Krankheit (Hoshino *et al.*, 2007). Eine Überexpression von Grp170 verhindert dagegen den bei Mäusen durch Verlust von S111 beobachteten ER-Stress sowie die Degeneration der Purkinje-Zellen, während eine abfallende Expression von Grp170 den Zustand verschlimmert (Zhao *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen veranschaulichen die Bedeutsamkeit eines funktionierenden ER-Chaperon-Systems zur Erhaltung der zellulären Funktionen.

## 2.4 Die „Unfolded Protein Response“

In Hefen wie auch in Säugern führt die Akkumulation ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine, verursacht beispielsweise durch Defekte innerhalb des BiP ATP/ADP Austauschzyklus, welche in einer veränderten Substratbindung und -freisetzung resultieren (Gething 1999; Zhao & Ackerman, 2006), zur Induktion der „Unfolded Protein Response“, der zellulären Antwort auf ER-Stress (Kozutsumi *et al.*, 1988). Als Folge erhöht die Zelle ihre Faltungskapazität, indem sie die Transkription von Genen, welche für ER-residente Chaperone und Faltungskatalysatoren kodieren, erhöht (McMillan *et al.*, 1994; Shamu *et al.*, 1994) und die Translation zur Entlastung herabgesetzt (Harding *et al.*, 1999). Reichen diese Prozesse zur Entlastung nicht aus, gehen die Zellen in Apoptose (Zhang & Kaufman, 2004; Kim *et al.*, 2006). Das Hsp70 Chaperon BiP wirkt als Sensor des UPR-Netzwerkes. In ungestressten Zellen ist BiP an die Regulatoren der UPR wie die Transmembrankinasen Ire1, ATF6 oder PERK gebunden, wodurch diese in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Bei Belastung des ER mit ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen konkurrieren diese mit den Transmembrankinasen um die Bindung von BiP, in dessen Folge dieses dissoziiert und an die ungefalteten oder fehlgefalteten Proteine bindet. Dies führt zur Aktivierung von Ire1 und PERK durch Dimerisierung (Bertolotti *et al.*, 2000) sowie von ATF6 durch Transport zum Golgi-Apparat (Shen *et al.*, 2002). Die Dimerisierung von IRE1 führt zur Autophosphorylierung und Stimulation der intrinsischen RNase-Aktivität, was zum Spleißen der mRNA des Transkriptionsfaktors XBP1 (X-box binding protein 1) zu XBP-1s führt. XBP-1s bindet an die regulatorischen Regionen von Chaperonen, wodurch deren Transkription initiiert wird (Shen *et al.*, 2001; Calfon *et al.* 2002; Lee *et al.*, 2002; Yoshida *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2003). ATF6 dagegen erfährt im Golgi-Apparat eine proteolytische Spaltung durch S1P sowie S2P (Ye *et al.*, 2000). Die Fragmente gelangen anschließend in den Zellkern wo sie an sogenannte ER-Stress-Elemente (ERSE) in der Promotorregion von UPR-Zielgenen binden (Yoshida *et al.*, 2000). Neben der erhöhten Syntheserate von Chaperonen ist die Verlangsamung der Translation ein weiteres Charakteristikum der UPR. Innerhalb dieses Prozesses spielt das Membranprotein PERK eine zentrale Rolle (Shi *et al.*, 1998). Bei PERK handelt es sich um eine Kinase, welche durch ER-Stress die  $\alpha$ -Untereinheit des Translations-Initiationsfaktors 2 (eIF2) phosphoryliert, wodurch die Ausbildung von Translations-Initiationskomplexen verhindert wird, welche für die Erkennung von Startcodons

notwendig sind (Harding *et al.*, 1999). ERj1p, ein Membranprotein mit einer luminalen J-Domäne, welche funktionell mit BiP interagiert (Brightman *et al.*, 1995; Chevalier *et al.*, 2000; Dudek *et al.*, 2002), könnte zudem auf Grund seiner in der Arbeit von Zupicich *et al.* (2001) gezeigten Funktion als möglichen Transkriptionsfaktor, ebenfalls eine Rolle innerhalb des UPR-Pathways spielen, da es in Abwesenheit von BiP die Translation arretiert (Dudek, *et al.*, 2005). Ein weiterer regulatorischer Mechanismus der UPR zur Entlastung der Proteinlast könnte in der Signalsequenz der Proteine liegen. Hinweise darauf erbrachte die Arbeitsgruppe von Hegde (2006), die zeigte, dass während akutem ER-Stress die strukturellen Unterschiede wie Ladung, Länge, Hydrophobizität oder Aminosäure-Zusammensetzung innerhalb der Signalsequenz zu einem selektiven Import sekretorischer Proteine führten.

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Funktion des Hsp70 Chaperons BiP sowie die seiner beiden Nukleotidaustauschfaktoren Sil1 und Grp170 in Säugerzellen näher untersucht werden. Ziel war es, ein Zellkultursystem zu etablieren, in dem das jeweilige Protein depletiert ist. Diese Strategie wurde über die siRNA vermittelte Interferenz unter Verwendung mindestens zwei verschiedener siRNAs verfolgt. Über Western-Blot-Analyse, RT-PCR sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte hierbei die Evaluierung durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang war es wichtig zu überprüfen, welche phänotypischen Auswirkungen eine über diese Strategie erzeugte Depletion von BiP bewirkt und ob sie möglicherweise zur Induktion der UPR führt. Darüber hinaus war eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit, die Funktion von BiP bezüglich des Proteintransportes erstmals in Säugerzellen zu untersuchen. Für das Hsp70 Chaperon BiP wurde bisher lediglich anhand von *in vitro*-Experimenten eine Beteiligung am Proteintransport in das ER beschrieben (Klappa *et al.*, 1991; Dierks *et al.*, 1996; Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003; Tyedmers *et al.*, 2003). Die Analyse sollte hierzu in permeabilisierten, BiP depletierten Säugerzellen anhand von verschiedenen Modelproteinen durchgeführt werden.

Ein weiterer experimenteller Ansatzpunkt bestand darin, ob sich der von Alder *et al.* (2005) beschriebene dominant-negative Effekt von Kar2p hinsichtlich des BiP vermittelten Schließens der Translokationspore auch *in vivo* nachweisen lässt, und ob das Protein mitunter eine Depletion von BiP kompensieren kann. Hierzu sollte Kar2 in Zellen überexprimiert und anschließend der Effekt bezüglich des Proteintransportes und der Zellvitalität untersucht werden.

Genetische Studien haben gezeigt, dass Mutationen im *SIL1*-Gen und ein dadurch bedingter Verlust von funktionalem Sil1 mit einer neurodegenerativen Erkrankung, dem Marinesco-Sjögren Syndrom sowie den „woozy“-Mäusen, assoziiert ist. Derzeit konnte jedoch noch nicht geklärt werden, weshalb ein Funktionsverlust von Sil1 nicht letal ist und stattdessen zu einer gestörten Funktion bestimmter Organe führt. Diese selektive Betroffenheit legt nahe, dass verschiedene Faktoren dafür verantwortlich sein könnten: Zum einen wäre es denkbar, dass in den betroffenen Zellen essentielle Proteine auf Grund einer gestörten Proteinsekretion nicht sezerniert werden. Zudem könnte das Protein eine bisher unbekannte, gewebespezifische Funktion ausüben. Ebenso wäre eine kompensatorische

Genexpression, welche in den betroffenen Geweben nicht vorkommt, vorstellbar. Unter diesen Gesichtspunkten sollte im Zuge dieser Arbeit der Verlust von Sil1 mit Hilfe zellbasierter Assays auf die Vitalität der Zellen, insbesondere auf möglichen ER-Stress, überprüft werden. In diesem Zusammenhang stellte sich zudem die Frage, inwiefern sich ein Verlust von Sil1 auf den Proteintransport auswirkt.

Auf der Grundlage der Ergebnisse von Weitzmann *et al.* (2007) die zeigten, dass Grp170 als alternativer Nukleotidaustauschfaktor zu Sil1 agieren kann und so möglicherweise den Funktionsverlust von Sil1 in den nicht betroffenen Geweben kompensieren könnte, wäre erst bei Verlust beider Proteine auf Basis des Phänotyps dieser Erkrankung ein Effekt zu erwarten. Dies sollte anhand der bereits erwähnten Strategien untersucht werden. Ferner sollte ein Vergleich des Expressionsprofils von Sil1 und Grp170 mittels Western-Blot-Analyse in verschiedenen humanen Zelltypen durchgeführt werden, um ein mögliches gewebespezifische Vorkommen zu überprüfen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Abimed, Düsseldorf:** Gilson-Pipetten

**Agiland, Böblingen:** Bioanalyser 2100 expert DNA 7500

**Amaxa, Köln:** Nukleofektor I Elektroporator

**AGFA-Gevaert, München:** Entwicklermaschine Gevamatric/Curix 60

**Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:** Spannungsgeräte EPS 3500 und EPS 600, LKB-MultiTempII, Phosphoimager<sup>TM</sup>-SF, Exponierplatten-Belichter (Image Eraser), Exponierplatten (Storage Phosphor Screen) und Exponier-Kammer (Exposure Cassette), Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL

**Beckmann, München:** GS-6KR Zentrifuge (Bactifuge), J2 MC-Zentrifuge mit JA-10 und JA-20 Rotor

**Berthold Technologies, Bad Wildbad:** Luminometer Lumat LB 9501

**Biorad, München:** Trans-Blot<sup>®</sup>Electrophoretic Transfer Cell (Nass-Blot-Apparatur für SDS-Gele); Spannungsgerät Power-PAC 300

**Eppendorf, Hamburg:** Kühlzentrifuge (5402), Thermostat 5320, Tischzentrifuge (5415 C/R), Thermomixer, 2 ml Reaktionsgefäße

**Fröbel Labortechnik, Wasserburg:** Gelrockner, Wipptische, Sterilbank, Speed-Vac (evaporator centrifuge CON-1000)

**GE Healthcare, Freiburg:** Typhoon<sup>TM</sup> Trio (9410) Fluoreszenz-Laserscanner, ImageQuant Auswertungssoftware, High performance chemiluminescence film

**Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim:** Sterilbank

**Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen:** Zellkulturschalen Ø 3,5 cm, 6 cm und 10 cm, Gewebe- und Suspensionskultur-Flaschen 50 ml (25 cm<sup>2</sup>) und 250 ml (75 cm<sup>2</sup>), 6 well-, 12 well-, 96 well-Zellkultur-Multiwellplatten,

**Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen:** Rotationsschüttler

**Heidolph, Schwabach:** Magnetrührer MR 3000

**Heraeus, Hanau:** Bactifuge, Trockenschrank, Brutschrank Hera cell 150

**Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt:** Pipetus<sup>®</sup>-akku Pipettierhilfe

**Infors, Bottmingen, CH:** Inkubationsschüttler

**Julabo, Seelbach:** Wasserbäder

**Kodak, München:** Röntgenfilme X-Omat AR

**Marienfeld, Lauda-Königshofen:** Objektträger, Neubauer Zählkammer

**Memmert und Co. KG, Schwabach:** Brutschrank BE500

**Millipore Co., Bedford, USA:** Immobilon-P Transfermembran (PVDF, Porengröße 0,45 µm)

**Peqlab, Erlangen:** Primus 96 advanced<sup>®</sup> Gradient PCR-Thermocycler

**Perkin, Elmer, USA:** PCR-Maschine Gene Amp PCR System 2400

**Pharmacia Biotech, Freiburg:** Photometer Ultrospec 3000; Spannungsgeräte EPS 3500 und EPS 600

**Roche, Mannheim:** xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) SP & 96 well E-Plate

**Sarstedt, Nürnberg:** 1,5 ml Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen

**Sartorius, Göttingen:** Feinwaagen BP61, BP4100, LA420

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

**Schütt, Göttingen:** Autoklav

**Sigma, Steinheim:** Glasbeads

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

**Thermo Scientific, Dreieich:** Nano-Drop-1000 UV/VIS-Spektralphotometer, HERAcell 150 CO<sub>2</sub>-Inkubator

**Tecan, Männedorf (CH):** Microplate Reader Infinite M200

**VWR, Darmstadt:** Ø 10 mm Deckgläser für IF

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

**WTW, Weilheim:** pH-Meter pH 537

**Zeiss, Jena:** Binokulares Mikroskop Axiolab für Hellfeld

**Ziegra, Isernhagen:** Eismaschine

Elektrophoresekammern (Eigenbau der Werkstatt Biochemie 1, Göttingen)

### 3.1.2 Chemikalien

**Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:** [<sup>35</sup>S]-Methionin (1000 Ci/mmol), Nukleosidtriphosphate (ATP, UTP, GTP, CTP)

**Boehringer, Mannheim:** LDH-Cytotoxizitäts-Kit

**Difco Laboratories, Detroit, USA:** Bacto Agar

**Fermentas, St.Leon-Rot:** Pure Extrem Rapid DNA Ligation Kit

**Genomed, Bad Oeyenhausen:** Jet star Plasmid Purification MIDI-Kit/50 2.0

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

**Invitrogen GmbH, Karlsruhe:** DMEM+GlutaMAX™ I, Gibco®PBS, OPTI-MEM® +GlutaMAX™ I, MEM NEAA 100x (non essential Amino-acids), Gibco®DMEM, ER-Tracker™ Blue-White DPX, Lipofectamine™ 2000 Reagent, Countess™ automated cell counter

**Merck, Darmstadt:** Digitonin

**PAA, Pasching:** RPMI 1640 Ready Mix, Trypsin/EDTA, Penicillin/Streptavidin (100x)

**New England Biolabs:** BSA, BioLux™-Gaussia Luziferase Kit

**Promega Biotec, Madison, USA:** RNasin® Ribonuklease-Inhibitor, SP6- und T7-RNA-Polymerase, Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease treated L4960

**Qiagen:** QIAquick PCR Purification Kit (250), HiPerFect Transfection Reagent, Effectene Transfection Reagent, QIAamp RNA Blood Mini Kit

**Roche Diagnostics, Mannheim:** Trypsin, ATP, DTT, Translation Kit (TNT-Retikulozytenlysat), RNase A, FuGENE HD Transfection Reagent, WST-1 Reagent

**Riedel de Hean, Hannover:** Aceton, Essigsäure, Kaliumacetat

**Roth, Karlsruhe:** LB-Agar (Lennox), LB-Medium, TB-Medium

**Serva, Heidelberg:** Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Bromphenol-blau, Ethanol, HEPES, Saccharose, SDS, TEMED, Triton X-100

**Sigma-Aldrich, München:** β-Mercaptoethanol, Ampicillin, BSA, DMSO, EGTA, Kanamycin, Tween 20, Peroxidase-gekoppelte Anti-IgG-Antikörper, PMSF

Die restlichen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

### 3.1.3 Enzyme

*Pwo-* (*Pyrococcus woesei*) DNA-Polymerase (Roche, Mannheim)

T4-Ligase (Fermentas)

Proteinase K (Roche)

Restriktionsendonukleasen *BamHI*, *NcoI*, *XhoI*, *XbaI*, *EcoRI*, *BglII*, *EcoRV*, *MscI*, *SacI*, *NheI* (MBI Fermentas)

T7-RNA-Polymerase (Promega)

RNase A (Roche)

### 3.1.4 Bakterienstämme

***E. coli* JM 101:** *pE thi-1Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*]  
(aus Stammsammlung des Institutes für Medizinische Biochemie der  
Universität des Saarlandes)

***E. coli* M15:** Enthält ein Repressorplasmid [pREP4] mit Kan<sup>R</sup>  
(Qiagen)

### 3.1.5 Antikörper

Bei den meisten verwendeten Antikörpern handelt es sich um Peptidantikörper, welche aus dem Blut von Kaninchen gewonnen wurden. Die Immunisierung, Blutentnahme und Gewinnung der Seren erfolgte im Labor von PD Dr. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes).

**Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
BiP	Polyklonaler Peptidantikörper gegen BiP	Kaninchen UdS	1:300
Grp170	Polyklonaler Peptidantikörper gegen N-Terminus von Grp170 (LAVMSVDLGSEC)	Kaninchen UdS	1:800
Sil1 (h)	Polyklonaler Peptidantikörper gegen humanes Sil1	Kaninchen UdS	1:500
Sil1 (h/m)	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Sil1 (AS 86-97) (PAGSHVRLNLQT)	Kaninchen UdS	1:500
Kar2	Polyklonaler Antikörper gegen C-terminalen Bereich von Kar2p (AS 494-652)	Schaf Manchester University	1:10.000
β-Aktin	Monoklonaler Antikörper gegen β-Aktin	Maus Sigma	1:4000
Calnexin	Polyklonaler Antikörper gegen C-Terminus von Calnexin	Kaninchen Sressgene	1:1000
Calretikulin	Polyklonaler Antikörper gegen Calretikulin	Kaninchen UdS	1:1000
PARP	Polyklonaler Antikörper gegen PARP	Kaninchen UdS	1:500
Ubiquitin	Polyklonaler Antikörper gegen Ubiquitin	Kaninchen Sigma	1:80
Ezrin/Radixin/Moesin	Polyklonaler Antikörper gegen Ezrin/Radixin/Moesin	Kaninchen Cell Signaling	1:750

Als Sekundärantikörper wurden ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG und ein Ziege-anti-Maus-IgG (Sigma) in einer 1:1000 Verdünnung sowie die Cy-Fluoreszenzfarbstoff-markierten ECL™ Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und ECL™ Plex Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy5 (GE Helthcare) in einer 1:1250 Verdünnung eingesetzt. Zur Normierung der Proben in der Western-Blot-Analyse wurde der Maus-anti- $\beta$ -Aktin Antikörper verwendet. Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurde ein Texas Red-konjugierter Esel-anti-Schaf-IgG sowie ein FITC-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) in einer 1:1000 Verdünnung benutzt.

### 3.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten RNA-Oligonukleotide (siRNAs)

Name	Gen	Organismus	Sense Sequenz je + dTdT-Überhang
Grp170 #1	Grp170 NM_006389	Human	GCAUGGCGAUUAAGAATCC
Grp170 #2	Grp170 NM_006389	Human	GGAAAACACCGGUGAUCGU
Grp170 #3 UTR	Grp170 NM_006389	Human	GGAUUCUCACUCGUAUUUC
Grp170 #4	Grp170 NM_021395	Maus	GGAAUCUCGGAGGAAAACU
Grp170 #5	Grp170 NM_021395	Maus	CGACAUUAGAGAAAGUCAU
Grp170 #6	Grp170 NM_021395	Maus	GGUUUGAAUCAAAUUGUAC
BiP UTR	BiP NM_005347	Human	GCGGCUGUUUACUGCUUUU
BiP Ca	BiP NM_005347	Human	CCUUCGAUGUGUCUCUUCU
BiP mUTR	BiP NM_005347	Maus	GGAACUUUCGUUGGGAGAA
Sil1 #1	Sil1 NM_022464	Human	CCAACACCUACACAUCUCA
Sil1 #2	Sil1 NM_022464	Human	GGAGUUUGCCCUGACCAAC
Sil1 #3	Sil1 NM_022464	Human	GGACAAGUCCGAAAUAAU
Sil1 #4 UTR	Sil1 NM_022464	Human	GCAGCUCUGUACCUUGGGA
Sil1 #4	Sil1 NM_030749	Maus	GGUGUUCCACCCAACUCAA
Sil1 #5	Sil1 NM_030749	Maus	GGAUUUAAAAGAGGCAGAA
Sil1 #6	Sil1 NM_030749	Maus	GGAAUCAGAUACAAAGGAG

Fortsetzung *Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten RNA-Oligonukleotide (siRNAs)*

Name	Gen	Organismus	Sense Sequenz je + dTdT-Überhang
Si1 #7	Si1 NM_030749	Maus	AGUGGUGAUUAAUGGGCUC
Si1 #8	Si1 NM_030749	Maus	GAUUAUGGUUCGGCUGAUA
Si1 #9	Si1 NM_030749	Maus	GAAGAGAAGGUUGCUGCGC
ctrl siRNA	-	-	AllStar Negative Control (Qiagen)

Alle siRNA-Lyophilisate wurden in RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt. Die Lösung wurde 1 min. auf 90°C erhitzt und anschließend 1 h bei 37°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte in 20 µl Aliquots bei -20°C. Mit Ausnahme der BiP Ca siRNA sowie der ctrl siRNA (Qiagen) wurden die siRNAs von der Firma Ambion bezogen.

*Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten DNA-Oligonukleotide*

Primer	Strang	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
RZ 137	-	GCG GAT CCC TAC AAT TCG TCG TGT TCG	Klonierungsprimer für Kar2 in pQE60-T7 & pAcGFP1-N1 mit Stop und <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
RZ 141	+	CGC CAT GGG CTT TTT CAA CAG ACT AAG CGC	Klonierungsprimer für Kar2 pQE60-T7 mit Start und <i>Nco</i> I+ <i>G</i> -Schnittstelle
RZ 138	+	GCT CTC GAG ATG TTT TTC AAC AGA CTA AGC GC	Klonierungsprimer für Kar2 pAcGFP1-N1 mit Start und <i>Xho</i> I-Schnittstelle
RZ 187	+	GCG AGC TCA TGT TTT TCA ACA GAC TAA GCG CTG GC	Klonierungsprimer für Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP mit Start & <i>Sac</i> I-Schnittstelle
RZ 188	-	CGA CGG CTA GCC TAC AAT TCG TCG TGT TCG	Klonierungsprimer für Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP mit Stop & <i>Nhe</i> I-Schnittstelle
RZ 234	+	GCG AGC TCA TGG CTC CCC AGA GCC TG	Klonierungsprimer für Si1 pAcGGSM2-IRES/GFP mit Start & <i>Sac</i> I-Schnittstelle
RZ 235	-	CGA CGG CTA GCC TCA TCT CAG CTC CTT CAG C	Klonierungsprimer für Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP mit Stop & <i>Nhe</i> I-Schnittstelle
RZ 236	+	GAG AGC TCA TGA TGA AGT TCA CTG TGG TGG CG	Klonierungsprimer für Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP mit Start & <i>Sac</i> I-Schnittstelle
RZ 237	-	GAC GGC TAG CGA GGA TAC ATC AGA AAA AGA TGA GTT GTA G	Klonierungsprimer für Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP mit Stop & <i>Nhe</i> I-Schnittstelle

Fortsetzung *Tabelle 3.3: Übersicht über die verwendeten DNA-Oligonukleotide*

Primer	Strang	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
RZ 132	+	CGG AAG CTT GCT TGT TCT	Sequenzierungsprimer für pQE60-T7 forward
RZ 155	+	CGC TGT AGA AGT AAG TGT	Sequenzierungsprimer für Kar2 forward
RZ 156	-	GCG TCA AGT GCA AAT GTG	Sequenzierungsprimer für Kar2 reverse
RZ 153	+	GCG TGT ACG GTG GGA GGT	Sequenzierungsprimer für pcAGFP1-N1 forward
RZ 154	-	GAT CAG GAT GGG CAC GAT	Sequenzierungsprimer für pcAGFP1-N1 reverse
RZ 139	+	AGT GGT GGC CAC TAA TGG AG	Sequenzierungsprimer für BiP forward
RZ 140	-	GGG GAC AAA CAT CAA GCA GT	Sequenzierungsprimer für BiP reverse
RZ 202	+	CCA TGT TCA TGC CTT C	Sequenzierungsprimer für pAcGGSM2-IRES/GFP forward
RZ 203	-	GAC AAA CGC ACA CCG	Sequenzierungsprimer für pAcGGSM2-IRES/GFP reverse
Sil1		TCA AAG GAA GAC AAG CAA GGC AGG	Primer für quantitative RT-PCR von Sil1 (Hs00223835_m1)

### 3.1.7 Plasmide

*Tabelle 3.4: Plasmide zur in vitro Synthese von Proteinen*

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pQE60-T7	Qiagen-Plasmid mit T7-Promotor	Amp	D. Görlich, MPI Göttingen
BiP pQE60-T7	Gesamtsequenz von BiP über <i>BamHI</i> -Schnittstelle ligiert	Amp	innerhalb dieser Arbeit kloniert
Kar2 pQE60-T7	Gesamtsequenz von Kar2 über <i>NcoI</i> + <i>G</i> - und <i>BamHI</i> Schnittstelle gerichtet kloniert	Amp	innerhalb dieser Arbeit kloniert

*Tabelle 3.5: Plasmide zur Transfektion von Säugerzellen*

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
BiP pAcGFP1-N1	Gesamtsequenz von BiP über <i>BamHI</i> -Schnittstelle kloniert	Kan	innerhalb dieser Arbeit kloniert
Kar2 pAcGFP1-N1	Gesamtsequenz von Kar2 über <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i> -Schnittstelle gerichtet kloniert	Kan	innerhalb dieser Arbeit kloniert
pAcGFP1-N1	Plasmid von BD-Clontech modifiziert, mit Stop-Codon vor GFP-Sequenz	Kan	J. Dudek, UdS

Fortsetzung *Tabelle 3.5: Plasmide zur Transfektion von Säugerzellen*

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
BiP pAcGGSM2-IRES/GFP	Gesamtsequenz von BiP über <i>SacI</i> und <i>NheI</i> -Schnittstelle gerichtet kloniert	Amp	innerhalb dieser Arbeit kloniert
Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP	Gesamtsequenz von Sil1 über <i>SacI</i> und <i>NheI</i> -Schnittstelle gerichtet kloniert	Amp	innerhalb dieser Arbeit kloniert
Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP	Gesamtsequenz von Kar2 über <i>SacI</i> und <i>NheI</i> -Schnittstelle gerichtet kloniert	Amp	innerhalb dieser Arbeit kloniert
pAcGGSM2-IRES/GFP	Vektor mit IRES vor GFP-Sequenz	Amp	V. Flockerzi, UdS

### 3.1.8 Zelllinien

*Tabelle 3.6: Übersicht über die verwendeten Säugerzelllinien*

Zelllinie	Beschreibung	Charakteristik	Medium
HeLa-ATCC	Humanes Cervix-Karzinomzelllinie; Virus-transformiert	epitheliale Zellen, Monolayer	DMEM + GlutaMAX™-1 (+ 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvat) + 10% FCS + 1% P/S
PC3	Humane Prostata-Karzinomzelllinie	epitheliale Zellen, Monolayer	Gibco DMEM (41966-029) (4,5 g/l Glucose, 2 mM Glutamin) + 10% FCS + 1% P/S + 1% AS-Mix
NIH 3T3	Maus Embryofibroblasten	Fibroblasten, Kontakt-Inhibitor	DMEM (4,5 g/l Glucose, 2 mM Glutamin) + 10% FCS + 1% P/S

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1970) ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet hierbei an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist dabei proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Schichten unterschiedlicher Porenstruktur und pH-Werte. In einem niederprozentigen und somit weitporigen „Sammelgel“ werden die negativ geladenen Polypeptide zuerst zu einer schmalen Bande fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen, engporigem „Trenngel“ nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Verwendet wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine ein 12,5%iges oder 15%iges High-Tris-Gel in einem Tris-Puffersystem. Die Proben wurden mit Lämmli-Probenpuffer (5fach konzentriert) versetzt, für 5 min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein vertikales Gel (11 cm x 14 cm x 1 mm) aufgetragen. Als Längenstandard wurde der „Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder“ von Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 45mA über ca. 3 h. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem in *Tabelle 3.7* aufgeführten Pipettierschema, wobei der Boden der Gele mit 2% Agarose abgedichtet und das Gel mit Laufpuffer überschichtet wurde.

#### **Elektrophoresepuffer**

Glycin	384 mM
Tris	50 mM
SDS (w/v)	0,1 %

**Tabelle 3.7: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamid-Gele unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen**

Lösung	Trenngel		Sammelgel
	12,5%	15%	5%
Acrylamid-Konzentration			
40% (w/v) Acrylamid	4,69 ml	6,56 ml	0,6 ml
2% Bisacrylamid (w/v)	1,25 ml	1,76 ml	0,16 ml
1,875 M Tris/HCl pH 8,8	6 ml		-
1 M Tris-HCl/SDS pH 6,8	-		0,6 ml
H <sub>2</sub> O bidest	2,86 ml	1,39 ml	3,34 ml
10 % (w/v) SDS	150 µl		48 µl
TEMED	5 µl		7 µl
10 % (w/v) AMPS	45 µl		45 µl
Gesamtvolumen	15 ml		4,8 ml

		Endkonz. [mM]	Stocklösung	
<b><u>1xLämmli</u></b>	Tris/HCl pH 6,8	60	1 M	3 ml
	Glycerin		87 %	5,75 ml
	SDS		10 %	10 ml
	H <sub>2</sub> O			28,75 ml
	Bromphenolblau		Feststoff	Spatelspitze
	β-Mercaptoethanol			0,5 ml zu 9,5 ml
<b><u>2xLämmli</u></b>	Tris/HCl pH 6,8	120	1 M	6 ml
	Glycerin		87 %	11,5 ml
	SDS		10 %	20 ml
	H <sub>2</sub> O			ad 45 ml
	Bromphenolblau		Feststoff	Spatelspitze
	β-Mercaptoethanol			1 ml zu 9 ml
<b><u>5xLämmli</u></b>	Tris/HCl pH 6,8		1 M	15 ml
	Glycerin		87 %	28,75 ml
	SDS		Feststoff	5 g
	H <sub>2</sub> O			ad 40 ml
	Bromphenolblau		Feststoff	Spatelspitze
	β-Mercaptoethanol			2,5 ml zu 7,5 ml

### 3.2.2 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Das Prinzip des Western Blot beruht auf dem immunologischen Nachweis von Proteinen, die im Anschluss an eine SDS-PAGE auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert wurden.

#### 3.2.2.1 „Nass-Blot“-Methode

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Polyacrylamidgele in Transferpuffer 5 - 15 min. äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu eliminieren. Eine auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde 10 s in 100% Methanol getränkt und im Anschluss daran ebenso wie zwei Filterpapiere 10 min. in Transferpuffer äquilibriert. Nach luftblasenfreier Stapelung der Blot-Komponenten zum Gel-Sandwich (in der Reihenfolge Anode – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Kathode) wurde der Protein-Transfer 3 h bei 400 mA und 15°C (Blotkammer: BioRad-Trans-Blot<sup>®</sup> Cell) durchgeführt.

#### **Transferpuffer**

Glycin	7,2 g
Tris	1,5 g
Aqua bidest	ad 1 l

### 3.2.3 Immunologische Detektion von Proteinen

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen zur Maskierung unbesetzter Bindungsstellen für ca. 15 min. mit Blockingpuffer inkubiert. Es folgte eine mindestens eineinhalbstündige Inkubation der Membran mit einer Antikörper/Blockingpuffer-Lösung des gewünschten Primärantikörpers (*Tabelle 3.1*) bei RT oder eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran durch zweimaliges Spülen über je 5 min. bei RT mit PBST von überschüssigem Antikörper befreit und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die Membran wurde dann erneut für mindestens 1 ½ h bei RT mit einer zweiten Antikörperlösung inkubiert, bei welcher der Sekundärantikörper entweder an Meerrettich-Peroxidase oder einen Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt

war. Die Inkubation fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper erfolgte im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran erneut durch zweimaliges Spülen über je 5 min. bei RT mit PBST gewaschen und weitere zweimal zur Entfernung von Tween-20 über 5 min. gespült. Zur Detektion der Proteinbanden wurde im Fall der Meerrettich-Peroxidase das Enhanced Chemiluminescence Detection (ECL)-System in Kombination mit einem Autoradiographiefilm verwendet. Durch die Peroxidase des Zweitantikörpers wird das Substrat Luminol oxidiert, wobei Licht mit einem Emissionsmaximum von 428 nm entsteht. Dies kann durch die Exposition der Membran mit einem Autoradiographiefilm nachgewiesen werden. Die Membran wurde hierfür für 2 min. in einer Mischung aus gleichen Anteilen einer ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 inkubiert und anschließend zwischen zwei Folien in eine Autoradiographie-Kassette gelegt und ein Film exponiert. Die Expositionszeit betrug 1-10 min. Für eine weitere Inkubation wurde die PVDF-Membran mit Methanol durch ca. fünfminütige Inkubation bei RT reaktiviert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und zweimal für 15 min. mit PBS-Puffer inkubiert. Zur Detektion der Cy-Fluoreszenzfarbstoffe wurde das Typhoon-System verwendet. Hierzu wurde die Membran im Dunkeln getrocknet und dann im Typhoon-System eingescannt.

**PBS-Puffer**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 mM
NaCl	155 mM

**PBST-Puffer**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 mM
NaCl	155 mM
Tween 20 (v/v)	1 %

**Blockingpuffer**

BSA in PBS-Puffer (w/v)	3 %
-------------------------	-----

**Antikörperlösung**

Blockingpuffer + Antiserum	(Verdünnung 1:500 - 1:10000)
----------------------------	------------------------------

### 3.2.4 Ablösen von Antikörpern von der PVDF-Membran

Zur Entfernung gebundener Antikörper von immobilisierten Proteinen auf der PVDF-Membran wurde diese mit 100 mM Glycin pH 2,8 für maximal 30 min. bei RT inkubiert und anschließend zweimal über 15 min. mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen erneut mit einem Blockingpuffer inkubiert. Durch dieses Verfahren werden die Antikörper von den Proteinen entfernt wodurch diese für andere Antikörper zugänglich werden. Dies ermöglicht die immunologische Detektion mehrerer Antikörper auf derselben Membran.

### 3.2.5 Autoradiographie, Phosphorimaging und Densitometrie

#### 3.2.5.1 Autoradiographie und Phosphorimaging

Die Visualisierung der über SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine nach *in vitro* Translation erfolgte über Autoradiographie. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min. in Entfärberlösung zur Fixierung der Proteine inkubiert. Bevor das Gel unter Vakuum auf einem Filterpapier über 1 h - 2 h getrocknet wurde, erfolgte zur Neutralisation eine über 30 minütige Inkubation in Neutralisationslösung. Zur anschließenden Detektion der radioaktiven Zerfallssignale wurde das getrocknete Gel auf eine Exponierplatte (Storage Phosphor-Screen, Molecular Dynamics) gelegt und bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einigen Stunden bis mehrere Tage exponiert. Die Auswertung erfolgte über Phosphorimaging im Typhoon.

#### Entfärberlösung

Essigsäure (v/v)	10 %
Methanol (v/v)	40 %
Glycerin (v/v)	2 %
Aqua bidest (v/v)	48 %

#### Neutralisationslösung

Methanol (v/v)	50 %
Glycerin (v/v)	2 %
Aqua bidest (v/v)	48 %

### 3.2.5.2 Densitometrie

Unter Densitometrie versteht man die quantitative Messung der Farbmenge pro Flächeneinheit. Die quantitative Berechnung der Farbdichte bei den Immundekorationen sowie der Röntgenfilme bei der Autoradiographie erfolgte durch Erfassung der Bandenschwärzung mit Hilfe der Software Image-Quant 5.1. Die Wiedergabe der Signalintensitäten erfolgt hierbei in Form von relativen Zahlenwerten, was die Auswertung mit Hilfe von Excel (Microsoft) ermöglicht.

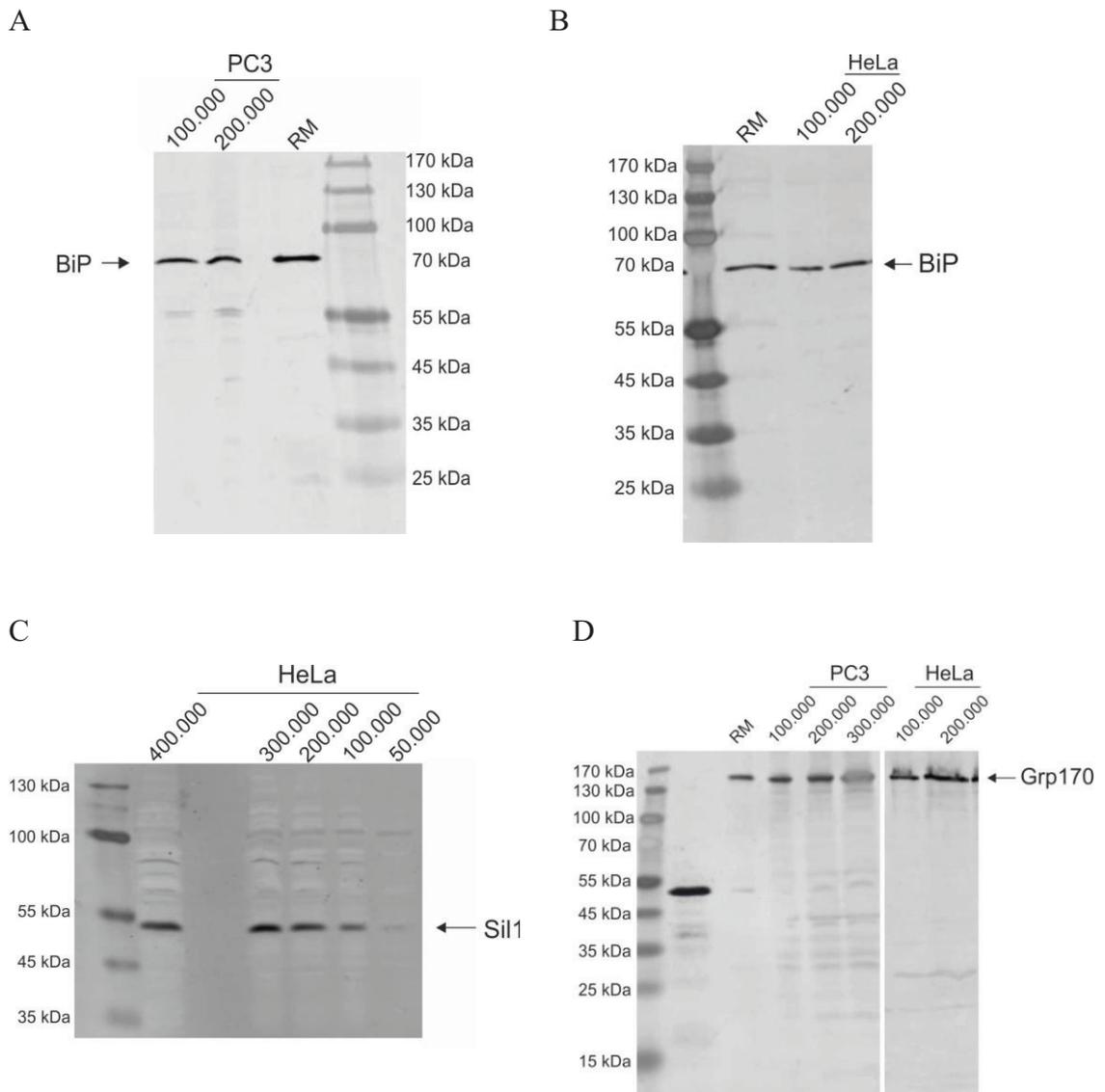
### 3.2.6 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in verschiedenen Zelllinien

Zum Nachweis der Proteindepletion sowie der Synthese von Kar2p über Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen ( $1 \times 10^5$  HeLa-Zellen und  $0,9 \times 10^5$  PC3-Zellen) 24 h vor der Immunfluoreszenz auf Deckgläsern in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese über 8 min. bei RT mit 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS über je 10 min. gewaschen und mittels 0,2% Triton X-100 + 1% BSA/PBS über 5 min. auf Eis permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen folgten drei Waschschrte bei RT über je 10 min. mit PBS + 1% BSA. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (*Tabelle 3.1*) über 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS + 1% BSA wurden die fixierten Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (3.1.5) über 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS + 1% BSA über 5 min. gewaschen und zur Kernfärbung mit DAPI über 5 min. auf Eis gefärbt. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS + 1% BSA und einer kurzen Waschung mit PBS wurden die Deckgläser getrocknet und mit einem Tropfen Mowiol-Propylgallat auf einen Objektträger überführt. Die so aufbereiteten Zellen wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (Nikon) hinsichtlich der Protein-Depletion nach RNA-Interferenz untersucht.

#### **DAPI**

200 ng/ml DAPI in PBS + 1% BSA

Zur Überprüfung, ob die zum Nachweis der Proteindepletion verwendeten Antikörper zu Kreuzreaktionen im Zelllysate führen, wurden Zellextrakte (3.2.9.2) unterschiedlicher Zellzahlen von HeLa- und PC3-Zellen im SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit Antikörper gegen Sil1, BiP und Grp170 inkubiert (*Abb. 3.1*).



**Abb.3.1: Test zur Spezifität verschiedener Antikörper**

Western Blot-Analyse. Der Zellextrakt von  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^5$  HeLa-Zellen (**A**) bzw. PC3-Zellen (**B**) wurde über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte anti-BiP-Antikörper. **C**: Western-Blot Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung von je  $0,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  und  $4 \times 10^5$  HeLa-Zellen nach Inkubation mit anti-Sil1-Antikörper. **D**: Western-Blot Analyse nach SDS-PAGE von  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^5$  PC3- und HeLa-Zellen nach Dekoration mit anti-Grp170-Antikörper. Die eingesetzten Antikörper sind in *Tabelle 3.1* aufgelistet.

### 3.2.7 *In vitro* Synthese von Proteinen

#### 3.2.7.1 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription der Plasmide BiP pQE60-T7 sowie Kar2 pQE60-T7 (Tabelle 3.4) erfolgte über den T7-Promotor mit Hilfe des Roche-Diagnostik-Translationssystems. Hierzu wurden die cDNA der zu synthetisierenden Proteine in Plasmide inkloniert, die stromaufwärts einen T7-Promotor enthielten. Durch Zugabe der T7-RNA-Polymerase konnte so die cDNA in mRNA übersetzt werden. Die Reaktion wurde nach dem im Folgenden dargestellten Pipettierschema angesetzt:

#### Transkriptionsansatz:

Prämix A	30	μl
m <sup>7</sup> GpppG-Lösung 5 mM	2,5	μl
RNAasin (40 U/μl)	1,5	μl
T7-Polymerase (20 U/μl)	1	μl
Plasmid-DNA (2 μl)	1	μg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50	μl

#### Prämix-Lösung:

DTT	8,3	mM
BSA	167	mg/ml
GTP	0,17	mM
ATP, CTP, UTP	je 0,83	mM
Spermidin	2	mM

in 40 mM HEPES/KOH pH 7,4 mit 6 mM Magnesiumacetat

#### m<sup>7</sup>GppG -Lösung:

m<sup>7</sup>GppG 5 U  
in 300 μl 10 mM HEPES/KOH pH 7,9

Die Inkubation erfolgte über 3 h bei 40°C im Wasserbad. Die Polymerasereaktion wurde durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff abgestoppt. Die Transkripte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.7.2 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation erfolgte in Kaninchen-Retikulozytenlysaten (Promega), in denen alle erforderlichen Proteine und Co-Faktoren enthalten sind. Auf Grund ihrer Eigenschaft keine nukleäre DNA zu enthalten, eignen sich die Retikulozyten, bei denen es sich um Vorläufer der Erythrozyten handelt, besonders gut als Testsystem zur *in vitro* Translation. Durch RNase-Behandlung entstehen Lysate ohne RNA, welche nach Zugabe der entsprechenden DNA oder mRNA eine gezielte Synthese einzelner Proteine ermöglichen.

Zwei verschiedene *in vitro*-Systeme fanden in dieser Arbeit Verwendung: Ein nicht-gekoppeltes und ein gekoppeltes System („TNT“-Lysat). Im Letzteren kann im Unterschied zum erstgenannten System eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation durchgeführt werden. Durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin wurden die Substrate zum Nachweis über Phosphorimaging radioaktiv markiert.

Für die *in vitro* Synthese wurden folgende Ansätze gemäß den Herstellerangaben auf Eis pipettiert:

#### gekoppeltes System:

Retikulozytenlysat	12,5	µl
AS-Mix ohne Methionin 1 mM	0,5	µl
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	2	µl
TNT-Puffer	1	µl
(T7/S6)-Polymerase	0,5	µl
DNA (0,5 µg/µl)	0,5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 23	µl

#### Nicht-gekoppeltes System:

Retikulozytenlysat	12,5	µl
AS-Mix ohne Methionin 1 mM	0,5	µl
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	2	µl
RNA (1 µg/µl)	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 23	µl

Die Translation erfolgte über 30 min bei 30 °C, die Lagerung bei -80°C.

### 3.2.8 Transport *in vitro* synthetisierter Proteine in Hundepankreas-mikrosomen (RM) und semi-permeabilisierten Säugerzellen (Zell-ER)

#### 3.2.8.1 Präparation von Säugerzell-ER und Transportansatz

Zum Nachweis des Proteinimportes in das ER von Säugerzellen wurden die Zellen mit Digitonin permeabilisiert, wobei das ER intakt bleibt und seine Funktion beim Proteintransport beibehält. Am Vortag wurden hierzu  $2 \times 10^6$  Zellen in eine mittlere Kulturflasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellen wurden zur nachfolgenden Präparation einmal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin trypsiniert, 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert und in 8 ml KHM-Puffer und 20 ml Trypsin-Inhibitor (Endkonzentration:  $100 \mu\text{g/ml}$ ) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in einen 15 ml Falcon auf Eis überführt, bei 1.200 rpm und  $4^\circ\text{C}$  über 3 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 6 ml eiskaltem KHM-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von  $3,75 \mu\text{l}$  Digitonin in einer Endkonzentration von  $40 \text{ mg/ml}$  (in DMSO) und einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Membranproteine solubilisiert und die Zellmembran permeabilisiert. Nach Zentrifugation bei 1.200 rpm und  $4^\circ\text{C}$  über 3 min. wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem HEPES-Puffer aufgenommen und 10 min. auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut für 3 min. bei 1.200 rpm zentrifugiert, die Zellzahl bestimmt und mit  $0,5 \mu\text{l}$   $0,2 \text{ M CaCl}_2$  und  $1 \mu\text{l}$  Nuklease ( $4000 \text{ U/ml}$ ) zum Verdau der Nukleinsäuren über 12 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von  $2 \mu\text{l}$  EGTA ( $0,2 \text{ M}$ ) und Zentrifugation bei 2.000 rpm über 30 s bei  $4^\circ\text{C}$  wurde das Pellet in so viel KHM-Puffer aufgenommen, dass pro  $4 \mu\text{l}$   $1 \times 10^5$  Zellen enthalten sind. 16% bzw. 32% der semi-permeabilisierten Zellen wurden anschließend zu dem *in vitro*-Translationsansatz (3.2.7.2) gegeben. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit 4% Hundepankreas-mikrosomen (RM) und zwei Pufferkontrollen (Mikrosomenverdünnungspuffer (MVP) und KHM-Puffer) mitgeführt. Die Zugabe von RMs diente als Positiv-Kontrolle, da für alle verwendeten Transportsubstrate die Insertion in raue Mikrosomen bereits gezeigt wurde.

**Schematische Darstellung des Transportansatzes:**

1. 8,84 µl Translationsansatz + 1,04 µl MVP (8%) + 3,12 µl H<sub>2</sub>O
2. 8,84 µl Translationsansatz + 1,04 µl RM (8%) + 3,12 µl H<sub>2</sub>O
3. 8,84 µl Translationsansatz + 4,16 µl KHM (32%)
4. 8,84 µl Translationsansatz + 2,08 µl Zell-ER (16%) + 2,08 µl H<sub>2</sub>O
5. 8,84 µl Translationsansatz + 4,16 µl Zell-ER (32%)

Die Ansätze wurden 60 min. bei 30°C inkubiert und im Anschluss einem Test auf Sequestrierung unterworfen.

**KHM-Puffer**

KOAc	110	mM
MgOAc	2	mM
HEPES pH 7,2	20	mM

**HEPES-Puffer**

KOAc	50	mM
HEPES pH 7,2	90	mM

**3.2.8.2 Sequestrierung**

Zum Nachweis der *in vitro* Synthese von BiP und Kar2p bzw. um den cotranslationalen Transport in RMs oder in das ER von Säugerzellen (3.2.8.1) zu untersuchen, wurden die RMs bzw. die Zellen zum *in vitro*-Translationsansatz zugegeben und anschließend in einer Sequestrierung der Anteil des prozessierten Proteins, welcher vor einem Proteaseverdau durch die Membran geschützt ist, untersucht. Vor Synthesebeginn zur *in vitro*-Translation wurden entweder 8% RMs oder 16% sowie 32% an Zell-ER zugesetzt und anschließend über 1 h bei 30 °C inkubiert. Der Import sowie die Transporteffizienz wurden anschließend mit Hilfe der Methode der Sequestrierung überprüft. Hierzu wurde der Translationsansatz in drei Aliquots von 5 µl aufgeteilt. Ein Aliquot wurde mit 5 µl Saccharose-Lösung versetzt (S). Die Analyse dieser Probe zeigt nach Import sowohl das unprozessierte Vorläuferpeptid als auch das reife, prozessierte Protein. Dem zweiten Ansatz wurde 5 µl Proteinase K-Lösung zugegeben, wodurch alle Proteine, die sich außerhalb des ERs bzw. der RMs befinden und somit nicht durch die Membran geschützt sind, verdaut werden (P). Die nach der Analyse entstehende Bande repräsentiert die prozessierten und geschützten Proteine. Um eine mögliche Resistenz der Proteine gegen die Proteinase auszuschließen, wurde dem dritten Aliquot 5 µl Proteinase K/Triton X-100-Lösung zugegeben. Das Triton solubilisiert die Membran

des ERs bzw. der RMs, so dass alle Substrate verdaut werden. Nach der Probenanalyse sollte somit bei fehlender Proteinaseresistenz keine Bande mehr detektierbar sein. Der Proteinase K-Verdau erfolgte für 60 min auf Eis und wurde durch Zugabe von 2 µl 100 mM PMSF (in Ethanol) gestoppt. Nach einer Inkubation für weitere 5 min. auf Eis wurde 2x-Lämmli-Probenpuffer zugegeben und die Ansätze 5 min. bei 95 °C erhitzt. Nach SDS-PAGE (3.2.1) erfolgte die weitere Analyse mittels Phosphorimaging (3.2.5.1).

**Saccharose-Lösung**

Saccharose 162,5 mM

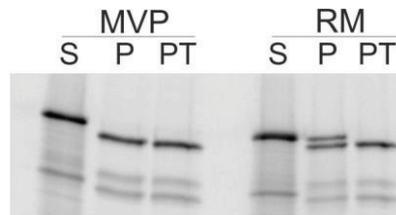
**Proteinase K-Lösung**

Proteinase K 340 µg/ml  
Saccharose 162,5 mM

**Proteinase K/Triton X-100-Lösung**

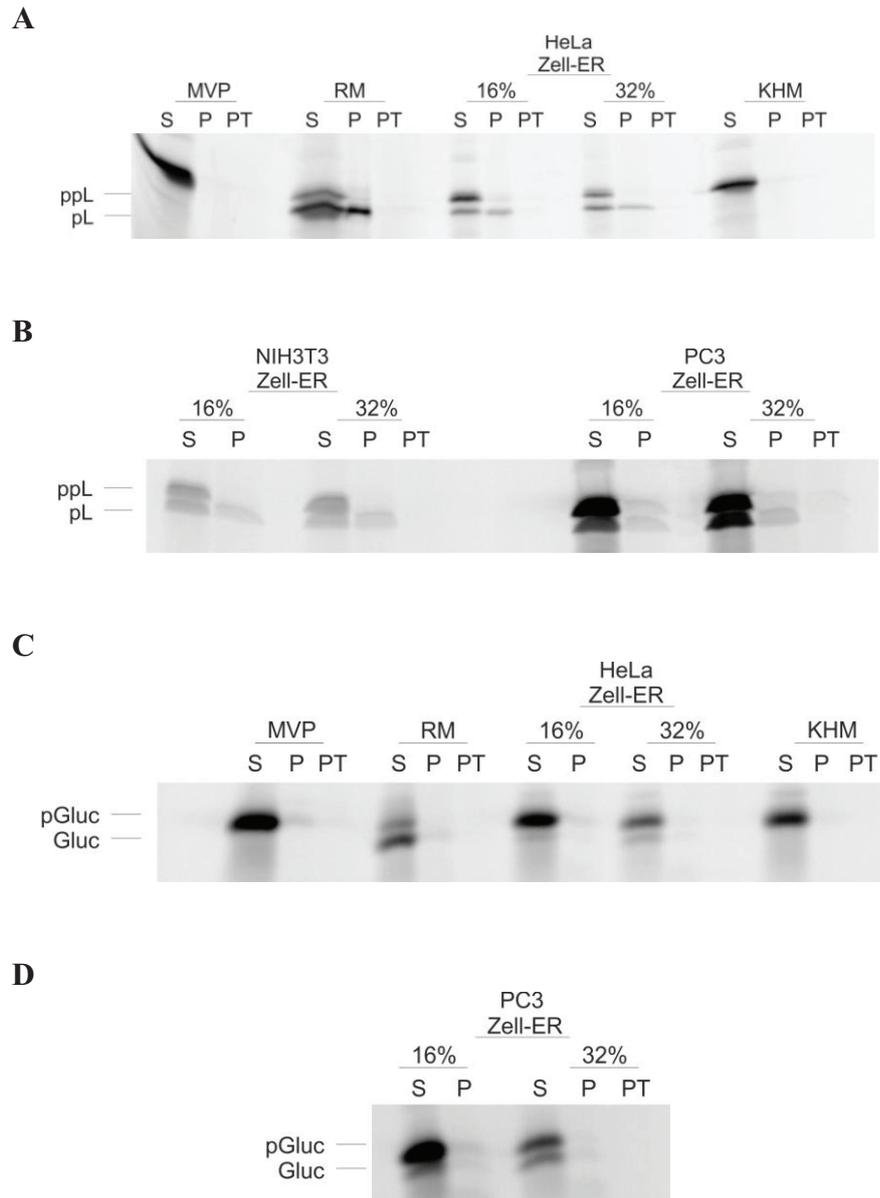
Proteinase K 340 µg/ml  
Saccharose 162,5 mM  
Triton X-100 (v/v) 0,2 %

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die *in vitro* Synthese von BiP pQE60-T7, ppL sowie pGluc und deren Import in Hundepankreas-mikrosomen (RM) sowie in das ER verschiedener Zelllinien.



**Abb. 3.2: *In vitro* Synthese und Transport von BiP in RMs.**

Nachweis des Transports von BiP in RMs. Das Plasmid BiP pQE60-T7 wurde im TNT-Lysat (Promega) translatiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. RMs wurden mit 25 µg/ml Digitonin permeabilisiert. Zur Untersuchung des Transports von BiP wurden dem Translationsansatz 0,7 µl RMs und als Pufferkontrolle 0,7 µl MVP zugegeben. Zur nachfolgenden Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Ansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S), 0,34 mg/ml Proteinase K (P) sowie Proteinase K und Triton X-100 (0,2%) (PT) versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min. auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging.



**Abb. 3.3: *In vitro* Synthese von ppL und pGluc und Transport in das ER von HeLa-, PC3- und NIH3T3-Zellen.**

Nachweis des Transports von ppL und pGluc in verschiedene Zelllinien. Die Substrate wurden im TNT-Lysat (Promega) translatiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Zellen wurden wie unter 3.2.8.1 beschrieben digitonisiert. Zur Untersuchung des Transports wurden dem Translationsansatz 0,7 µl RMs und als Pufferkontrolle 0,7 µl MVP zugegeben. Zur nachfolgenden Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Ansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S), 0,34 mg/ml Proteinase K (P) sowie Proteinase K + Triton X-100 (0,2%) (PT) versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min. auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **A:** *in vitro* Synthese von ppL und Transport in RMs und in das ER von HeLa-Zellen. **B:** *in vitro* Synthese von ppL und Transport in das ER von PC3- und NIH3T3-Zellen. **C:** *in vitro* Synthese von pGluc und Transport in RMs und in das ER von HeLa-Zellen. **D:** *in vitro* Synthese von pGluc und Transport in das ER von PC3-Zellen.

### 3.2.8.3 Transportstudien über Messung der Lumineszenz von pGluc

Die Bestimmung der Lumineszenz der *Gaussia* Luziferase (pGluc) stellt eine weitere Nachweismethode des Proteintransportes in das ER von Säugerzellen dar. Luziferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luziferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen reagieren. Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz, welche im Luminometer gemessen werden kann. Die *Gaussia* Luziferase oxidiert das Luziferin Coelenterazin in einer Reaktion welche Licht mit einer Wellenlänge von 475 nm emittiert. Für diese Reaktion wird kein ATP benötigt (Abb. 3.4).

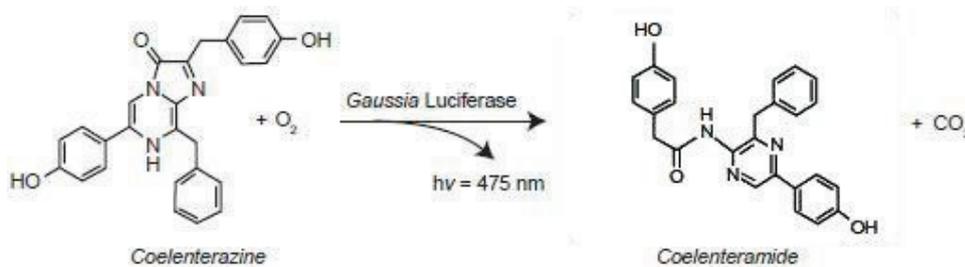


Abb. 3.4: Photooxidation katalysiert von der *Gaussia* Luziferase.

Haddock SHD, McDougall CM, Case JF: The Bioluminescence Web Page  
<http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/> (created 1997; updated 2005)

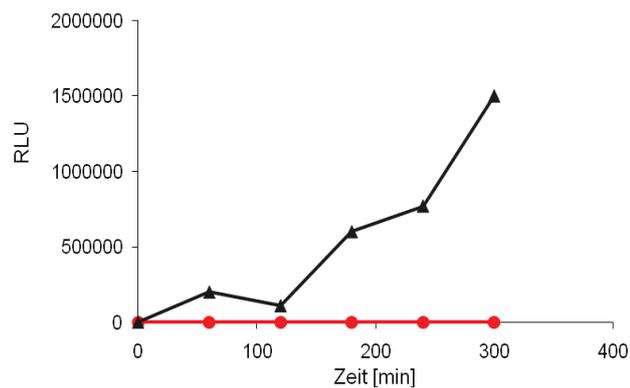
Die Luziferase kann nur nach vollständigem Import und korrekter Faltung ihre lumineszierende Eigenschaft entfalten. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe des *Gaussia* Luziferase Kits (BioLabs, New England). Zur Messung der Lumineszenz wurde pGluc *in vitro* translatiert. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte in Anwesenheit von Zell-ER (3.2.8.1) bei 30°C über einen Zeitraum von 6 h, wobei zu unterschiedlichen Zeiten die Lumineszenz im Luminometer (Lumat LB 9501) per Doppelbestimmung gegen eine Pufferkontrolle gemessen wurde. Im Nachfolgenden ist das Pipettierschema des *in vitro*-Translationsansatzes aufgeführt.

#### Translationsansatz:

Retikulozytenlysat (75%)	18,75 µl
AS-Mix ohne Methionin (1 mM)	0,375 µl
AS-Mix ohne Leucin (1 mM)	0,375 µl
RNasin Nuclease Inhibitor (40 U/µl)	1,5 µl
pGluc (1 ug/µl)	1,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3 µl

10,2 µl des Translationsansatzes wurden mit 4,8 µl Zell-ER (32%) bzw. KHM-Pufferkontrolle versetzt und bei 30°C inkubiert. Zur Messung wurden jeweils 1 µl des Ansatzes mit 50 µl Arbeitslösung (1 ml Puffer + 10 µl Substrat) versetzt und auf dem Vortex für 1 s gemixt.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Messung der Lumineszenz von pGluc nach Transport in das ER von PC3-Zellen.



**Abb. 3.5: Bestimmung der Aktivität der Luziferase pGluc in PC3-Zellen.**

Nachweis der Luziferase-Aktivität von pGluc in PC3-Zellen. pGluc wurde mittels Rabbit Retikulozyten-Lysat (Promega) synthetisiert. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte über einen Zeitraum von 5 h im Luminometer. Um die Hintergrund-Lumineszenz zu bestimmen, wurde parallel eine Pufferkontrolle (KHM) mitgeführt.

Parallel hierzu wurde zur Kontrolle des Proteinimportes ein Translationsansatz mit radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]-Methionin wie folgt durchgeführt:

Retikulozytenlysats	10 µl
AS-Mix ohne Methionin (1 mM)	0,4 µl
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	1,6 µl
RNasin Nuclease Inhibitor (40 U/µl)	0,8 µl
pGluc (1 ug/µl)	0,8 µl (4%)

Jeweils 3,4 µl des Ansatzes wurden mit 1,6 µl KHM (32%) bzw. Zell-ER (3.2.8.1) versetzt und 1 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 5 µl 2x Lämmli- und 10 µl 1x Lämmli-Probenpuffer hinzugefügt und die Proben bei 56°C über 10 min. inkubiert. Die Analyse erfolgte nach SDS-PAGE über Phosphorimaging.

### 3.2.9 Zellkulturversuche

#### 3.2.9.1 Kultivierung von Zellen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenzte Zellen, welche soweit nicht anders angegeben der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Biochemie der Universität des Saarlandes entstammen. In *Tabelle 3.6* sind die benutzten Zelllinien aufgeführt und charakterisiert. Die Zellen wurden in verschiedenen Zellkulturmedien unter Zusatz von 10% fetalem Rinderserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen umgesetzt und mit frischem Medium versehen. Die Lagerung über lange Zeiträume erfolgte in 10% DMSO-haltigem Kulturmedium in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines PCR-Mycoplasmentest auf die Abwesenheit von Mycoplasmen getestet.

Zur Ernte der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (PAA) für ca. 30 s inkubiert. Danach wurde das Trypsin entfernt und die Zellen in entsprechendem Medium aufgenommen, mittels Neubauerkammer die Zellzahl bestimmt und für 3 min. bei 3.000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung tiefgefroren.

#### 3.2.9.2 Zellextraktzubereitung

Zur Vorbereitung auf die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Zellen geerntet, gezählt und durch Zentrifugation bei 3.000 rpm über 4 min. pelletiert. Die Lagerung der Pellets bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei -20°C. Für die SDS-PAGE wurde das Pellet in Lysepuffer und 5x Lämmli-Probenpuffer (3.2.1) aufgenommen, resuspendiert und über 5 min. bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden zur Fragmentierung der DNA Glasbeads zugegeben und der Ansatz ca. 20 min. auf mittlerer Stufe des Vortex-Mixer geschüttelt.

Die Volumina an Lysepuffer und 5x Lämmli-Probenpuffer wurden so gewählt, dass in einem bestimmten Endvolumen eine definierte Anzahl an Zellen enthalten ist (z.B.

in 30  $\mu\text{l}$   $2 \times 10^5$  Zellen), so dass innerhalb einer Versuchsreihe gleiche Mengen an Protein analysiert werden können.

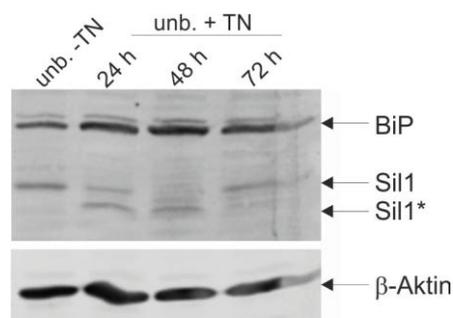
### Lysepuffer

NaCl	100 mM
Tris pH 8,0	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	30 mM
NP40	5 %

### 3.2.9.3 Stress-Induktion durch Behandlung mit Tunicamycin

Tunicamycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliert wurde. Es hemmt die GlcNAc-1-P-Transferase und damit den ersten Schritt in der Verknüpfung Fettsäure:Saccharid, d. h. den Transfer von GlcNAc-1-P aus UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat, an das dann die weiteren Zucker des Oligosaccharides geknüpft werden müssen. Die unterbundene Glykosylierung führt in der Zelle zur Fehlfaltung von Proteinen und somit zu ER-Stress. Zur Induktion von Stress mittels Tunicamycin wurden die Zellen, welche tags zuvor zu je  $1,2 \times 10^5$  Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausplattiert wurden, mit je  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Tunicamycin inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72 h erfolgten die Zellernte sowie der Nachweis über Western-Blot-Analyse durch Inkubation mit einem Anti-BiP-Antikörper.

In der nachfolgenden Abbildung ist ein Western-Blot von Tunicamycin behandelten HeLa-Zellen dargestellt, auf dem verdeutlicht wird, dass BiP als Modulator der UPR hochreguliert und Sil1 durch die Wirkung von Tunicamycin deglykosyliert wurde.



**Abb. 3.6: Western-Blot Analyse Tunicamycin behandelter HeLa-Zellen.**

Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden tags zuvor in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die ER-Stress Induktion erfolgte durch Zugabe von  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Tunicamycin (TN). Nach 24 h, 48 h und 72 h

wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE und Western-Blot mittels anti-BiP-Antikörpers analysiert. Bereits nach 24 h ist eine Zunahme der Menge an BiP sowie eine Deglykosylierung von Sil1 (Sil1<sup>\*</sup>) erkennbar.

### 3.2.9.4 Transfektion von Zelllinien

#### 3.2.9.4.1 Plasmid-Transfektion mit FuGENE HD

PC3-Zellen wurden mit FuGENE HD Transfektions Reagenz (Roche) transfiziert. Hierfür wurden ca.  $0,9 \times 10^5$  Zellen 24 h vor der Transfektion in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit je 2  $\mu\text{g}$  Plasmid und 6  $\mu\text{l}$  Reagenz in einem 100  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz mit Medium ohne Zusätze nach Vorschrift des Herstellers. Nach 15 minütiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz zur Zellkultur gegeben in einem Endvolumen von 1 ml. Die Zellen wurden bis zur Ernte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

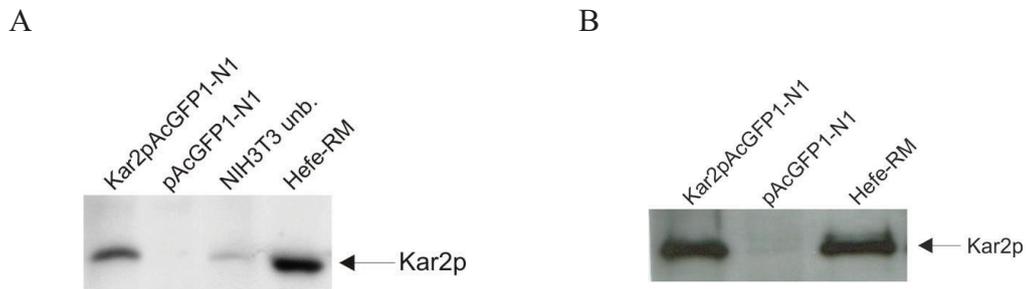
#### 3.2.9.4.2 Plasmid-Transfektion mit Effectene

Zur Plasmidtransfektion von HeLa-Zellen mit Effectene (Qiagen) wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion zu  $1 \times 10^5$  Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Zur Transfektion wurden 3  $\mu\text{l}$  Plasmid (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) in 72  $\mu\text{l}$  Puffer und 2,4  $\mu\text{l}$  Enhancer aufgenommen, kurz gemischt und über 5 min. bei RT inkubiert. Nach 10 minütiger Inkubation mit 3  $\mu\text{l}$  Effectene wurde das Medium der Zellen durch 800  $\mu\text{l}$  frisches Medium ersetzt und das Reagenz in Aufnahme von 400  $\mu\text{l}$  Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden bis zur Ernte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 3.2.9.4.3 Plasmid-Transfektion mit HiPerFect

Die Plasmid-Transfektion von NIH3T3-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen) vorgenommen. Hierzu wurden die Zellen 24 h zuvor zu  $1 \times 10^5$  Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Transfektion setzte sich aus zwei Ansätzen zusammen: Ein Ansatz enthielt die Plasmid DNA (200 ng) ad 50  $\mu\text{l}$  HBS-Puffer, während der zweite Ansatz aus 6  $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz ad 50  $\mu\text{l}$  HBS-Puffer bestand. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden die beiden Ansätze vereint, weitere 10 min. bei RT inkubiert und schließlich zu 1 ml Zellkultursuspension gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Ernte kultiviert.

In der nachstehenden Abbildung ist die Western-Blot-Analyse Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierter NIH3T3- sowie PC3-Zellen 24 h nach Plasmidtransfektion dargestellt.



**Abb. 3.7: Transfektion von NIH3T3- und PC3-Zellen mit Kar2pAcGFP1-N1.**

Je  $1 \times 10^5$  Zellen wurden mit Kar2pAcGFP1-N1 und dem Leervektor pAcGFP1-N1 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und nach SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse immunologisch unter Verwendung eines anti-Kar2-Antikörpers detektiert. **A:** Transfektion von NIH3T3-Zellen mit 200 ng Plasmid-DNA und HiPerFect. **B:** Transfektion von PC3-Zellen mit 2 µg Plasmid-DNA und FuGene HD.

#### 3.2.9.4.4 siRNA-Transfektionen (RNA-Interferenz)

Die Methode der RNA-Interferenz basiert auf einer durch kurze RNAs mit einer Länge von ca. 19-25 Nukleotiden (short interfering RNAs, siRNAs) vermittelten post-transkriptionalen Degradation der zellulären mRNA spezifischer Gene (Hamilton & Baulcombe, 1999). Die Reaktion beruht auf einer Aktivierung der RNase III Aktivität des DICER-Enzyms nach Bindung der siRNA an komplementäre Bereiche innerhalb der mRNA des Zielgens. Dieses Enzym spaltet die dsRNA-Moleküle in ca. 19 Basenpaaren lange Fragmente (siRNAs). Hierdurch kommt es zur Bildung der siRNAs mit RISC-Komplexen. Durch die Bindung des Antisense-Stranges der siRNA mit der entsprechenden mRNA kommt es zur Endonuklease-spezifischen Spaltung der mRNA innerhalb der siRNA-Zielsequenz, was letztlich zu einem vollständigen Abbau der mRNA führt.

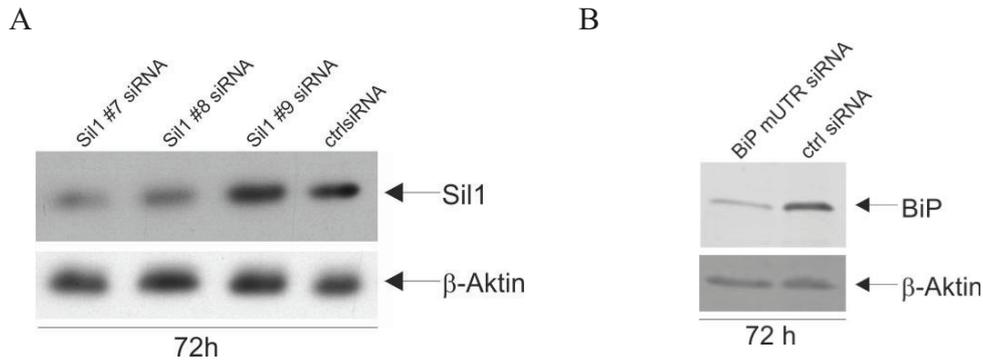
Ogleich es sich bei der RNA-Interferenz um einen hochspezifischen Vorgang, der vollständige Komplementarität der siRNA zur mRNA erfordert (Elbashir *et al.* 2001a & 2001b; Czauderna *et al.* 2003), handelt, wurden von einigen Arbeitsgruppen beschrieben, dass Fehlpaarungen auch zum Abbau führen können. (Boutla *et al.*, 2001; Holen *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2003). Zur Vermeidung solcher „off-target“-Effekte wurden in dieser Arbeit mehrere siRNAs gegen das gleiche Gen verwendet. Durch Datenbankanalyse

zur Überprüfung auf Komplementarität konnten ebenfalls Fehlpaarungen der verwendeten siRNAs zu mRNAs anderer Gene ausgeschlossen werden. Durch eine Kinetik wurden die Erntezeitpunkte auf einen möglichst großen Effekt hin optimiert. Die Transfektion mit siRNAs führt zu einer transienten Suppression von Proteinen, so dass über die Zeit durch Verdünnung der siRNAs ein Anstieg des Restproteingehaltes erkennbar werden kann. Um unspezifische Effekte durch die Transfektion ausschließen zu können, wurde als Vergleich eine siRNA ohne Homologien zu humanen Sequenzen in der gleichen Konzentration mitgeführt (Kontroll (ctrl)-siRNA) und die damit transfizierten Zellen als Bezugspunkt benutzt. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen niedriger Passagezahl umgesetzt, damit sie sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden. Kurz vor Transfektion wurden  $1,2 \times 10^5$  Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten in 1,1 ml Zellkulturmedium ausgesät. Der Transfektionsansatz erfolgte in einem Volumen von 106  $\mu$ l mit 25 nM bis 35 nM der entsprechenden siRNA (*Tabelle 3.2*). Als Transfektionsreagenz wurde HiPerFect (Qiagen) verwendet. Der Ansatz wurde nach Zugabe aller Komponenten auf dem Vortex gemischt und vor Überführen zu den Zellen 10 min. bei RT inkubiert. Die Kultivierung erfolgte über mehrere Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Für die Depletion von BiP und Grp170 wurden die Zellen nach 24 h mit der gleichen Menge an siRNA nachtransfiziert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden die Zellen geerntet, lysiert (3.2.9.2) und nach SDS-PAGE im Western-Blot analysiert.

Transfektionsansatz:

<u>Reagenz</u>	<u>Volumen</u>	
Opti-MEM® (Gibco)	ad 100 $\mu$ l	
siRNA	30 nM	siRNA gegen mRNA von BiP
	25 nM	siRNA gegen mRNA von Sil1
	35 nM	siRNA gegen mRNA von Grp170
HiPerFect	6 $\mu$ l	

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Depletionsstudien von Sil1 und BiP in NIH3T3-Zellen.



**Abb. 3.8: Depletion von Sil1 und BiP in NIH3T3-Zellen und Nachweis der Proteinreduktion durch Western Blot-Analyse.**

**A:** Jeweils  $1,2 \times 10^5$  NIH3T3-Zellen wurden mit 35 nM Sil1 #7 siRNA, Sil1 #8 siRNA und ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit je 35 nM siRNA nachtransfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE und Western-Blot mit einem primären anti-Sil1- und sekundären POD-konjugierten anti-rabbit-Antikörper analysiert. Nach 72 h wurde mit der Sil1 #7 siRNA sowie der Sil1 #8 siRNA eine maximale Depletion von Sil1 mit ca. 25% - 35% Restproteingehalt erzielt. **B:** Proteindepletion nach Transfektion von  $1,2 \times 10^5$  NIH3T3-Zellen mit 35 nM BiP mUTR siRNA sowie ctrl siRNA und Nachtransfektion nach 24 h. Der Restproteingehalt konnte hierbei auf ca. 20% reduziert werden.

### 3.2.9.5 Methoden zur Untersuchung der Zellvitalität und Morphologie

#### 3.2.9.5.1 Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup>-Kit zur Bestimmung der Nekrose (LDH-Assay)

Die Zerstörung der Cytoplasmamembran der Zellen ist ein morphologisches Charakteristikum der Zellnekrose. Sie führt zu einer Freisetzung von cytoplasmatischen Bestandteilen, wie z.B. Enzymen in das Zellkulturmedium, von denen die meisten schnell abgebaut werden. Eine Ausnahme bildet die Lactatdehydrogenase (LDH), die auch außerhalb der Zelle sehr stabil ist. Im Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> wird die Aktivität des Enzyms durch die Umsetzung eines Formazansalzes nachgewiesen. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag des gelösten Salzes, der photometrisch quantifiziert werden kann (Parks *et al.* 1979; Szekeres *et al.* 1981; Murphy *et al.* 1993). Die LDH-Aktivität wurde gemäß Herstellerangaben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion der Zellen mit siRNA gemessen. Hierzu wurden die Zellen ca. 18 h nach siRNA-Transfektion zu je  $1 \times 10^4$  Zellen in Dreifach-Bestimmung in eine 96 Well-Mikrotiterplatte in 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Für jeden Messpunkt wurden eine Positiv-Kontrolle (durch Zugabe von Lysepuffer lysierte Zellen), unbehandelte Zellen, Kontroll-siRNA transfizierte Zellen sowie eine

Mediumkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle wurde mit 10 µl Lysepuffer versetzt und 10 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Überstandes der Zellsuspension in eine neue 96 Well-Mikrotiterplatte überführt und mit 100 µl Reaktionsmix, bestehend aus Catalyst und Dye solution, versetzt und 5 min. - 10 min. inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung wurde die Reaktion beendet und die Extinktion des Formazansalzes bei 490 nm gemessen (Referenz > 650 nm). Dabei ist die Intensität der Färbung proportional zu der Zahl der lysierten Zellen (Szekeres *et al.* 1981).

Zur Bestimmung der durchschnittlichen LDH-Aktivität wurde die Mediumkontrolle von den Proben subtrahiert und die Absorption der depletierten Zellen in Verhältnis zu der der Kontrollzellen gesetzt. Zur Bestimmung der Nekroserate können die siRNA-transfizierten Zellen in Verhältnis zu den 100% nekrotischen Zellen (Positivkontrolle) gesetzt werden.

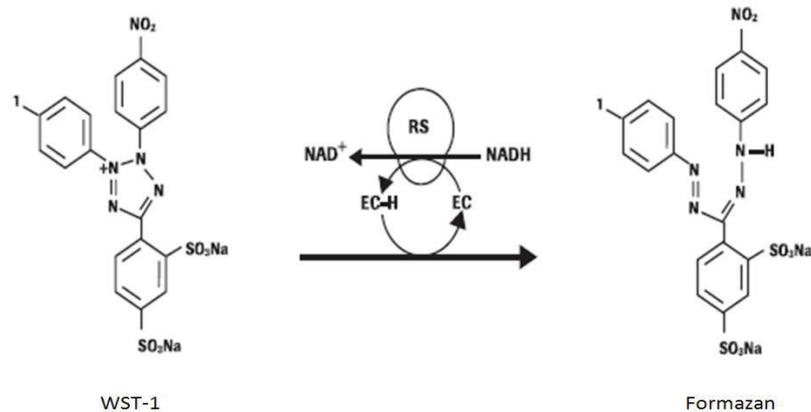
**Reaktionsmix (für 10 Wells)**

Catalyst	25	µl
Dye solution	1,125	ml

### 3.2.9.5.2 WST-1 Assay

WST-1 ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat), welches die Messung der Zellvitalität anhand der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen ermöglicht. Vitale Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 in das dunkelrote Formazan. Eine Expansion vitaler Zellen korreliert hierbei mit einem Anstieg der Aktivität der zellulären Dehydrogenasen, was wiederum einen Anstieg der Umsetzung zu Formazan bedingt. Dieser Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer photometrisch gemessen und ausgewertet werden (Francoeur *et al.*, 1996). Die Menge des gebildeten Formazans und damit das Ausmaß der photometrisch bestimmten Extinktion sind proportional zur Anzahl an vitalen Zellen. Zur WST-1 Messung wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.9.4.4 beschrieben, mit siRNA in 12 Well-Mikrotiterplatten transfiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10%

WST-1 Reagenz (in Medium) bei 37 °C im Brutschrank über 15 min. und 30 min. inkubiert. Parallel wurde eine Mediumkontrolle mitgeführt. Die anschließende photometrische Messung erfolgte im Spektralphotometer (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm in einer Dreifach-Bestimmung. Zur Errechnung der Vitalität wurde die Mediumkontrolle von den Proben subtrahiert und die Absorptionen der depletierten Zellen in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt.



**Abb. 3.9: Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zu Formazan**

(RS = mitochondriales Succinat-Tetrazolium Reductase System, EC = Elektronenkopplungsreagenz)

### 3.2.9.5.3 Zellwachstumsanalyse (xCELLigence)

Mit Hilfe des xCELLigence Systems können zellulären Vorgängen ohne dass eine Markierung erforderlich ist in Echtzeit gemessen werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Messung der elektrischen Impedanz über Mikro-Elektroden, welche in den Boden von sogenannten E-Plates, speziellen Zellkultur-Platten, integriert sind. Durch diese Messungen können quantitative Aussagen über den biologischen Zustand der Zellen hinsichtlich Zellzahl, Vitalität und Morphologie, getroffen werden. Das Messprinzip beruht auf einer Erhöhung der gemessenen Impedanz durch das Anhaften von Zellen. Diese steigt durch die Erhöhung der Zellzahl, aber auch durch morphologische Veränderungen der Zellen, welche womöglich ein stärkeres Anhaften der Zelle auf der Elektrode bedingen. In *Abb. 3.10* ist das Messprinzip dargestellt.

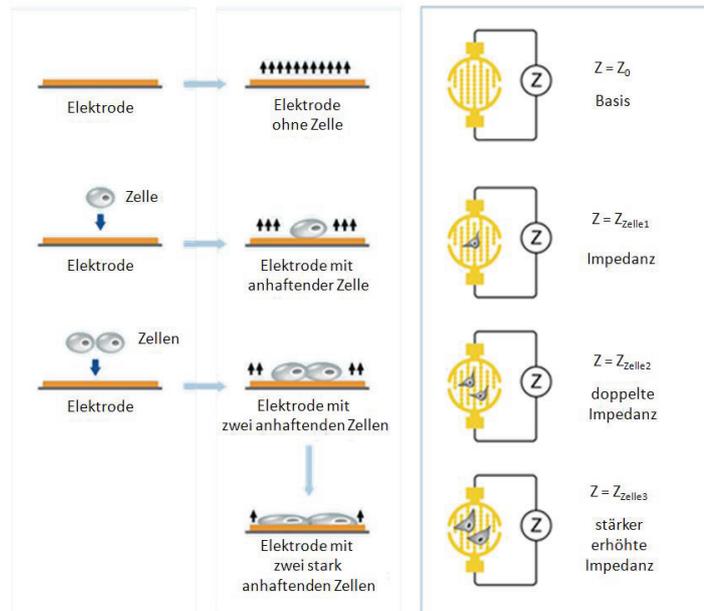


Abb. 3.10: xCELLigence Messaufbau und -Prinzip.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Zellproliferation anhand des xCELLigence nach Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNAs gegen Sil1 sowie nach Transfektion von PC3-Zellen mit siRNAs gegen Grp170 gegenüber einer ctrl siRNA Transfektion untersucht. Hierzu wurden die Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten transfiziert (im Fall von Grp170 siRNA erfolgte eine Nachtransfektion nach 24 h), nach 48 Stunden geerntet, gezählt und von jedem Ansatz zwei verschiedene Zellzahlen (HeLa-Zellen: 5.000 & 10.000; PC3-Zellen 5.000 & 7.500) in die 96 Well E-Plate ausgesät. Alle Messungen erfolgten in Dreifach-Bestimmung.

#### 3.2.9.5.4 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorter) wird zur Analyse von Einzelzellen durch Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften eingesetzt. Das Prinzip der Zellanalyse besteht darin, dass in einer Lösung befindliche Zellen einzeln über eine Kapillare einen Laserstrahl in einem Sensormodul, bestehend aus mehreren Detektoren, passieren. Hierbei bestimmen physikalische Eigenschaften wie Größe und Granularität die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung („forward scatter“) gibt Auskunft über die

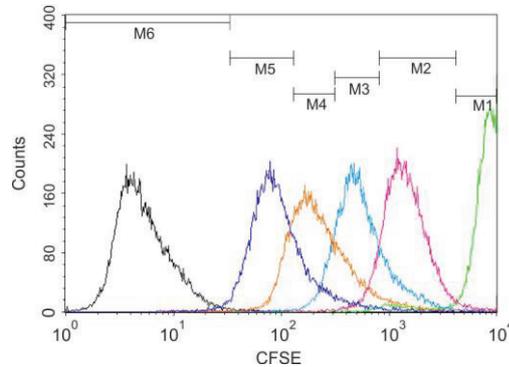
Größe der Zelle, während die Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht (Seitwärtsstreuung oder „sideward scatter“) die Granularität der Zelle misst. Zellen können auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, welche vom Laser angeregt werden. Die Messung gibt hierbei Auskunft über die relative Fluoreszenzintensität. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Untersuchungen der Apoptose und des Zellwachstums BiP, Sill bzw. Grp170 depletierter Zellen eingesetzt.

#### 3.2.9.5.4.1 CFSE-Lebendzell-Färbung

Die CFSE-Färbung ist eine Methode zum Nachweis des Proliferationsverhaltens von Zellen. Ausgangssubstrat für die Färbung ist CFDASE (Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester), ein nicht-fluoreszierender Lebendzellfarbstoff, welcher erst nach Spaltung durch cytoplasmatische Esterasen zu CFSE und Laseranregung zu fluoreszieren beginnt. CFSE bindet über seine Succinimidyl-Gruppen kovalent an sekundäre Aminogruppen intrazellulärer Proteine (Parish, 1999) und lässt dabei die zellulären Funktionen unbeeinträchtigt (Weston, 1990). Lyons und Parish zeigten an murinen mononukleären Zellen, dass sich bei jeder Zellteilung der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, so dass sich mit zunehmender Proliferation die Fluoreszenzintensität verringert, wobei eine Halbierung der Farbstoffmenge einer Zellteilung entspricht.

Zur Proliferationsmessung mittels CFSE wurden  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen durch 3 minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm pelletiert und in 1 ml 2% FCS/PBS resuspendiert. Die Färbung erfolgte mit 5  $\mu$ M CSFE über einen Zeitraum von 5 min. im Dunkeln bei RT. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 10 ml 2% FCS/PBS gewaschen, in 10 ml des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen und zu je  $1,2 \times 10^5$  Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit den entsprechenden siRNAs transfiziert (3.2.9.4.4) und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Messung kultiviert.  $3 \times 10^5$  gefärbte (Zeitpunkt 0 h der Messung) sowie ungefärbte Zellen wurden direkt mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert. Zur Messung nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h bzw. 144 h wurden die Zellen geerntet, mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und die Fluoreszenzintensität von CFSE mittels FACScan™ (Beckton Dickinson) und Software FACS Diva Version 6.1.3 detektiert (Virologie, UoS).

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Messung der CFSE-Färbung von HeLa-Zellen im 24 h Intervall über einen Zeitraum von 96 h.



**Abb. 3.11: CFSE-Färbung von HeLa-Zellen.**

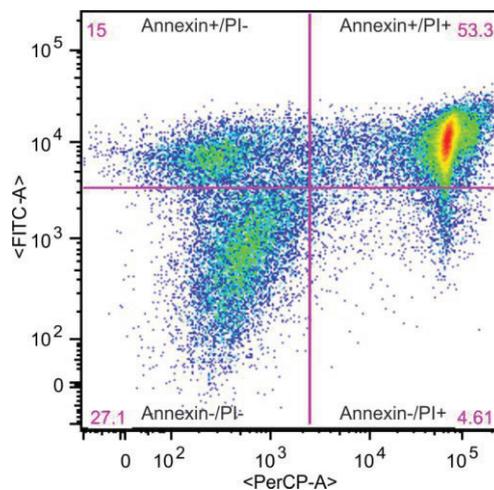
0 h (grün), 24 h (pink), 48 h (hellblau), 72 h (orange) und 96 h (dunkelblau) nach Färbung mit 5  $\mu\text{M}$  CFSE wurden die Zellen geerntet, fixiert und im FACS analysiert. Schwarz sind die ungefärbten Zellen dargestellt.

#### 3.2.9.5.4.2 Apoptosedetektion mittels Annexin V-Markierung

Ein Charakteristikum früh-apoptotischer Zellen ist die Umlagerung von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Plasmamembranschicht. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung von FITC-konjugiertem Annexin V an Phosphatidylserin ermöglicht somit in Kombination mit einer Färbung mit Propidiumiodid den Nachweis der Induktion der Apoptose. Propidiumiodid kann nur in Zellen mit poröser Membran eindringen, ein Merkmal nekrotischer Zellen.

Der Nachweis der Apoptose erfolgte mit Hilfe von FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid (PI) von siRNA transfizierten Zellen (BD Pharmingen™ FITC-Annexin V Apoptosis Detektion Kit). Hierzu wurden die Zellen mit den verschiedenen siRNAs transfiziert (3.2.9.4.4) und bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Färbung erfolgte nach 48 h, 72 h und 96 h. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1x Bindungspuffer zu einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml aufgenommen. 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung ( $1 \times 10^5$  Zellen) wurden mit 5  $\mu\text{l}$  FITC-konjugiertem Annexin V und 5  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid versetzt, kurz auf dem Vortex gemischt und über 15 min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 400  $\mu\text{l}$  1x Bindungspuffer hinzugefügt und die Messung im FACSscan innerhalb einer Stunde durchgeführt. Hierbei wurde die Fluoreszenz von FITC gegen PerCP-A (Kanal in dem PI gemessen wird) gemessen und in einem Punkt-Diagramm

dargestellt, wobei jeder abgebildete Punkt einer Zelle der Probe entspricht (Abb. 3.12). Zellen mit Annexin V-/PI- stellen die lebende Fraktion innerhalb der Probe dar. Die Zellen mit Annexin V+/PI- sind früh-apoptotisch. Auf Grund der Externalisierung von Phosphatidylserin kann Annexin binden, während durch die noch intakte Plasmamembran eine Färbung mit PI verhindert wird. Nekrotische Zellen, die zusätzlich zur Annexin V-Positivität aufgrund einer Zerstörung der Plasmamembran mit PI anfärbbar sind, sind für beide Fluoreszenzen, FITC-konjugiertes Annexin V und PI, positiv. Zellen, welche Annexin V-/PI+ sind, werden zu den nekrotischen Zellen gezählt.



**Abb. 3.12: Nachweis von Apoptose in HeLa-Zellen mittels Annexin V Markierung**

1 x 10<sup>6</sup> HeLa-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M des zelltoxischen Camptothecins (Apoptose-Induktor) transfiziert und nach 3 h mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. Die Färbung wurde mittels FACS detektiert. Auf der x-Achse ist der Kanal für Propidiumiodid, auf der y-Achse der für das FITC-konjugierte Annexin V dargestellt.

### 3.2.9.5.5 ER-Tracker™- Färbung

ER-Tracker™ Blue-White DPX ist ein Lebendzell-Farbstoff, welcher eine hohe Selektivität für das Endoplasmatische Retikulum aufweist. Zur Untersuchung der Auswirkung eines Proteinverlustes von Sll1, BiP sowie Grp170 auf die Morphologie des ER, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA Transfektion (3.2.9.4.4) gefärbt. Hierfür wurde das Medium von der Kultur abgenommen und die Zellen mit HBSS gewaschen. Die auf 37°C vorgewärmte Färbelösung (1:1000) wurde hinzugegeben und es erfolgte eine Inkubation über 30 min. bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde die Lösung durch PBS ersetzt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

**Färbelösung:** ER-Tracker Stocklösung (50 mM) in 1:1000 Verdünnung mit  
 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

**Stock #1**

NaCl                    8 g  
 KCl                    0,4 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>            ad 100 ml

**Stock #2**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            0,358 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            0,6 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>            ad 100 ml

**Stock #3**

CaCl<sub>2</sub>                0,72 G  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>            ad 50 ml

**Stock #4**

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O        1,23 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>            ad 50 ml

**Stock #5**

NaHCO<sub>3</sub>             0,35 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>            ad 10 ml

**Hank's Premix**

Solution #1            10 ml  
 Solution #2            1 ml  
 Solution #3            1 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>            86,0 ml  
 Solution #3            1 ml

**HBSS**

Hank's Premix        9,9 ml  
 Stock #5                0,1 ml

### 3.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein sicheres und schnelles *in vitro* Verfahren des Nachweises sowie der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte dar (Mullis *et al.* 1986; Saiki *et al.* 1988). Die PCR-Reaktion besteht aus einer Anzahl von 25 bis max. 30 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder dieser Zyklen besteht aus den nachstehenden drei Schritten: Die zu Beginn des Prozesses vorliegende doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 94°C in ihre Einzelstränge überführt. Dies ermöglicht im nachfolgenden, als „Annealing“ bezeichneten Prozess, die Bindung der Primer an die jeweils komplementären Sequenzen. Die Temperatur wird während dieser Phase gesenkt und liegt im Normalfall 2-3 °C unter dem Schmelzpunkt der jeweils verwendeten Primer, typischerweise zwischen 50°C und 65 °C. Die Schmelztemperatur wird wie folgt errechnet (Suggs *et al.*, 1981):

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

Im Anschluss daran wird mit Hilfe der im Reaktionsansatz vorhandenen hitzestabilen Pwo-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* sowie den freien Didesoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) bei einer Temperatur von 72°C die Neusynthese der DNA-Fragmente gestartet. Die Polymerase zeichnet sich durch ihre 3'→5'-Exonucleaseaktivität („Proof-Reading“) und der daraus bedingten niedrigen Fehlerrate von ca.  $3,2 \times 10^{-6}$  im Vergleich zu  $2,6 \times 10^{-5}$  zur Taq-Polymerase aus (Barnes, 1994; Steffen, 1999). Der auf diese Weise gebildete Doppelstrang wird im Verlauf der PCR durch Erhöhung der Temperatur wieder in seine Einzelstränge aufgetrennt, wodurch die Primerbindungsstellen erneut frei werden und der Vorgang nach Absinken der Temperatur von neuem starten kann. Durch eine Vielzahl solcher Reaktionszyklen kann somit eine exponentielle Amplifizierung eines DNA-Abschnittes erreicht werden. Die Identifizierung der entstandenen Amplifikate erfolgte im Anschluss daran durch eine Größenbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.15).

Eine Übersicht über die in der PCR eingesetzten Primer gibt *Tabelle 3.3*. Die PCR-Ansätze zur Konstruktion der verschiedenen Plasmide (aufgeführt in den *Tabellen 3.4 & 3.5*) wurden wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Mix:

10 x Pwo-Puffer + 20 mM MgSO <sub>4</sub>	10 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	8 µl
5' → 3' - Primer (50 µM)	1 µl
3' → 5' - Primer (50 µM)	1 µl
dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	2 µl
DNA-Matrize (1 mg/ml)	1 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (5 U/ml)	0,6 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer bzw. Primus advanced 96, peqlab) unter nachfolgenden Bedingungen:

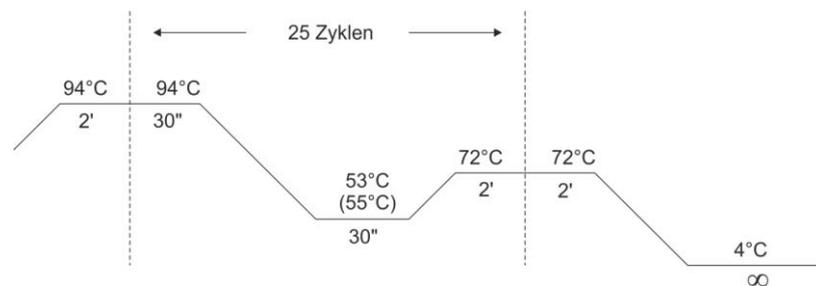


Abb. 3.13: Verlauf der PCR zur Amplifikation eines ca. 2 kb großen DNA-Fragmentes.

### 3.2.11 Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Der Nachweis der Depletion von Sill auf RNA-Ebene wurde mit Hilfe der RT-PCR erbracht. Das Prinzip dieser Methode beruht auf zwei nachgeschalteten Reaktionen. Im ersten Schritt wird die RNA mit Hilfe der *Reversen Transkriptase* in cDNA umgeschrieben, welche in der sich anschließenden Reaktion vervielfältigt wird.

Für die RT-PCR wurde aus den depletierten Zellen sowie den Kontrollzellen RNA gemäß 3.2.25 isoliert und die Reaktion mit spezifischen Primer (RZ 234 & 235, Tabelle 3.3) nach dem nachstehenden Schema angesetzt. Um eine vorzeitige Aktivierung der Komponenten zu vermeiden wurden alle Reaktionskomponenten auf Eis gehalten. Zur Quantifizierung und Normierung der Werte wurde zusätzlich der Gehalt an  $\beta$ -Aktin RNA (RZ 210 & 211, Tabelle 3.3) bestimmt.

PCR-Mix:

10x Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
RT-Polymerase	0,5 µl
RNA (400 ng)	1 µl
Primer „forward“	0,5 µl
Primer „reverse“	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	17 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer bzw. Primus advanced 96, peqlab) unter nachfolgenden Bedingungen:

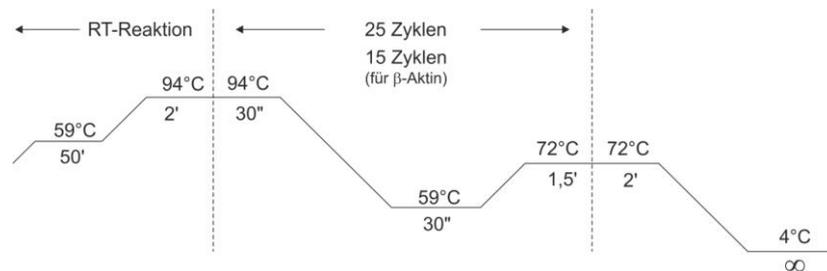


Abb. 3.14: Verlauf der RT-PCR zum Nachweis der mRNA von Sill1.

Die Detektion erfolgte mittels Bioanalyser 2100 expert DNA 7500 von Agiland.

### 3.2.12 Quantitative „real-time“ PCR

Zur Quantifizierung spezifischer mRNAs wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen mittels Nucleospin RNA II Kit (Machery und Nagel, Düren) isoliert und mit Superscript II reverser Transkriptase (Invitrogen) und oligo-dT-Primern (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) in DNA umgeschrieben. Die quantitative „real-time“ PCR wurde im Anschluss daran mit TaqMan<sup>®</sup> Gen Expressions Arrays (Applied Biosystems, Carlsbad) mit einem spezifischen Primer für Sill1 (Hs00223835\_m1) im HT7900 System (Applied Biosystems) in Zusammenarbeit mit Birgit Klemmer (Urologie, UdS) durchgeführt. Die Bestimmung der DNA-Menge erfolgt hierbei mit Hilfe von TaqMan-Proben durch den Fluoreszenz-(Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einem Energietransfer durch Anregung des am 5'-Ende der Oligonukleotidsonde gebundenen Fluoreszenz-

farbstoffes (Reporter) auf den am 3'-Ende befindlichen Quencher, dessen Absorptionsspektrum dem Emissionsspektrum des Reporterfarbstoffes entspricht, wodurch keine Fluoreszenz detektiert werden kann. Die 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase spaltet bei erfolgreicher Replikation die Sonde, so dass der Reporter vom Quencher räumlich getrennt wird. Dies unterbindet den Förster-Resonanz-Energie-Transfer und somit kann die Emission des Reporterfarbstoffes proportional zur Degradation der Sonden und entsprechend der Zunahme des PCR-Produkts detektiert werden. Während der PCR steigt das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes an. Der gemessene Ct-Wert („cycle of threshold“) entspricht dem Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal von dem Hintergrundfluoreszenz abhebt. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten. Die Quantitative-PCR erfolgte in einer Well-Mikrotiterplatte in Triplikaten mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl nach folgendem Pipettierschema:

cDNA Template (50 ng/µl)	1	µl
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (2x)	10	µl
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assay	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20	µl

PCR-Programm:

95°C	10 min	} 40x
95°C	15 s	
60°C	1 min	

Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung wurde nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Pfaffl, 2001) durchgeführt. Dabei wurde für jede zu untersuchte Probe durch Subtraktion des gemittelten Ct-Wertes des Referenzgens vom gemittelten Ct-Wert des zu untersuchenden Gens (entspricht  $\Delta Ct$ ) normiert. Vom  $\Delta Ct$ -Wert der Probe wurde anschließend der  $\Delta Ct$ -Wert der Kontrolle abgezogen ( $\Delta\Delta Ct$ ). Die Ratio zwischen Probe und Kontrolle ergibt sich somit aus der arithmetischen Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.2.13 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen stellen Enzyme dar, welche innerhalb doppelsträngiger DNA an bestimmten, für das Enzym spezifischen Erkennungsstellen, den Doppelstrang spalten. Für den Restriktionsverdau zum Nachweis der Insertion des PCR-Produktes wurden die entsprechenden Enzyme im jeweiligen Puffer nach Herstellerangaben und in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen in einen Reaktionsansatz mit der DNA gegeben. Die DNA aus der PCR wurde hierfür zuerst mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben gereinigt. Benötigen die beiden Restriktionsendonukleasen den gleichen Puffer zur Entfaltung ihrer Enzymaktivität, wurde in einer Reaktion ein Doppelverdau angesetzt, war dies nicht der Fall, wurde zwischen den einzelnen Spaltungen ein Reinigungsschritt (3.2.22) durchgeführt.

Um die gerichtete Integration von PCR-Produkten in den Vektor zu überprüfen, wurde eine analytische Spaltung durchgeführt. Hierzu wurden in einem Volumen von 10  $\mu$ l ungefähr 0,5  $\mu$ g DNA mit 1-2 U Restriktionsenzym über Nacht oder für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Wurden zur nachfolgenden Ligation präparative Spaltungen durchgeführt, wurden ca. 4  $\mu$ g DNA und 10 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

#### Zusammensetzung der Reaktionsansätze:

<u>Analytischer Verdau</u>			<u>Präparativer Verdau</u>		
10x Puffer	1	$\mu$ l	10x Puffer	4	$\mu$ l
Enzym 1	1-2	U	Enzym 1	10	U
Enzym 2	1-2	U	Enzym 2	10	U
BSA (1mg/ml)	4	$\mu$ l	BSA (1mg/ml)	4	$\mu$ l
DNA	0,5 -2	$\mu$ l	DNA(1mg/ml)	1	$\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 10	$\mu$ l	H <sub>2</sub> O	ad 40	$\mu$ l

### 3.2.14 Behandlung von Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase

Zur Vermeidung einer Religation der geschnittenen Plasmid-DNA, wurden durch Zugabe von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Hierzu wurden 0,5  $\mu$ l CIAP (1 U/ $\mu$ l) dem Reaktionsansatz aus gespaltener Plasmid-DNA zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.15 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Moleküle mit einer Nettoladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Hierbei macht man sich die Kenntnis zu nutze, dass die Phosphatgruppen bei den während der Elektrophorese vorherrschenden Bedingungen als Ionen vorliegen und aufgrund ihrer Ladung zum Pluspol wandern. Dabei ist das Wanderungsverhalten abhängig von der Nettoladung, der Größe und räumlichen Anordnung der zu trennenden Moleküle ebenso wie von der Stärke des angelegten Stromfeldes und der Porengröße des verwendeten Gels. Letztere ist abhängig von der Menge eingesetzter Agarose. Innerhalb dieser Arbeit wurden 1%-ige Agarosegele zur Restriktionsanalyse neuklonierter Plasmide als auch zur Isolation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurden 1,2 g Agarose mit 120 ml TAE-Puffer versetzt und in einem Mikrowellengerät bis zum vollständigen Auflösen der Agarose erhitzt. Nach leichtem Abkühlen wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zur Färbung der DNA-Fragmente zugegeben und die flüssige Agarose in eine horizontale Flachbettkammer mit entsprechendem Kamm gegossen. Das Gel wurde nach Aushärten in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, mit TAE-Puffer überschichtet und die Proben, welche zuvor mit einem Anteil von 20% des Volumens mit 6x-DNA-Probenpuffer versetzt wurden, aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde zusätzlich ein 1 kB-DNA-Marker mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über 1-2 h bei 200 mA. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV-Licht mittels Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

<u>TAE-Puffer</u>		<u>DNA-Probenpuffer (6x)</u>	
Tris	40 mM	Bromphenolblau	0,25 %
CH <sub>3</sub> COOH	20 mM	Xylencyanol	0,25 %
EDTA	1 mM	Saccharose	40 %

### 3.2.16 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Fällung

Mit Hilfe des „Perfectprep<sup>®</sup> Gel Cleanup“ Kits der Firma Eppendorf erfolgte die Extraktion der DNA aus den Agarosegelen. Die zunächst durch die Gelelektrophorese aufgetrennte und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemachte DNA

wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in den Filtereinsatz eines 2 ml SpinX-Reaktionsgefäßes gegeben und in der Tischzentrifuge über mind. 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Durch dieses Vorgehen wird die Agarose von der DNA enthaltenden Flüssigkeit getrennt. Das Filtrat wurde anschließend mit 3 M NaAc pH 5,2 (1/10 des Volumens) und 96 %-Ethanol (2,5-fache des Volumens) versetzt und für mindestens 30 min. bei -80°C zur Fällung der DNA inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C über 15 min. mit 14.000 rpm und ein Waschschriff mit 500 µl 70 %-Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C über 5 min. mit 14.000 rpm wurde die DNA unter Vakuum in der Speed-Vac Anlage getrocknet und in 50 µl TE-Puffer pH 8,0 gelöst. Für die weitere Verwendung wurde das Eluat bei -20°C aufbewahrt.

**TE-Puffer**

Tris/HCl pH 8,0 10 mM  
 EDTA 1 mM

**3.2.17 Ligation mit T4-Ligase**

Die T4-DNA-Ligase vermittelt über eine kovalente Esterbindung zwischen 5'-Phosphat-Gruppen und freien 3'-OH-Gruppen eines DNA-Doppelstranges die Verknüpfung von Vektor und der zu integrierenden DNA. Die freien 5'-Phosphat-Gruppen und 3'-OH-Gruppen entstehen hierbei durch den Verdau der DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Die Ligationsansätze wurden gemäß Herstellerangaben für ca. 3 h bei RT inkubiert. Hierbei wurde jeweils ein Ansatz ohne Zugabe des „Insert“ mitgeführt, um die Anzahl der Religanden abschätzen zu können.

**Zusammensetzung der Reaktionsansätze:**

**Ligationsansatz**

10x Ligationspuffer 1 µl  
 Vektor (0,2 µg/µl) 1 µl  
 „Insert“ (0,2 µg/µl) 1,5-2 µl  
 T4-DNA-Ligase (1 U/µl) 0,4 µl  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 10 µl

**Ligationskontrolle**

10x Ligationspuffer 1 µl  
 Vektor (0,2 µg/µl) 1 µl  
 „Insert“ (0,2 µg/µl) -  
 T4-DNA-Ligase (1 U/µl) 0,4 µl  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad 10 µl

**Ligationspuffer (10x)**

Tris/HCl pH 7,5	550	mM
MgCl <sub>2</sub>	50	mM
DTT	100	mM
ATP	10	mM
BSA	1	Mg/ml

**3.2.18 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Für die Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des *E. coli* Stammes JM101 von einer LB-Platte beimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 - 0,7 bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erzielen, erfolgten die folgenden Schritte ausschließlich unter Verwendung gekühlter Gefäße (-20°C), Puffer und Rotoren (4°C). Nach Erreichen der optischen Dichte wurde die Zellsuspension in einen Zentrifugenbecher überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden über Zentrifugation in einer J2-MC-Zentrifuge (JA10-Rotor) über 10 min. bei 4°C und 6.000 rpm sedimentiert und in 80 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation über 5 min auf Eis wurden die Bakterien erneut über 10 min. bei 4°C und 6.000 rpm zentrifugiert und das Sediment in 8 ml Puffer P2 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

**Puffer 1**

KaAc	30	mM
RbCl	100	mM
CaCl <sub>2</sub>	10	mM
MnCl <sub>2</sub>	50	mM
Glycerin (v/v)	15	%
in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		
pH -Wert mit CH <sub>3</sub> COOH auf 5,8 eingestellt, sterilfiltriert		

**Puffer 2**

MOPS (freie Säure)	10	mM
RbCl	10	mM
CaCl <sub>2</sub>	75	mM
Glycerin	15	%
in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		
pH-Wert mit KOH auf 6,5 eingestellt, sterilfiltriert		

### 3.2.19 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Die kompetenten *E.coli* Zellen (100 µl Zellsuspension pro Ansatz) wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl des Ligationsansatzes versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde eine Hitzeschockbehandlung im Wasserbad bei 42 °C für 90 s durchgeführt. Die Zellen wurden dann 1 min. auf Eis und nach Zugabe von 0,5 ml LB-Medium für weitere 60 min. unter Rollen inkubiert. Wurden die Zellen auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert, wurden sie kurz zentrifugiert und das Sediment in 50 µl LB-Medium resuspendiert und ausplattiert. Für eine Flüssigkultur wurde der Ansatz direkt in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 3.2.20 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte in LB-Medium bei 37°C und 250 rpm unter Hinzugabe von Antibiotika in einer Konzentration von 1:1000 zu dem Gesamtvolumen.

<u>LB-Medium</u>		<u>LB-Agarplatten</u>	
LB-Medium	25 g	LB-Agar	35 g
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1 l	ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1 l

Die LB-Medien wurden autoklaviert.

### 3.2.21 Isolierung von Plasmiden mittels Plasmid-DNA-Minipräparation

Die nach Birnboim und Doly (1979) modifizierte Methode zur Extraktion von Plasmiden über Phenol-Chloroform nach einer alkalischen Lyse wurde genutzt, um einzelne Klone nach Klonierung mittels Restriktionsverdau auf die gerichtete Integration des Inserts in den Vektor zu untersuchen. Hierfür wurden 2 ml TB-Medium mit Antibiotikum in einer Endkonzentration von 1:1000 mit einer gewachsenen *E. coli*-Kolonie von einer LB-Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C rollend inkubiert. Die Kultur wurde zur Zellernte in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 15 s bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl neu angesetzter 1 % SDS/0,2 M NaOH lysiert. Zur Neutralisation der Zellen wurde 150 µl 3M NaAc,

pH 5,2 zugefügt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalcohol-Lösung (Roth) wurde der Ansatz für 30 s auf dem Vortex-Schüttler gemischt, wobei die DNA extrahiert wurde. Durch Zentrifugation für 2 min bei 14.000 rpm erfolgte eine Phasentrennung, wobei die Plasmid-DNA in der oberen, wässrigen, Phase verblieb. Reststücke der Zellmembran sowie chromosomale DNA und RNA, welche auf Grund des SDS ausfallen, verbleiben in der unteren, organischen Phase während sich in der Mitte eine proteinhaltige Phase anreicherte. 400 µl der oberen Phase wurden dann zur Fällung mit 1 ml Ethanol versetzt, 1 min. bei RT inkubiert und anschließend 2 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 750 µl 70 %-Ethanol gewaschen und erneut über 2 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde via Speed-Vac getrocknet und in 50 µl TE/RNaseA-Lösung (Endkonzentration: 50 µg/ml) aufgenommen und für 3 min. bei 55 °C zum Lösen der DNA und für weitere 30 min. bei 37 °C zum Verdau der RNA inkubiert. Für einen Kontrollverdau zur Überprüfung der korrekten Insertion wurde 1 µl der eluierten DNA für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. Enthielt das Plasmid das entsprechende „Insert“ erfolgte eine Reinigung mittels „SureClean-Kits“.

**GTE-Lösung**

Glucose	500	mM
Tris/HCl pH 8,0	25	mM
EDTA	10	mM
autoklaviert		

**Kaliumphosphat-Puffer**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23,1	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	125,4	g
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1	l

**RNaseA (10 mg/ml)**

RNaseA	10	mg
1 M Tris/HCl pH 7,5	10	µl
4 M NaCl	3,75	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	986,25	µl

15 min. 100°C Wasserbad (Inaktivierung der DNase)

**TE-Puffer**

Tris/HCl pH 8,0	10	mM
EDTA	1	mM
autoklaviert		

**TB-Medium**

TB-Medium	50,8	g
Glycerin	4	ml
ad H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1	l
autoklaviert		

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

### 3.2.22 DNA-Reinigung mit dem „SureClean-Kit“

Der „SureClean-Kit“ ermöglicht die schnelle Reinigung der DNA (> 100 bp) von Proteinen, Mono- und Oligonukleotiden. Gleiche Volumen an SureClean-Lösung wurden zur DNA-Lösung zugefügt und nach Mischen über 10 min. bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation über 10 min. bei 14.000 rpm wurde die gefällte DNA sedimentiert. Nach einem Waschschrift des DNA-Pellets mit 70%-Ethanol wurde erneut über 10 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

### 3.2.23 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Midipräparation („JETSTAR-Kit“)

Nach über Nacht Kultivierung von Plasmid-transfizierten *E. coli*-Zellen (JM101) in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C und 250 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation über 10 min. bei 5.000 rpm und 4 °C sedimentiert (JA 10-Rotor) und in 4 ml Lösung E1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung E2 und 5 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zelllyse. Nach Neutralisation durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 wurde der Ansatz über 10 min. bei 20 °C und 14.000 rpm im JA 20-Rotor zentrifugiert. Währenddessen erfolgte die Äquilibration der Anionenaustauschsäule mit 10 ml Lösung E4. Der nach Zentrifugation entstandene Überstand wurde abgenommen, mit einer 0,2 µm-Filtereinheit sterilfiltriert und auf die äquilibrierte Säule überführt. Nach zweimaliger Waschung der Säule mit 10 ml Lösung E6 wurde die DNA mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Durch Zugabe von 5 ml eiskaltem Isopropanol wurde anschließend die DNA gefällt und durch Zentrifugation über 30 min. bei 4 °C und 20.000 rpm sedimentiert. Das Präzipitat wurde in 2 ml 70%-Ethanol aufgenommen und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation über 10 min. bei 2 °C und 14.000 rpm in der Kühlzentrifuge via Speed-Vac getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte eine photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes.

**Lösung E1**

Tris/HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/ml

**Lösung E2**

NaOH	200 mM
SDS	1 %

**Lösung E3**

KAc/CH <sub>3</sub> COOH pH 5,5	3,1 M
---------------------------------	-------

**Lösung E4**

NaCl	600 mM
NaAc/CH <sub>3</sub> COOH pH 5,0	100 mM
Triton X-100	0,1 %
	5

**Lösung E5**

NaCl	800 mM
NaAc/CH <sub>3</sub> COOH pH 5,0	100 mM

**Lösung E6**

NaCl	1,5 M
NaAc/CH <sub>3</sub> COOH pH 5,0	100 mM

**3.2.24 Bestimmung von Reinheit und Konzentration isolierter DNA**

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades sowie der Konzentration isolierter DNA wurde die Absorption bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (260 nm und 280 nm) im Spektralphotometer („NanoDrop“) gegen Wasser als Referenz gemessen. Eine Extinktion von 1,0 entspricht hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  gibt Aufschluss über das Verhältnis zwischen DNA und Proteinen und somit über die Reinheit der isolierten DNA. Reine DNA-Lösungen weisen einen Wert von 1,8 auf. Werte oberhalb von 1,8 lassen auf Verunreinigungen durch RNA schließen, während kleinere Werte Unreinheiten mit Proteinen andeuten.

**3.2.25 RNA-Präparation aus Säugerzellen**

Die Präparation der RNA aus Säugerzellen erfolgte nach dem „short“ Protokoll des QIAamp RNA Blood Mini Kits. Hierzu wurden  $3 \times 10^6$  Zellen durch 3 min. zentrifugieren bei 3.000 rpm pelletiert und anschließend das Pellet in 350 µl RLT-Puffer (vor Gebrauch Zugabe von 10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml RLT-Puffer) aufgenommen. Das Lysat wurde in ein QIAshredder überführt und 2 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde mit 350 µl 70% EtOH versetzt und die Probe vorsichtig in eine QIAamp-Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation über

15 s bei 10.000 rpm. Nach Zugabe von DNase-Mix (10 µl DNaseI Stocklösung zu 70 µl RDD-Puffer) auf die Säule und Inkubation über 15 min. bei RT wurde die DNA verdaut. Anschließend wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Diese Zentrifugation wurde durch Zugabe von 500 µl RPE-Puffer einmal über 15 min. und ein weiteres Mal über 3 min. wiederholt. Die Säule mit gebundener RNA wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 30 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O durch Zentrifugation über 1 min. bei 10.000 rpm eluiert. Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes und des Reinheitsgrades wurde das Eluat im NanoDrop vermessen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Das HSP70 Chaperon BiP

Das ER-luminale Hsp70 Chaperon BiP bildet zusammen mit einer Vielzahl weiterer molekularer ER-Chaperone und Nukleotidaustauschfaktoren wie GRP94, PDI, ERp72, GRP170/ORP150, UGGT, CaBP1, Cyclophilin B, SDF2-L1 und Sil1 ein großes Protein-Netzwerk innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (Meunier *et al.*, 2002, Chung *et al.*, 2002). Sowohl im Säuger als auch in der Hefe ist BiP an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Das Protein spielt eine wesentliche Rolle bei mehreren Schritten während der Translokation von Vorstufenproteinen bzw. der Insertion von Membranproteinen durch sowie in die Membran des ER. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass BiP auf mindestens drei Ebenen am Transport beteiligt ist: An der Öffnung des Sec61-Translocons (Klappa *et al.*, 1991; Dierks *et al.*, 1996), am Transport von Polypeptidketten durch den Kanal (Tyedmers *et al.*, 2003) sowie am Schließen der Pore (Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003; Alder *et al.*, 2005). Für die Beteiligung am Schließen des Sec61 Kanals konnte die Arbeitsgruppe von Arthur Johnson von der Texas A&M Universität zeigen, dass das Hefeortholog Kar2p die Funktion von BiP nicht übernehmen, sondern vielmehr einen dominant-negativen Effekt auf dieses ausüben kann (Alder *et al.*, 2005).

Die Beteiligung von BiP und seinen Co-Chaperonen an den oben erwähnten Prozessen wurde bisher lediglich anhand von *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es, eine siRNA basierte Depletion von BiP in Säugerzellen zu etablieren und die damit einhergehenden Phänotypen zu untersuchen, darunter auch die Frage, ob das Fehlen von BiP einen Einfluss auf den Proteintransport hat. Ferner sollte untersucht werden, ob der zuvor beschriebene dominant-negative Effekt von Kar2p sich auch *in vivo* nachweisen lässt und ob das Hefeortholog möglicherweise sogar einen Verlust von BiP kompensieren kann.

#### 4.1.1 Depletion des HSP70 Chaperons BiP mittels RNA-Interferenz

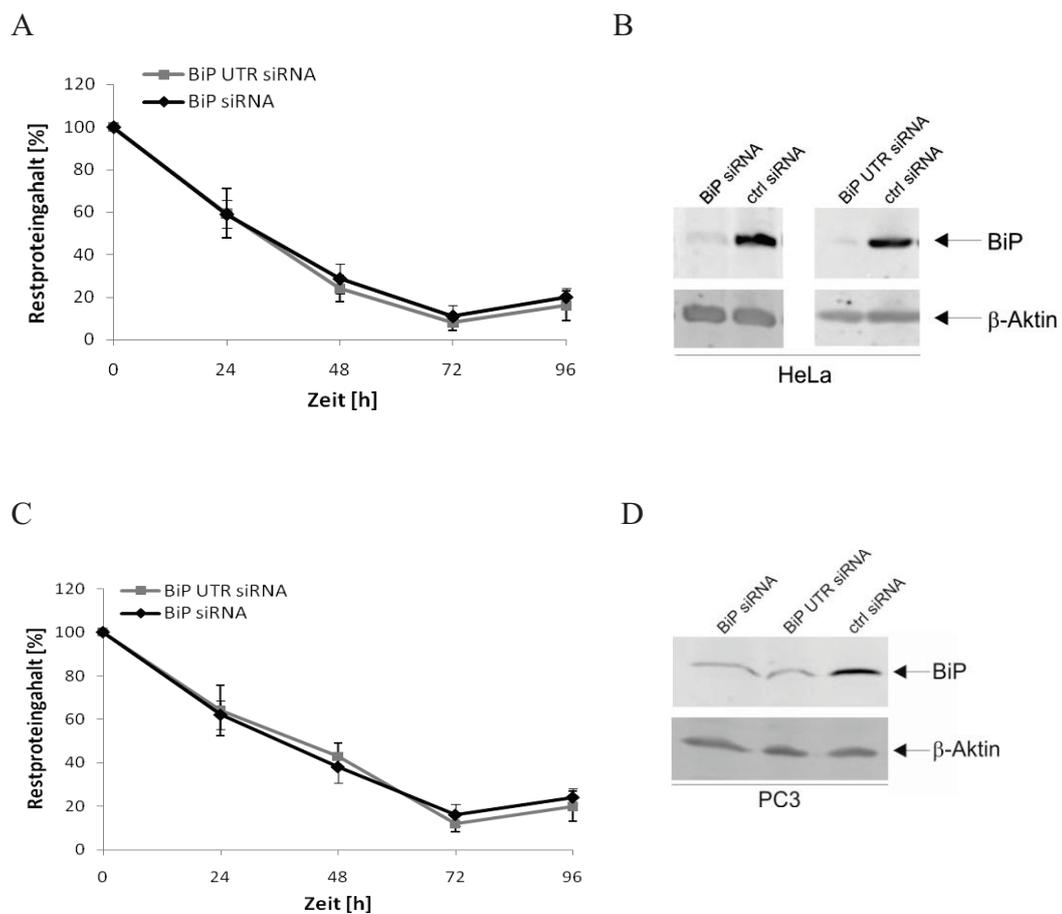
Mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technologie ist es möglich, anhand kurzer siRNAs von ca. 21-23 Nukleotiden Länge in höheren Eukaryoten durch Abbau der mRNA eine Hemmung der Genexpression zu bewirken. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unter Punkt 3.2.9.4.4 beschriebenen Spaltung der mRNA der Zielgene.

Zur Herstellung BiP-depletierter Zelllinien wurden verschiedene, von der Firma Ambion bezogene, siRNAs verwendet. Die im Folgenden als BiP bezeichnete siRNA ist gegen die codierende Region der Ziel-mRNA gerichtet, während die als BiP UTR benannte siRNA diese durch Bindung innerhalb des 5'-UTR-Bereiches abbaut. Die siRNAs wurden in den humanen Zelllinien PC3 (Prostata-Karzinomzellen) und HeLa (Cervix-Karzinomzellen) auf ihre Wirksamkeit hin überprüft, wobei auch die einzusetzenden Konzentrationen sowie die Transfektionsbedingungen anhand von Vorversuchen optimiert wurden. Um den optimalen Zeitpunkt der Proteinreduktion festzustellen, wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet (*Abb. 4.1*). Relevante Analogien der benutzten siRNAs zu anderen Genen konnten durch Datenbankanalysen ausgeschlossen werden.

Das Monitoring der Proteinreduktion erfolgte über gelelektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) der Zellextrakte und Western Blot-Analyse mit anschließender immunologischer Detektion. Für die Auswertung wurden die Proteinbanden densitometrisch quantifiziert, der Proteingehalt auf  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein normiert und anschließend in Verhältnis zu den parallel dazu mit Kontroll- (ctrl-) siRNA transfizierten, mitgeführten Kontrollzellen gesetzt.

*Abb. 4.1 A* zeigt grafisch den Verlauf der Restproteingehalte der mit BiP UTR und BiP siRNA transfizierten HeLa-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion. Mit beiden siRNAs konnte der zelluläre Proteingehalt des Hsp70 Chaperons gleichermaßen reduziert werden. Von durchschnittlich 60% nach 24 h fiel der Restproteingehalt auf etwa 35% nach 48 h und erreichte nach 72 h sein Minimum mit durchschnittlich 12%. Im weiteren zeitlichen Verlauf wurde wieder ein Anstieg der Menge an BiP beobachtet. Dies ist darin zu begründen, dass es sich bei der siRNA-vermittelten Degradation um eine transiente und nicht um eine stabile Transfektionsmethode handelt.

In *Abb. 4.1 C* sind die Restproteingehalte der mit BiP UTR und BiP siRNA transfizierten PC3-Zellen aufgeführt. Analog zu den HeLa-Zellen wurde auch hier mit beiden siRNAs der zelluläre Proteingehalt an BiP in gleicher Weise reduziert. Nach 24 h lag der Proteingehalt noch bei etwa 65%, fiel dann nach 48 h auf ca. 40% und erreichte bei 72 h mit durchschnittlich 15% das Optimum. Nach 96 h stieg auch hier die Menge an BiP wieder an. In Teilabbildung B und D ist beispielhaft ein Western Blot 72 h nach Transfektion dargestellt.



**Abb. 4.1: Depletion von BiP in HeLa- & PC3-Zellen und Nachweis der Proteinreduktion durch Western Blot Analyse.**

Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa- und PC3-Zellen wurden mit 30 nM BiP siRNA und BiP UTR siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit je 30 nM siRNA nachtransfiziert (siehe Punkt 3.2.9.4.4). 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE und Western Blot mittels primärem anti-BiP- und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit-Antikörper analysiert (*Tabelle 3.1*). Zur quantitativen Erfassung des Restproteingehaltes wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin) normiert und in Verhältnis zu denen der parallel mitgeführten Kontrollzellen gesetzt ( $n=4$ ). **A:** Restproteingehalt depletierter HeLa-Zellen. **B:** Western Blot-Analyse 72 h nach siRNA-Transfektion von HeLa-Zellen. **C:** Restproteingehalt depletierter PC3-Zellen. **D:** Western Blot-Analyse 72 h nach siRNA-Transfektion von PC3-Zellen.

Die „Silencing“-Experimente zeigen, dass BiP effektiv in den verschiedenen Zelllinien depletiert wurde, wobei die optimale Transfektionseffizienz jeweils nach 72 h erreicht wurde.

#### 4.1.2 Wachstums- und Zellvitalitäts-Assays BiP depletierter Zellen

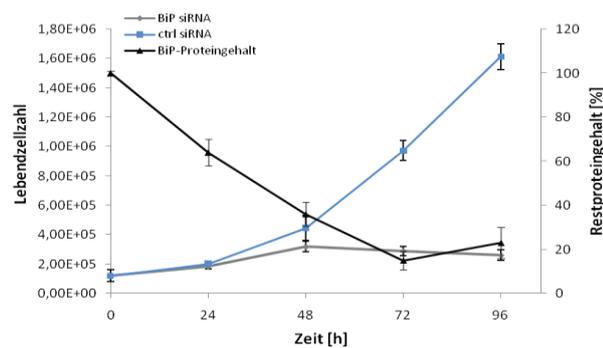
Die korrekte Faltung, Assemblierung und Modifikation von Proteinen ist für ihre Funktion und somit auch für die Entwicklung einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Es hat sich gezeigt, dass die Funktion vieler Genprodukte essentiell ist, so dass ein Verlust zum Zelltod führt. Die Suppression von p68, einem Mitglied der DEAD-Box-Protein-Familie, führt beispielsweise in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsfähigkeit gegenüber der Kontrollzellen (Jalal, 2005). Für Hefen konnte gezeigt werden, dass Kar2p, das Ortholog zu BiP, essentiell für das Zellwachstum ist. Ein wichtiger Prozess innerhalb der Reifung von Proteinen ist ihre Translokation in das Endoplasmatische Retikulum. Der Translokationsapparat setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, so dass es denkbar wäre, dass der Verlust der einen oder anderen Komponenten die Proteintranslokation hindert und somit die Vitalität bzw. Proliferation der Zellen negativ beeinträchtigt. In der Hefe ist bekannt, dass das Sec61 $\beta$ -Homolog nicht essentiell ist, obgleich sein Fehlen zu Transportdefekten führt (Toikkanen *et al.* 1996; Finke *et al.* 1996). Um zu überprüfen, welche Funktion der durch siRNA-Interferenz erzielte Verlust von funktionalem BiP auf die Proliferation der Zellen hat und ob es sich wie bei seinem Hefeortholog Kar2p um ein essentielles Protein handelt, wurden im Folgenden verschiedene Zellvitalitäts-Assays angewandt.

##### 4.1.2.1 Bestimmung der Zellzahlen BiP depletierter HeLa- und PC3-Zellen

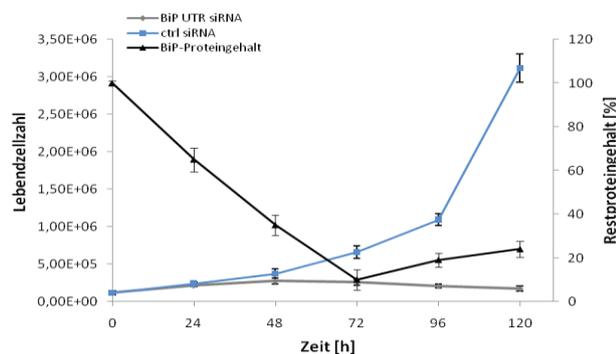
Sowohl HeLa- als auch PC3-Zellen wurden zu je  $1,2 \times 10^5$  Zellen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät, mit je 30 nM BiP siRNA und BiP UTR siRNA transfiziert und nach 24 h mit je 30 nM siRNA nachtransfiziert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h (BiP UTR siRNA) wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl durch Auszählen der lebenden Zellen mittels Neubauerkammer bestimmt. Als Kontrolle wurden parallel ctrl siRNA transfizierte Zellen mitgeführt. In *Abb. 4.2* und *4.3* sind die Zellzahlen sowohl der BiP depletierten HeLa- und PC3-Zellen als auch

die der Kontrollzellen sowie der Restproteingehalt an BiP im Verhältnis zu dem der Referenzzellen gegen die Zeit dargestellt. Der Verlust von endogenem BiP führte sowohl bei HeLa- als auch bei PC3-Zellen unter Verwendung beider siRNAs zu einer Reduktion der Zellzahl. *Abb. 4.2 A* und *B* zeigen, dass bis 48 h nach Transfektion und einem durchschnittlich ermittelten Restproteingehalt von etwa 40% die Zellzahl BiP depletierter HeLa-Zellen zunahm. Gegenüber den Kontrollzellen war jedoch bereits nach 48 h eine Reduktion in der Zellzahl erkennbar. Zum Zeitpunkt des optimalen „Silencing“, 72 h nach Transfektion, zeichnete sich ein Rückgang der Zellzahl BiP depletierter Zellen ab, welcher sich im weiteren zeitlichen Verlauf, trotz leichten Anstiegs an BiP, fortsetzte. Diese Reaktion konnte bis 168 h nach Transfektion (Untersuchungszeitraum) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei den Kontrollzellen wurde währenddessen ein deutlicher Anstieg der Zellzahl gemessen.

A



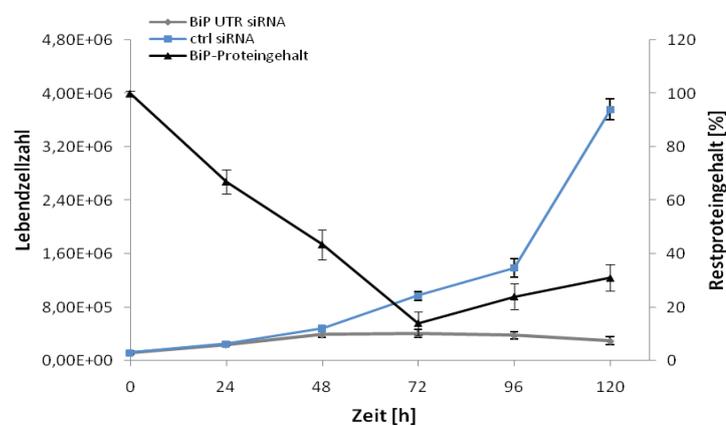
B



**Abb. 4.2: Zellzahlbestimmung BiP depletierter HeLa-Zellen.**

Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und 2x mit 30 nM BiP UTR siRNA, BiP siRNA und ctrl siRNA transfiziert. Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h und 120 h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahlen durch Auszählen mittels Neubauerkammer bestimmt ( $n=3$ ). Zur Erfassung des Restproteingehaltes wurde ein Teil der Zellen im Western Blot analysiert und die Proteinbanden densitometrisch quantifiziert.

Das Zellwachstumsverhalten nach Depletion von BiP in PC3-Zellen verhielt sich analog zu dem in HeLa-Zellen (*Abb. 4.3*). Bis zu einem Zeitraum von 48 h stieg die Zahl BiP UTR siRNA transfizierter Zellen an, wobei sich auch hier bereits nach 48 h und einem Verlust von BiP um ca. 35% eine deutliche Verringerung der Zellanzahl gegenüber den Kontrollzellen erkennen ließ. Bis 72 h blieb die Anzahl der Zellen nahezu konstant, während sie nach 96 h, trotz Anstieg des Restproteingehaltes an BiP, kontinuierlich abnahm. Dasselbe Verhalten konnte zudem bei BiP siRNA transfizierten PC3-Zellen beobachtet werden (Daten nicht aufgeführt).



**Abb. 4.3: Zellzahlbestimmung BiP UTR siRNA-transfizierter PC3-Zellen.**

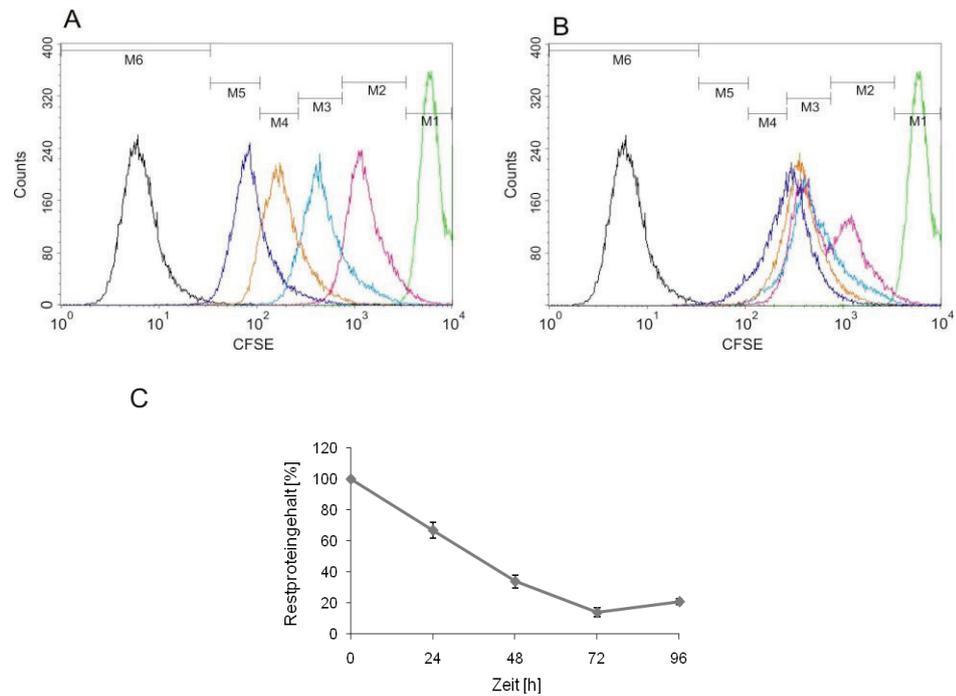
Jeweils  $1,2 \times 10^5$  PC3-Zellen wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und 2x mit 30 nM BiP UTR siRNA und ctrl siRNA transfiziert. PC3-Zellen wurden BiP UTR siRNA und ctrl siRNA transfiziert (3.2.9.4.4). Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahlen durch Auszählen mittels Neubauerkammer bestimmt (n=3). Zur Erfassung des Restproteingehaltes wurde ein Teil der Zellen im Western Blot analysiert.

Die Experimente veranschaulichen, dass ein Verlust von endogenem BiP zu einem Wachstumsarrest und letztlich zum Zellsterben der HeLa- als auch PC3-Zellen führte, womit gezeigt wurde, dass das Hsp70 Chaperon essentiell ist.

#### 4.1.2.2 CFSE-Färbung BiP-depletierter Zellen

Im Folgenden wurde die Funktion von BiP bezüglich der Zellproliferation weiter untersucht. Anhand der angewandten durchflusszytometrischen Proliferationsmessung mittels CFSE wurde gezeigt, dass ein Funktionsverlust des Hsp70 Chaperons einen Zellteilungsarrest bewirkte, was seine Bedeutung als essentielles Protein untermauert. CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester), ein fluoreszierender Lebendzellfarbstoff, bindet in der Zelle über seine Succinimidyl-Gruppen kovalent an sekundäre Aminogruppen intrazellulärer Proteine (Parish, C.R. 1999) und lässt dabei zelluläre Funktionen unbeeinträchtigt (Weston, 1990). Lyons und Parish (1994) zeigten an murinen mononukleären Zellen, dass sich bei jeder Zellteilung der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, so dass sich mit zunehmender Proliferation die Fluoreszenzintensität verringert, wobei eine Halbierung der Farbstoffmenge einer Zellteilung entspricht.

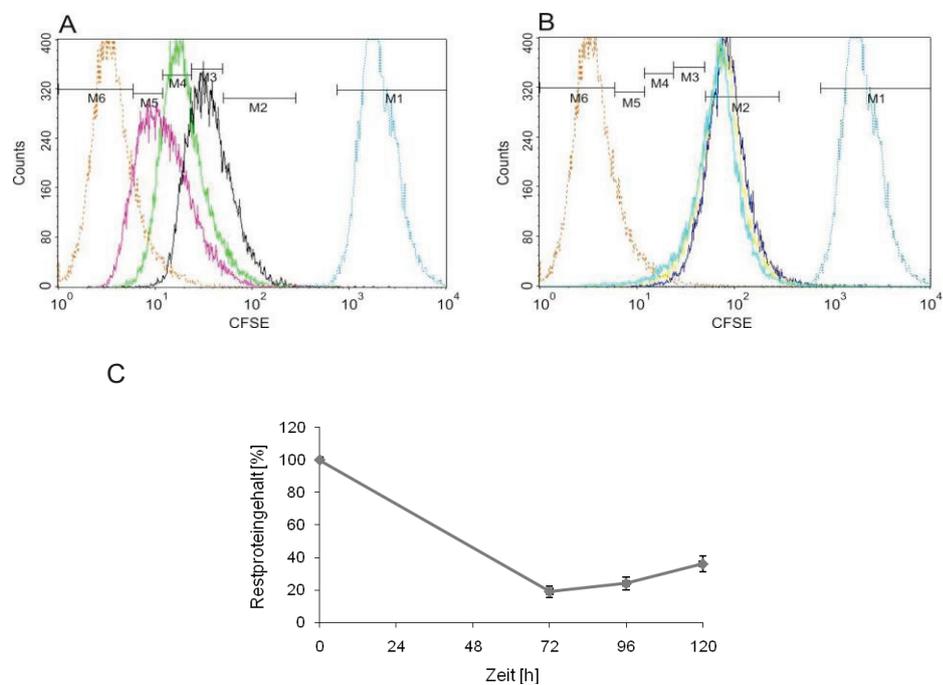
Zur Proliferationsmessung mittels CFSE wurden die BiP depletierten HeLa-Zellen mit 5  $\mu$ M CSFE wie unter Punkt 3.2.9.5.4.1 beschrieben gefärbt. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Zellproliferation mittels FACS detektiert (*Abb. 4.4 & 4.5*). Auf der X-Achse ist die Intensität der Färbung aufgetragen, die Y-Achse gibt die relative Zellzahl an. Der grüne Peak zeigt die Intensität der Färbung zum Zeitpunkt 0 h, der schwarze die ungefärbten Zellen. Anhand der durchflusszytometrischen Messung wird deutlich, dass ein Verlust von funktionalem BiP einen Zellteilungsarrest bewirkte (*Abb. 4.4 B & 4.5 B*). Die Messung der Kontrollzellen (*Abb. 4.4 A & 4.5 A*) veranschaulicht, dass die Intensität von CFSE bei zunehmender Zellteilung abnahm. Bis zu einem Zeitpunkt von 48 h nach BiP siRNA Transfektion und einer Reduktion des Proteinlevels auf durchschnittlich 35% wurden bei den BiP depletierten Zellen keine Unterschiede in der Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes gegenüber den Kontrollzellen detektiert, während nach 48 h die intrazelluläre CFSE-Konzentration konstant blieb (*Abb. 4.4 B*). Dies impliziert, dass die Zellen in ihrer Teilung arretiert sind. Die in *Abb. 4.5 B* aufgeführte CFSE-Färbung BiP UTR siRNA transfizierter HeLa-Zellen verdeutlicht, dass auch bis 120 h trotz Anstieg der Menge an BiP die CFSE-Intensität konstant blieb, während die der Kontrollzellen kontinuierlich abnahm.



**Abb. 4.4: CFSE-Färbung BiP siRNA-transfizierter HeLa-Zellen.**

0 h (grün), 24 h (pink), 48 h (hellblau), 72 h (orange) und 96 h (dunkelblau) nach siRNA-Transfektion (3.2.9.4.4) und Färbung mit 5  $\mu$ M CFSE (3.2.9.5.4.1) wurden die Zellen geerntet, mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und im FACS analysiert. Schwarz sind die ungefärbten Zellen dargestellt.

**A:** ctrl siRNA transfizierte Kontrollzellen. **B:** BiP siRNA transfizierte Zellen. **C:** Restproteingehalt an BiP bezogen auf die Kontrollzellen.



**Abb. 4.5: CFSE-Färbung BiP UTR siRNA-transfizierter HeLa-Zellen.**

**A:** ctrl siRNA transfizierte Kontrollzellen. 0 h (blau), 72 h (schwarz), 96 h (grün) und 120 h (pink) nach siRNA-Transfektion und Färbung mit 5  $\mu$ M CFSE (3.2.9.5.4.1) wurden die Zellen geerntet, mit

3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und im FACS analysiert. Orange sind die ungefärbten Zellen dargestellt. **B:** BiP UTR siRNA-transfizierte Zellen. 0 h (blau), 72 h (dunkelblau), 96 h (gelb) und 120 h (hellblau) nach siRNA-Transfektion und Färbung mit 5  $\mu$ M CFSE wurden die Zellen geerntet, mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert und im FACS analysiert. **C:** Restproteingehalt an BiP bezogen auf die Kontrollzellen.

Mit Hilfe der CFSE-Färbung wurde somit analog zur Zellzahlbestimmung die Bedeutung von BiP für die Zelle gezeigt, wonach ein Verlust der Menge an BiP von > 85% zu einem Wachstumsarrest führte.

#### 4.1.2.3 WST-1 Assay BiP depletierter HeLa- und PC3-Zellen

Um die anhand der Zellzahlbestimmung sowie der CFSE-Färbung BiP depletierter Zellen versus Kontrollzellen beobachtete essentielle Eigenschaft von BiP hinsichtlich der Zellproliferation untermauern zu können, wurde parallel die Vitalität der depletierten Zellen anhand des WST-1 Assays untersucht. Der Vitalitäts-Assay basiert auf einer enzymatischen Spaltung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalses WST-1 zu dem dunkelroten Formazan durch zelluläre mitochondriale Dehydrogenasen. Eine Expansion vitaler Zellen korreliert hierbei mit einem Anstieg der Aktivität der zellulären Dehydrogenasen, was wiederum einen Anstieg der Umsetzung zu Formazan bedingt. Dieser Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer photometrisch gemessen und ausgewertet werden (Francoeur *et al.*, 1996). Die Menge des gebildeten Formazans und damit das Ausmaß der photometrisch bestimmten Extinktion sind proportional zur Anzahl an vitalen Zellen.

Zur Zellvitalitätsmessung wurden BiP UTR siRNA, BiP siRNA sowie ctrl siRNA transfiziert HeLa- und PC3-Zellen nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h mit je 10% WST-1 Reagenz bei 37 °C im Brutschrank über 15 min. und 30 min. inkubiert. Die anschließende photometrische Messung erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm in einer Dreifach-Bestimmung (*Abb. 4.6*). Zur Erfassung der Vitalität wurden die Signale der depletierten Zellen auf die der Kontrollzellen bezogen. In *Abb. 4.6* ist über einen Verlauf von 120 h eine deutliche Reduktion des WST-1 Signals sowohl in den BiP depletierten HeLa- als auch PC3-Zellen erkennbar. Aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften des Assays kann dies auf eine Reduktion der Aktivität an zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen zurückgeführt werden, was wiederum einer Abnahme an vitalen Zellen entspricht.

Abb. 4.6 A zeigt, dass die Transfektion mit zwei verschiedenen siRNAs in HeLa-Zellen einen äquivalenten Effekt bewirkte. Nach 48 h wurde eine Reduktion des WST-1 Signals gegenüber dem der Kontrollzellen auf ca. 60% bis 70% beobachtet. Zum Zeitpunkt des optimalen Silencings, 72 h nach Transfektion und Reduktion der Proteinkonzentration von > 80%, reduzierte sich das Signal auf ca. 40%. Nach 96 h wurde ein Rückgang um weitere 10% gemessen.

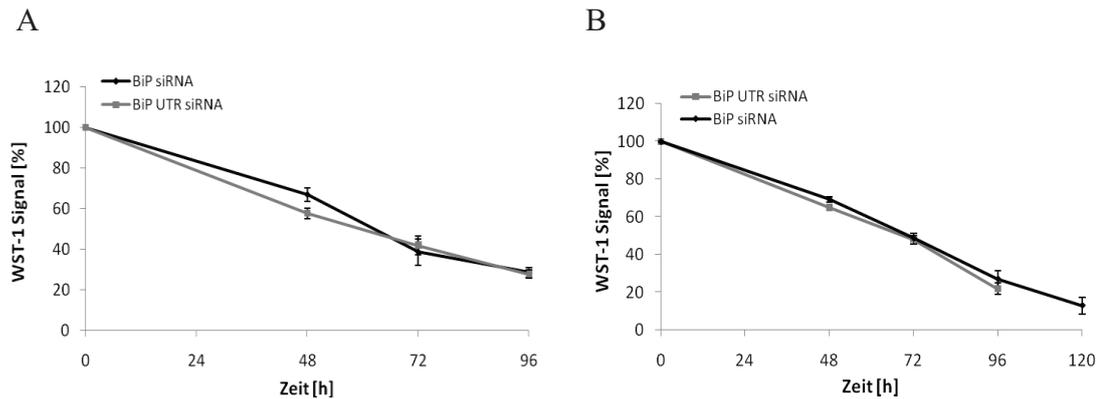


Abb. 4.6: WST-1 Assay BiP depletierter HeLa- und PC3-Zellen.

BiP UTR siRNA, BiP siRNA sowie ctrl siRNA transfizierte HeLa- und PC3-Zellen (3.2.9.4.4) wurden nach verschiedenen Zeitpunkten mit je 10% WST-1 Reagenz über 15 min. und 30 min. inkubiert und die Farbumsetzung im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen. Zur Erfassung der Vitalität wurde das WST-1 Signal der gesilenceten Zellen in Bezug zu dem der Kontrollzellen gegen die Zeit dargestellt (n=2). **A:** WST-1 Assay depletierter HeLa-Zellen. Der durch die Western Blot-Analyse ermittelte Restproteingehalt lag nach 48 h bei ca. 40% und nach 72 h bei etwa 13%. **B:** WST-1 Assay depletierter PC3-Zellen. Der in der Western Blot-Analyse ermittelte Restproteingehalt lag nach 48 h bei ca. 45% und nach 72 h bei etwa 15%.

Die in Abb. 4.6 B dargestellte Vitalitätsmessung von BiP depletierten PC3-Zellen verhielt sich analog zu der in HeLa-Zellen. Nach 48 h und einem Restproteingehalt von ca. 45% ging das WST-1 Signal, bezogen auf die Kontrollzellen, auf etwa 70% zurück, während nach 72 h und einem durchschnittlichen Restproteingehalt von 15% eine Reduktion auf 50% und nach 96 h auf 20% bis 30% beobachtet wurde. Dadurch, dass sich in der Vitalität von BiP UTR siRNA und BiP siRNA transfizierten Zellen keine Unterschiede zeigten, wurde zusätzlich in zwei unabhängigen Experimenten die Vitalität BiP siRNA transfizierter HeLa- und PC3-Zellen über einen Zeitraum von 120 h gemessen. Hierbei war eine weitere Reduktion des WST-Signals gegenüber den Kontrollzellen auf ca. 13% erkennbar. Aufgrund der über den Untersuchungszeitraum zunehmenden Konfluenz der Kontrollzellen und der dadurch bedingten Wachstumsinhibition, welche zum Zellsterben führte, wurde um eine

Verfälschung des WST-1 Assays zu umgehen, auf Messungen zu späteren Zeitpunkten verzichtet.

Anhand des WST-1 Assays wurde somit gezeigt, dass ein Verlust von endogenem BiP sowohl in HeLa- als auch in PC3-Zellen eine deutliche Reduktion der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen bewirkte, was wiederum mit einer verminderten Anzahl vitaler Zellen korreliert. Der Rückgang der Zellzahl BiP depletierter HeLa-Zellen im Verhältnis zu den Kontrollzellen verhielt sich hierbei direkt proportional zu der im WST-1 Assay gemessenen Vitalität. Nach beispielsweise 72 h und einem Restproteingehalt an BiP von ca. 15% wurde eine Verringerung der Vitalität gegenüber den Kontrollzellen um etwa 60% gemessen. Die Zellzahl an depletierten Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt  $2,6 \times 10^5$  Zellen gegenüber  $6,8 \times 10^5$  Kontrollzellen, wodurch sich im Verhältnis eine Reduktion um ebenfalls 60% ergab. Analog verhielt es sich bei den BiP depletierten PC3-Zellen.

Mit Hilfe der angewandten Vitalitäts-Assays wurde somit die essentielle Funktion des Hsp70 Chaperons BiP bezüglich der Zellproliferation untermauert.

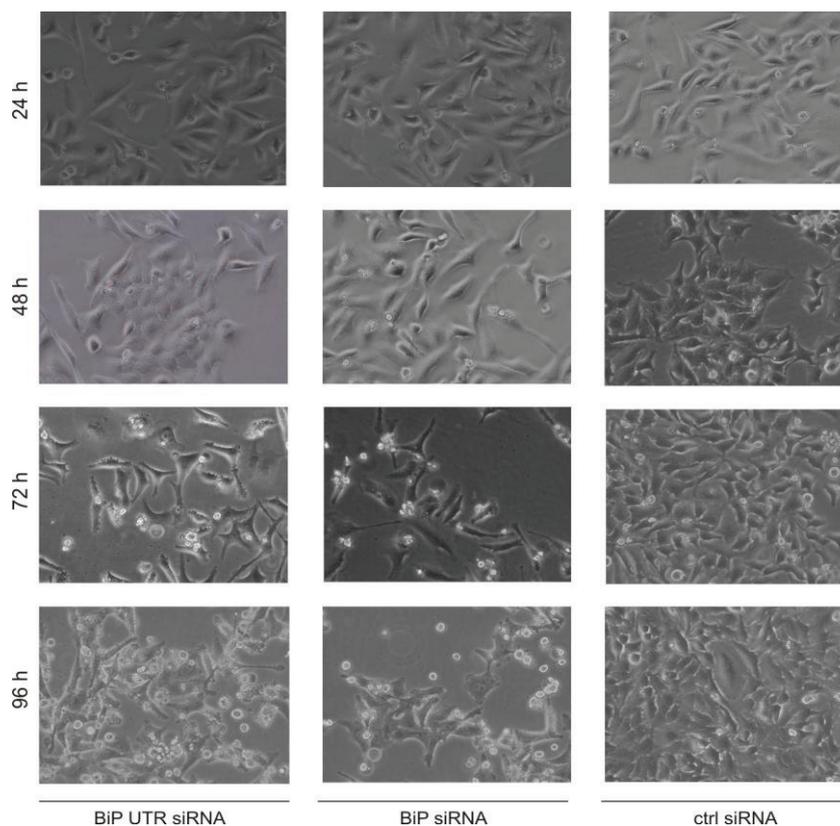
#### 4.1.3 Einfluss der Suppression von BiP auf die Zellmorphologie

Anhand der vorangegangenen Zellproliferationsstudien wurde gezeigt, dass ein Funktionsverlust von endogenem BiP sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirkte. Die Reduktion von BiP resultierte in einem Wachstumsarrest und führte letztlich zum Zellsterben. Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich der Verlust von BiP auf die Zellmorphologie und somit den Phänotyp der Zellen auswirkt.

##### 4.1.3.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen BiP depletierter Zellen

Zum Nachweis der Auswirkung des Verlustes von BiP hinsichtlich der Zellmorphologie, wurde die Morphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert (*Abb. 4.7*). Bis 48 h waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den BiP depletierten und den Kontrollzellen (Bildausschnitt rechts) erkennbar. 72 h nach Transfektion bei einem Gehalt an BiP von durchschnittlich 12% waren bereits einige geschrumpfte, abgerundete Zellen vorhanden. Die restlichen Zellen wiesen gegenüber den Kontrollzellen eine eher langgezogene Morphologie mit dentritenförmigen Ausläufern auf, was möglicherweise auf die

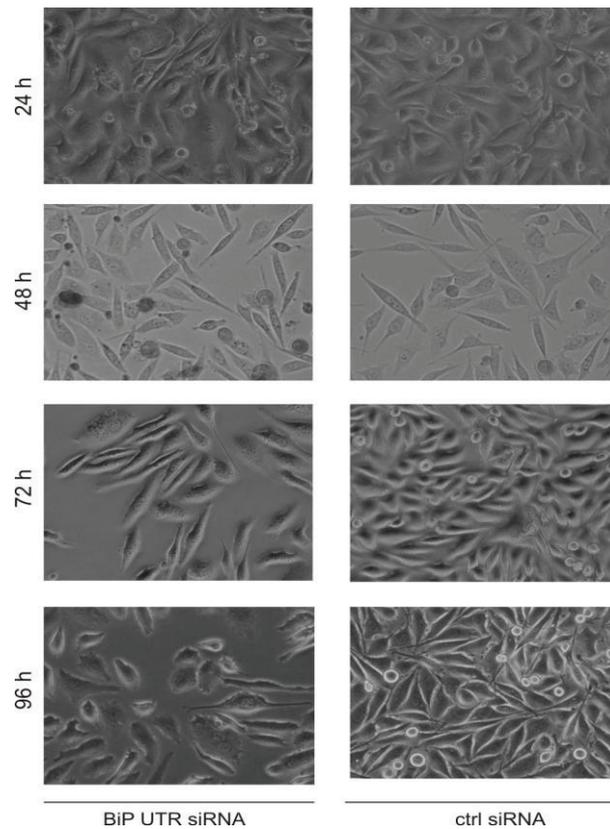
niedrige Zelldichte und die somit fehlende Kontaktinhibition zurückführbar ist. Nach 96 h waren im Kulturüberstand trotz leichter Zunahme der Menge an BiP auf ca. 20% zahlreiche abgerundete, tote Zellen vorhanden. Die restlichen Zellen wiesen ebenfalls eine eher langgestreckte Morphologie mit dentritenähnlichen Ausläufern auf. Die ab 72 h nach Transfektion beobachtete Reduktion der Zelldichte bestätigt somit die anhand der Zellzahlbestimmung erhobenen Daten.



**Abb. 4.7: Morphologie BiP depletierter HeLa-Zellen.**

Phasenkontrastaufnahmen BiP UTR siRNA, BiP siRNA sowie ctrl siRNA transfizierter HeLa-Zellen (3.2.9.4.4) 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion bei einer 200-fachen Vergrößerung.

Die BiP depletierten PC3-Zellen zeigten in ihrer Morphologie keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Kontrollzellen (*Abb. 4.8*). Die Zellen hatten ähnlich wie bei den HeLa-Zellen eine eher längliche Form, welche möglicherweise durch die geringere Zelldichte erklärbar ist.



**Abb. 4.8: Morphologie BiP depletierter PC3-Zellen.**

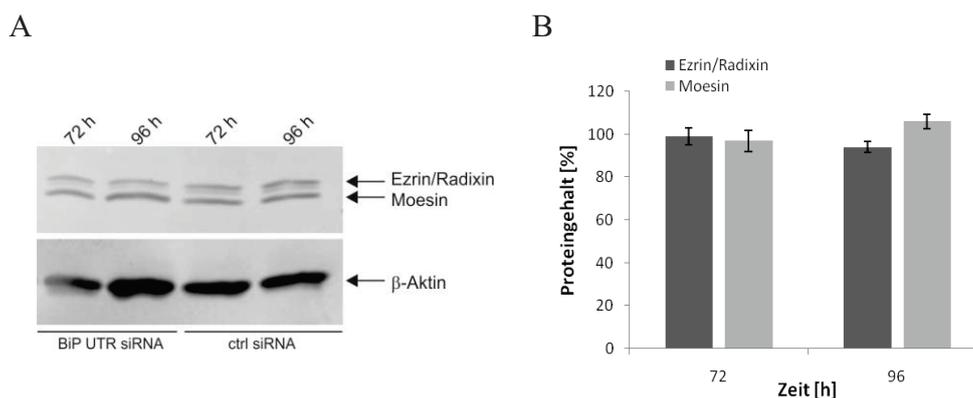
Phasenkontrastaufnahmen BiP UTR siRNA sowie ctrl siRNA transfizierter PC3-Zellen (3.2.9.4.4) 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion bei einer 200-fachen Vergrößerung.

#### 4.1.3.2 Untersuchung der Stabilität Aktin-bindender Cytoskelettproteine

Die Phasenkontrastaufnahmen BiP depletierter Zellen in *Abb. 4.7* und *4.8* zeigten, dass die Zellen gegenüber den Kontrollzellen eine eher langgestreckte Struktur mit dentritenähnlichen Ausläufern aufwiesen. Um zu prüfen, ob dieser Effekt durch die geringere Zelldichte und die fehlende Kontaktinhibition zustande kam oder ob dies eine zelluläre Reaktion infolge des Verlustes von BiP ist, wurde nachfolgend die Stabilität der Aktin-bindenden Cytoskelett-Proteine Ezrin, Radizin und Moesin (ERM) überprüft. Diese Proteine gehören der gleichen Proteinfamilie an und fungieren als „Linker“-Proteine zwischen der Plasmamembran und dem Aktin-Cytoskelett und sind an der Zelladhäsion sowie der Bildung der Microvilli involviert (Tsukita & Yonemura, 1999). Ezrin, auch bekannt als Cytovilin oder Villin-2 besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa und agiert als Protein-Tyrosin Kinase (Pujuguet *et al.*, 2003; Gould *et al.*, 1989). Interaktionspartner sind beispielsweise das Transmembran-oberflächenprotein CD43 (Cluster of Differentiation 43) oder ICAM-2 (Serrador *et al.*,

1998; Yonemura *et al.*, 1998; Barreiro *et al.*, 2002). Für Radixin, was ebenfalls ein Molekulargewicht von 80 kDa besitzt, konnten zudem Interaktionen mit GNA13 (Guanine nucleotide-binding subunit alpha 13) nachgewiesen werden (Vaiskunaite *et al.*, 2000). Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) weist eine molekulare Masse von 75 kDa auf und interagiert unter anderem mit dem Transmembranprotein CD43 oder dem vasculären Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 (Serrador *et al.*, 1998; Barreiro *et al.*, 2002).

In *Abb. 4.9 A* ist die Western Blot-Analyse der BiP depletierten HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem Ezrin/Radixin/Moesin-Antikörpermischung (1:750) dargestellt. Die Quantifizierungsdaten in Teilabbildung B lassen erkennen, dass ein Verlust von endogenem BiP keine Unterschiede zu den Kontrollzellen zeigte. Der ermittelte Restproteingehalt an BiP lag nach 72 h bei ca. 10% und nach 96 h bei etwa 23%.



#### **Abb. 4.9: Nachweis von Ezrin/Radixin und Moesin in BiP depletierten HeLa-Zellen mittels Western Blot-Analyse**

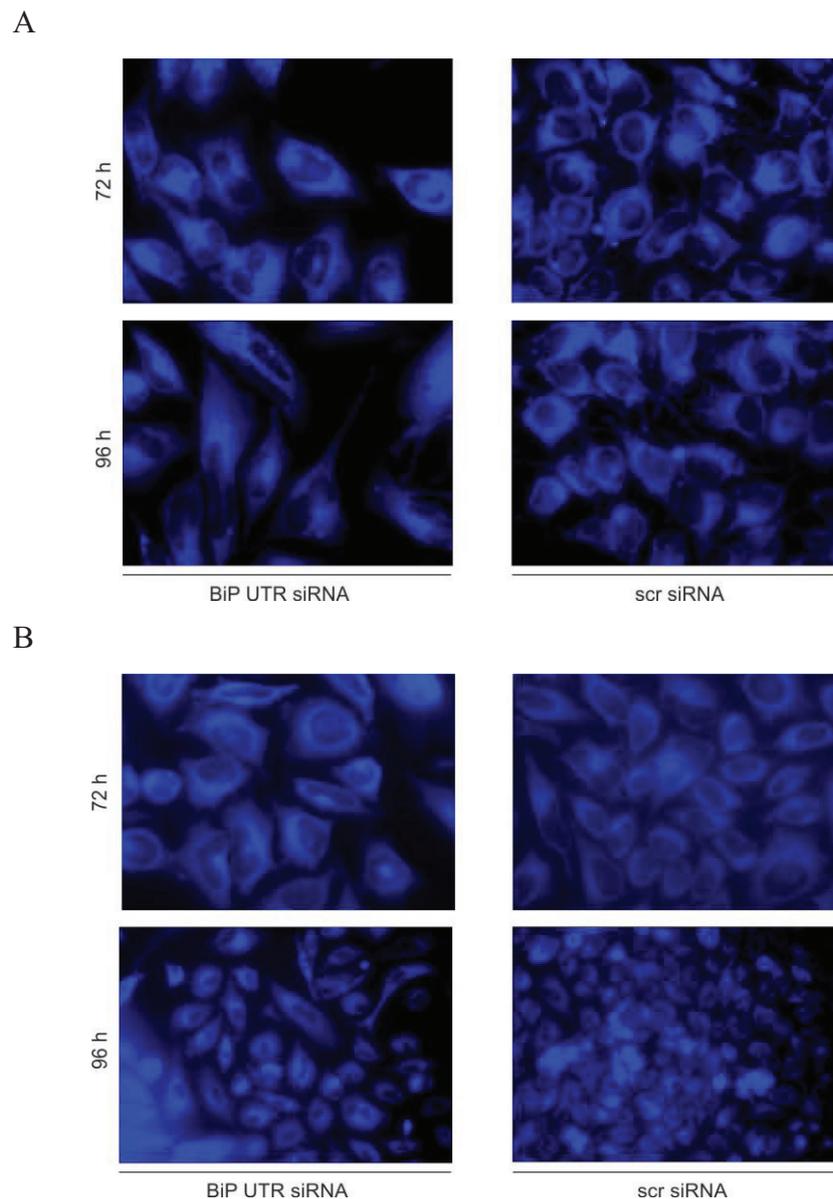
BiP depletierte HeLa-Zellen (3.2.9.4.4) wurden nach 72 h und 96 h geerntet, lysiert und über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte nach Western Blot-Analyse mit einem primären anti-Ezrin/Radixin/Moesin-Antikörpermischung (1:750) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Zur Quantifizierung wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle normiert und in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt.

Anhand der erhobenen Daten hat der Verlust des Hsp70 Chaperons BiP keinen Einfluss auf die Aktin-bindenden „Linker“-Proteine der ERM-Proteinfamilie.

#### 4.1.3.3 ER-Färbung BiP-depletierter Zellen

*In vitro* Studien haben gezeigt, dass BiP ein wichtiger Regulator des ER ist. Das Protein spielt mitunter eine wesentliche Rolle bei der Insertion von Vorläuferproteinen in das ER, bei deren korrekten Faltung und Assemblierung (Hegde *et al.*, 1998; Gething, 1999), bei der Permeabilitätserhaltung (Hamman *et al.*, 1998; Haigh & Johnson, 2002; Wirth *et al.*, 2003) sowie bei der Aufrechterhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase. Ein Funktionsverlust von BiP könnte demnach eine gestörte Funktion des Kompartimentes bewirken, welche mitunter zu Veränderungen in dessen Struktur bis hin zum Zerfall desgleichen führen könnte. Zudem wäre es auch denkbar, dass die Synthese von ER-strukturelevanten Proteinen beeinflusst sein könnte.

Zum Nachweis des Einflusses des Verlustes von BiP auf die Struktur des ER wurde die Methode der ER-Tracker™ Blue-White DPX Färbung angewandt. Bei ER-Tracker™ Blue-White Dapoxyl (DPX) handelt es sich um einen zellpermeablen Fluoreszenzfarbstoff, welcher eine hohe Selektivität für das ER aufweist und eine Lebendzellfärbung ermöglicht. Zur Färbung wurden zum Zeitpunkt des optimalen „Silencing“, 72 h nach Transfektion die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 1 mM ER-Tracker™ Blue-White DPX über 30 min. bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem UV-Filter visualisiert (*Abb. 4.10*). Die ER-Färbung in *Abb. 4.10* veranschaulicht, dass ein Verlust von endogenem BiP um ca. 85% - 90% nach 72 h keinen Einfluss auf die Struktur von HeLa- oder PC3-Zellen hat. Ein direkter Vergleich mit der Struktur der Kontrollzellen (im jeweils rechten Bildabschnitt) lässt keine Unterschiede in der Morphologie des ER erkennen, auch nicht nach 96 h. Demnach führt eine Reduktion von BiP innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 96 h zu keiner gestörten Morphologie des ER. Die Annahme, ein Verlust von BiP könnte möglicherweise die Synthese ER-strukturelevanter Proteine beeinträchtigen, wurde somit bis 96 h nach Transfektion nicht belegt.



**Abb. 4.10: ER-Tracker Färbung BiP depletierter HeLa- und PC3-Zellen**

72 h und 96 h nach siRNA Transfektion (3.2.9.4.4) wurden die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 1 mM ER-Tracker™ Blue-White DPX über 30 min. bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei detektiert. **A:** ER-Färbung BiP depletierter HeLa-Zellen (600-fache Vergrößerung). Der Restproteingehalt an BiP lag nach 72 h bei ca. 12%. **B:** ER-Färbung BiP depletierter PC3-Zellen (600-fache (72 h-Wert) bzw. 200-fache (96 h-Wert) Vergrößerung). Der Restproteingehalt an BiP lag nach 72 h bei ca. 15%.

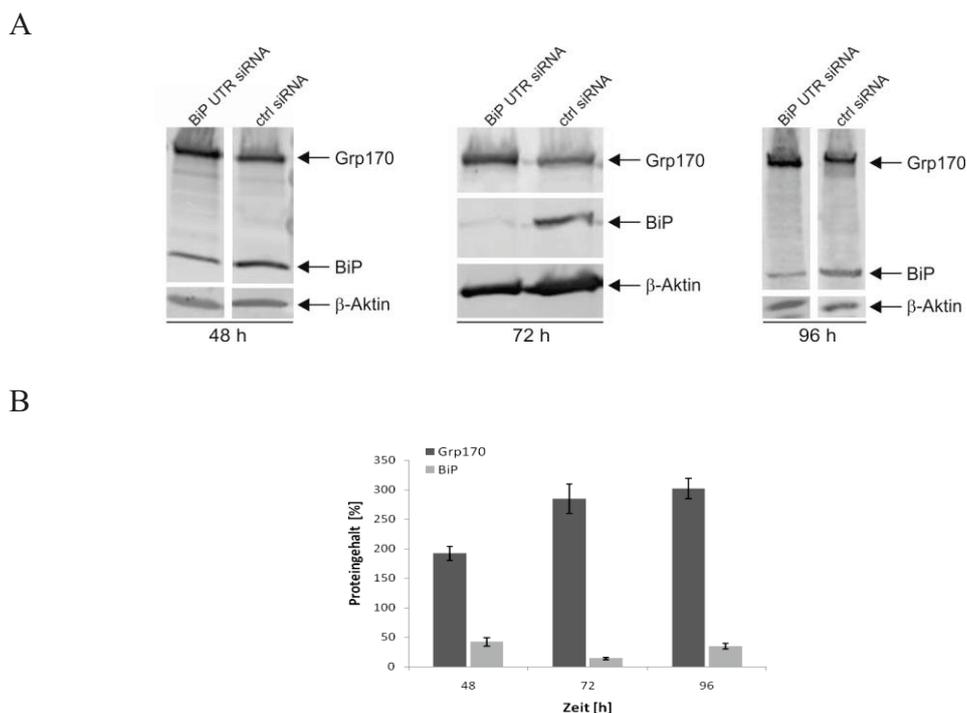
#### 4.1.4 Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Depletion von BiP

Eine Anhäufung ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine sowie ein Ungleichgewicht zwischen der Proteinsyntheseleistung und der Prozessierungsleistung des ER bedeutet für die Zelle Stress und führt zur Aktivierung der sogenannten „Unfolded Protein Response“ (UPR) (Kozutsumi *et al.*, 1988). Die UPR wirkt diesem ER-Stress auf

drei Arten entgegen: (I) Die Synthese weiterer Proteine wird reduziert, (II) die Bildung von ER-Chaperonen zur Wiederherstellung der korrekten Proteinfaltung wird erhöht und (III) die ER-assoziierte Degradation (ERAD) wird induziert. Reichen diese Prozesse zur Entlastung nicht aus, gehen die Zellen in Apoptose (Zhang & Kaufman, 2004; Kim *et al.*, 2006). Das Hsp70 Chaperon BiP wirkt als Sensor des UPR-Netzwerkes. In ungestressten Zellen ist BiP an sogenannten Regulatoren der UPR wie die Transmembrankinasen Ire1 oder PERK gebunden. Bei Belastung des ER mit ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen konkurrieren diese mit den Reglern um die BiP-Bindung, was zur Folge hat, dass diese sich lösen und nachgeschaltete Kaskaden aktiviert werden (Cox & Walter, 1993, 1996; Chapman & Walter, 1997; Harding *et al.*, 2000). Im Verlauf der UPR erhöht die Zelle ihre Faltungskapazität durch Induktion der Bildung weiterer Mediatoren wie CHOP, Grp94, Grp170, Calnexin oder Calretikulin (Kaufman, 1999).

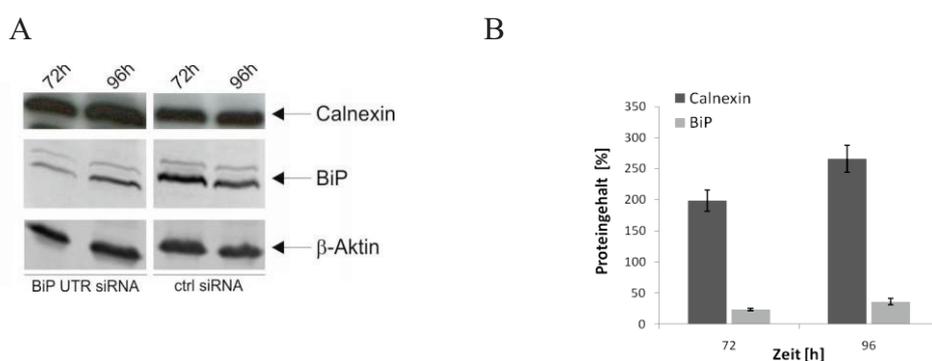
Nachfolgend wurde untersucht, ob ein Funktionsverlust von BiP zum ER-Stress und somit zur Überlastung an ungefalteten oder missgefalteten Proteinen und letztlich zur Erhöhung der Transkription von UPR Zielgenen führt.

Die Überprüfung der UPR-Induktion erfolgte auf Proteinebene über den Nachweis von UPR-Markerproteinen wie Grp170 und Calnexin. Hierfür wurden die mit BiP depletierte HeLa-Zellen nach 48 h, 72 h und 96 h im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte nach Western Blot-Analyse durch Inkubation mit anti-Grp170 sowie anti-Calnexin-Antikörper (*Abb. 4.11 & 4.12*). Das Balkendiagramm in *Abb. 4.11 B* veranschaulicht, dass bereits 48 h nach Transfektion der Proteinlevel an Grp170 auf das ca. 1,9-fache, nach 72 h bei einer Reduktion des Gehaltes an BiP von > 85% um das ca. 2,8-fache und nach 96 h um das ca. 3,1-fache gegenüber den Kontrollzellen anstieg. Der zu diesem Zeitpunkt bestimmte Restproteingehalt an BiP betrug im Durchschnitt 25%. Ein Anstieg der Menge an Grp170 wurde auch in BiP depletierten PC3-Zellen beobachtet (Daten nicht aufgeführt). Die intrazelluläre Menge des Lektins Calnexin erhöhte sich nach 72 h bei einem Gehalt an BiP von etwa 20% auf das 2-fache und nach 96 h um das ca. 2,7-fache (*Abb. 4.12*).



#### Abb. 4.11: Gehalt an Grp170 in BiP depletierten Zellen

**A:** Die 2x mit 30 nM BiP UTR und ctrl siRNA transfizierten HeLa-Zellen wurden nach 48 h, 72 h und 96 h geerntet, lysiert, über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die immunologische Detektion zum Nachweis von Grp170 erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Grp170-Antikörpers und der Nachweis der Menge an BiP wurde mit einem Antikörper gegen BiP detektiert (Tabelle 3.1). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. Hierzu wurde der Blot mit primärem Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin und sekundärem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper inkubiert. **B:** Zur Quantifizierung wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle normiert und in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt. Parallel wurde der Restproteingehalt an BiP zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt (n=3).



#### Abb. 4.12: Gehalt an Calnexin in BiP depletierten Zellen

**A:** Die 2x mit 30 nM BiP UTR und ctrl siRNA transfizierten HeLa-Zellen wurden nach 72 h und 96 h geerntet, lysiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an Calnexin erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen Calnexin, der Nachweis der Reduktion an BiP unter Verwendung eines Antikörpers gegen BiP (Tabelle 3.1). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. **B:** Zur Quantifizierung wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle normiert und in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt. Parallel wurde der Restproteingehalt an BiP zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt (n=3).

Die erhobenen Daten zeigen, dass der Verlust von BiP sowohl in HeLa- als auch in PC3-Zellen zu einer verstärkten Synthese UPR-induzierter Proteine führte, was folglich auf eine Induktion der UPR und somit auf ER-Stress hinweist.

#### 4.1.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose und Nekrose nach BiP Depletion

Der nach Verlust von BiP beobachtete Zellteilungsarrest sowie das Zellsterben weisen trotz gezeigter Induktion der UPR darauf hin, dass die Last an fehlgefalteten Proteinen im ER zu hoch ist, als dass sie durch die zelluläre Stressantwort behoben werden könnte, so dass die Zelle letztlich den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleitet. Dies würde den anhand der CFSE-Färbung gezeigten Zellteilungsarrest nach Suppression von BiP erklären. Es wäre zudem auch denkbar, dass die Zelle nekrotisiert. Diese beiden Möglichkeiten sollten im Folgenden weiter untersucht werden.

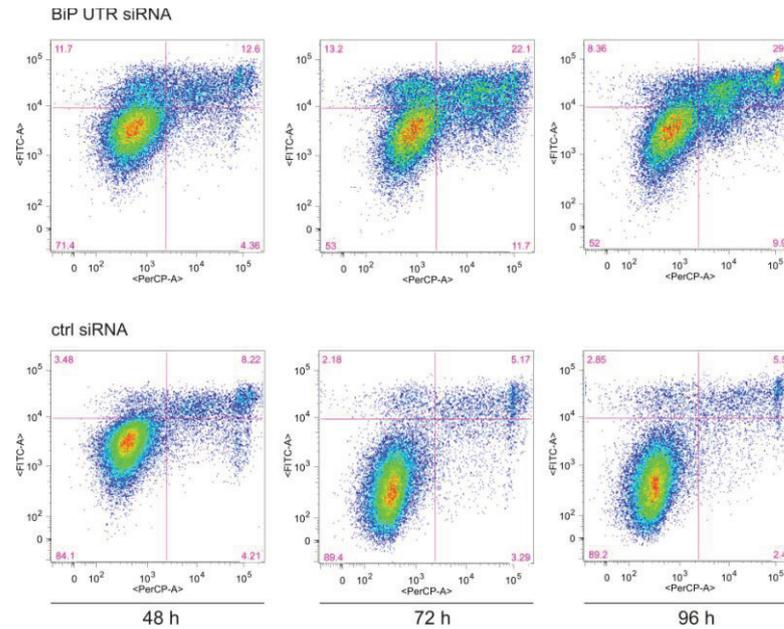
Der programmierte Zelltod ist ein für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus lebenswichtiger Mechanismus. Ein charakteristisches Merkmal früh-apoptotischer Zellen ist die Exposition von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Plasmamembransicht mit Hilfe der Scramblase. Eine kombinierte Färbung mit FITC-konjugiertem Annexin V, welches an Phosphatidylserin bindet, und Propidiumiodid, das nur in Zellen mit durchlässiger Membran und somit in nekrotische Zellen, eindringt, ermöglicht den Nachweis apoptotischer Zellen über eine durchflusszytometrische Messung. Früh-apoptotische Zellen sind Annexin V positiv und Propidiumiodid negativ, während Annexin V negative und Propidiumiodid positive Zellen nekrotisch sind.

HeLa-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach siRNA Transfektion mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und anschließend im FACS analysiert (*Abb. 4.13*). Aus *Abb. 4.13* wird deutlich, dass innerhalb der BiP depletierten Zellen der Anteil an Annexin V positiven und Propidiumiodid negativen Zellen gegenüber den Kontrollzellen erhöht war. Nach einer Reduktion des Restproteingehaltes nach 72 h von > 85% war eine Steigerung um ca. 11% und nach 96 h um ca. 6% erkennbar. Der Anteil an Annexin V und Propidiumiodid positiven Zellen lag nach 72 h um ca. 17% und nach 96 h um etwa 24% über dem in Kontrollzellen. Zudem war eine Zunahme an Propidiumiodid positiven aber

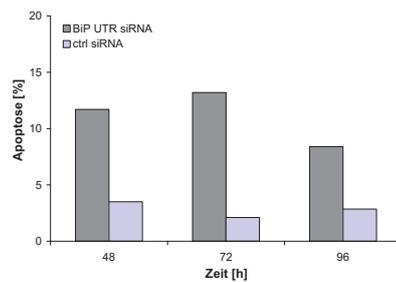
Annexin V negativen Zellen erkennbar, welche zu den nekrotischen Zellen gezählt werden.

Parallel wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) zum Nachweis der Nekrose anhand des Cytotoxicity Detection Kits gemessen, indem die Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes (Jodtetrazolchlorid, INT) zu Formazan (Parks *et al.* 1979; Szekeres *et al.* 1981; Murphy *et al.* 1993) über photometrische Messung und anschließende Quantifizierung nachgewiesen wurde (*Abb. 4.13 D*). LDH ist auch nach Freisetzung ins Zellkulturmedium, ein morphologisches Charakteristikum nekrotischer Zellen, sehr stabil, während andere cytoplasmatische Bestandteile meistens schnell abgebaut werden. Gegenüber den Kontrollzellen war die Aktivität von LDH im BiP depletierten HeLa-Zellen nach 72 h um ca. 40% erhöht, nach 96 h um ca. 50%. Ein Verlust des Hsp70 Chaperons führte deutlich zu einer Zunahme an nekrotischen Zellen. Die gleichen Ergebnisse wurden zudem in BiP siRNA transfizierten HeLa-Zellen sowie in BiP depletierten PC3-Zellen erzielt (Daten nicht aufgeführt). Dass nach Verlust des Hsp70 Chaperons sowohl eine Induktion der Apoptose als auch eine starke Zellnekrose nachweisbar war, bestätigt die bereits durch die Lebendzellzahlbestimmung nachgewiesene Reduktion der Proliferation, wodurch die essentielle Bedeutung von BiP untermauert wurde.

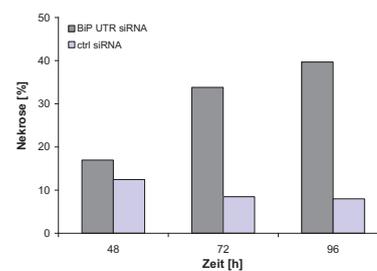
A



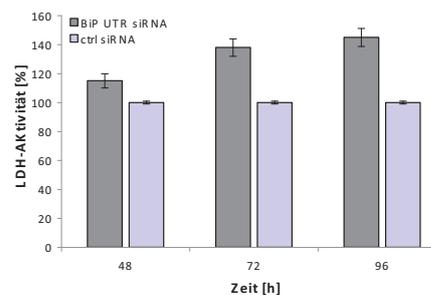
B



C



D



#### Abb. 4.13: Nachweis von Apoptose und Nekrose nach BiP Depletion in HeLa-Zellen mittels Annexin V Markierung und LDH-Assay

HeLa-Zellen wurden mit je 30 nM BiP UTR siRNA und ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit je 30 nM siRNA nachtransfiziert. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen geerntet, mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid über 15 min gefärbt (3.2.9.5.4.2) und die Färbung mittels FACS detektiert. **A:** FACS-Messung der siRNA transfizierten HeLa-Zellen. Auf der x-Achse ist der Kanal für Propidiumiodid, auf der y-Achse der für das FITC-konjugierte Annexin V dargestellt. **B:** Grafische Darstellung der Apoptoserate. **C:** Grafische Darstellung der Nekroserate. **D:** LDH-Assay. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurde im zellfreien Überstand die Aktivität der LDH durch Umsetzung von Jodtetrazolchlorid (INT) zu Formazan durch Messung der Absorption bei 490 nm photometrisch bestimmt. In der Grafik wurde die Aktivität von LDH in Bezug auf die der ctrl siRNA transfizierten Zellen dargestellt (n=2)

#### 4.1.6 Transportstudien in BiP depletierte Zellen

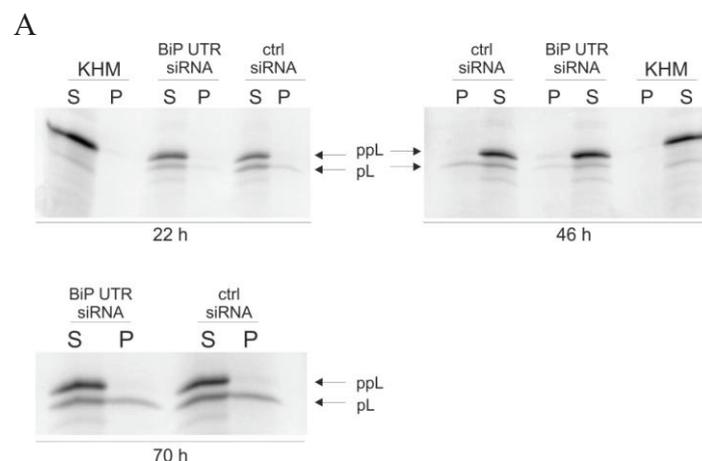
*In vitro* Studien haben bereits gezeigt, dass BiP eine wesentliche Rolle bei mehreren Schritten während der Translokation von Vorstufenproteinen bzw. der Insertion von Membranproteinen durch bzw. in die Membran des ER spielt. Das Protein ist hierbei auf mindestens drei Ebenen am Transport beteiligt: An der Öffnung des Sec61-Translocons (Klappa *et al.*, 1991; Dierks *et al.*, 1996), am Transport von Polypeptidketten durch den Kanal (Tyedmers *et al.*, 2003) sowie am Schließen der Pore (Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003; Alder *et al.*, 2005). Im Folgenden sollte erstmals die Funktion des Hsp70 Chaperons beim Proteintransport in Säugerzellen untersucht werden.

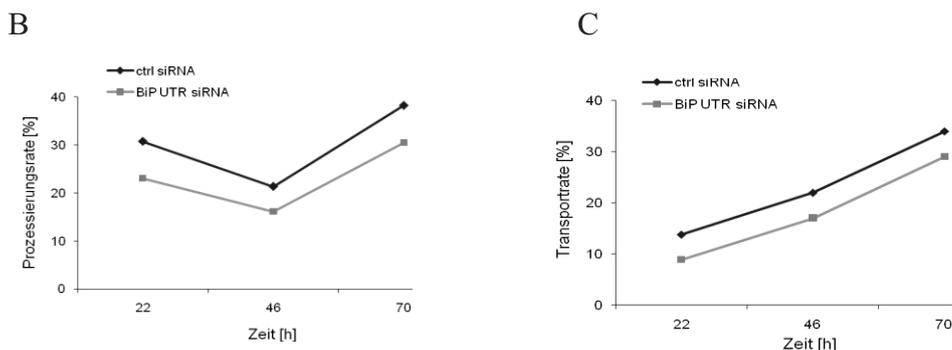
Der Proteinimport wurde über *in vitro* Synthese von Substratproteinen unter Verwendung des TNT-Kaninchen-Retikulozyten-Lysates (Promega) und anschließender Quantifizierung der Transporteffizienz in BiP depletierten HeLa-Zellen anhand der Methode der Sequestrierung untersucht (3.2.8.2). Um zu sehen, nach welchem Zeitpunkt bzw. ab welcher Restmenge an BiP ein möglicher Effekt auftritt, wurden die Transportstudien nach 22 h, 46 h und 70 h nach siRNA Transfektion durchgeführt. Hierfür wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten sog. Zell-ER präpariert (3.2.8.1). Dieses wurde sodann zu einem *in vitro*-Translationsansatz gegeben, in dem das Substratprotein synthetisiert wurde (3.2.7.2). Als Substrat für den ER-Import wurden die Aryl-Sulfatase A (pCA37 WT Sall), ein lysosomales Protein, sowie das Präprolaktin (ppL) verwendet, welches ein Modellprotein für die Untersuchung des cotranslationalen Transports darstellt (Kurzchalia *et al.*, 1986; Jungnickel und Rapoport, 1995; Mothes *et al.*, 1998; Tyedmers *et al.*, 2003; Woolhead *et al.*, 2004). Durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin wurde das Substrat zum Nachweis über Phosphorimaging radioaktiv markiert. Zur Quantifizierung der Transporteffizienz wurde anschließend der Translationsansatz in drei Aliquots aufgeteilt: Ein Ansatz wurde mit einer Saccharose-Lösung versetzt (S). Die Analyse dieser Probe zeigt sowohl das unprozessierte Vorläuferpeptid als auch das reife, prozessierte Protein. Dem zweiten Ansatz wurde Proteinase-K zugegeben, wodurch alle Proteine, die sich außerhalb des ERs befinden und somit nicht durch die Membran geschützt sind, verdaut werden (P). Die nach der Analyse entstehende Bande repräsentiert die im Lumen des ERs prozessierten und geschützten Proteine. Um eine mögliche Resistenz der synthetisierten Proteine gegen die Proteinase auf Grund kompakter Faltung auszuschließen, wurde dem dritten Ansatz Proteinase-K

und zusätzlich Triton X-100 (PT) zugegeben. Das Triton solubilisiert die Membran des ERs, sodass alle Substrate verdaut werden. Die Prozessierungsrate errechnet sich somit aus dem Verhältnis der prozessierten Ketten zur Summe der unprozessierten Vorläuferpeptide und der prozessierten Ketten. Der Anteil an prozessierten Ketten im Proteinase K-Ansatz zu dem im Saccharose-Ansatz entspricht einem Teil der Gesamtprozessierung und drückt die Effizienz des vollständigen Transportes aus.

Eine Beteiligung von BiP am cotranslationalen Transport hätte zur Folge, dass durch ein Ausschalten oder eine Reduktion des Proteins der Import gestört wäre. Verglichen mit dem Transport in Kontrollzellen würde demnach weniger Substrat importiert und somit prozessiert werden.

*Abb. 4.14* zeigt den Transportversuch von ppL in das Zell-ER BiP-depletierter HeLa- sowie Kontrollzellen 22 h, 46 h und 70 h nach siRNA Transfektion bei einem Restproteingehalt an BiP von ca. 45% nach 46 h und etwa 22% nach 70 h. Als Pufferkontrolle wurde ein Ansatz mit KHM anstelle des Zell-ERs mitgeführt, in dem kein Transport und somit auch keine Prozessierung zu sehen war. Bezüglich der Prozessierungs- und Transportrate von ppL in das Zell-ER BiP depletierter Zellen versus Kontrollzellen ergaben sich nur geringfügige Unterschiede (*Abb. 4.14 B & C*). Die Prozessierungsrate von ppL war in den depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um ca. 7% vermindert (*Abb. 4.14 B*). Während in den Kontrollzellen nach 20 h 14%, nach 46 h 22% und nach 70 h 34% an Protein importiert wurden, war die Transporteffizienz in den depletierten Zellen um ca. 5% gegenüber den Kontrollzellen reduziert (*Abb. 4.14 C*).



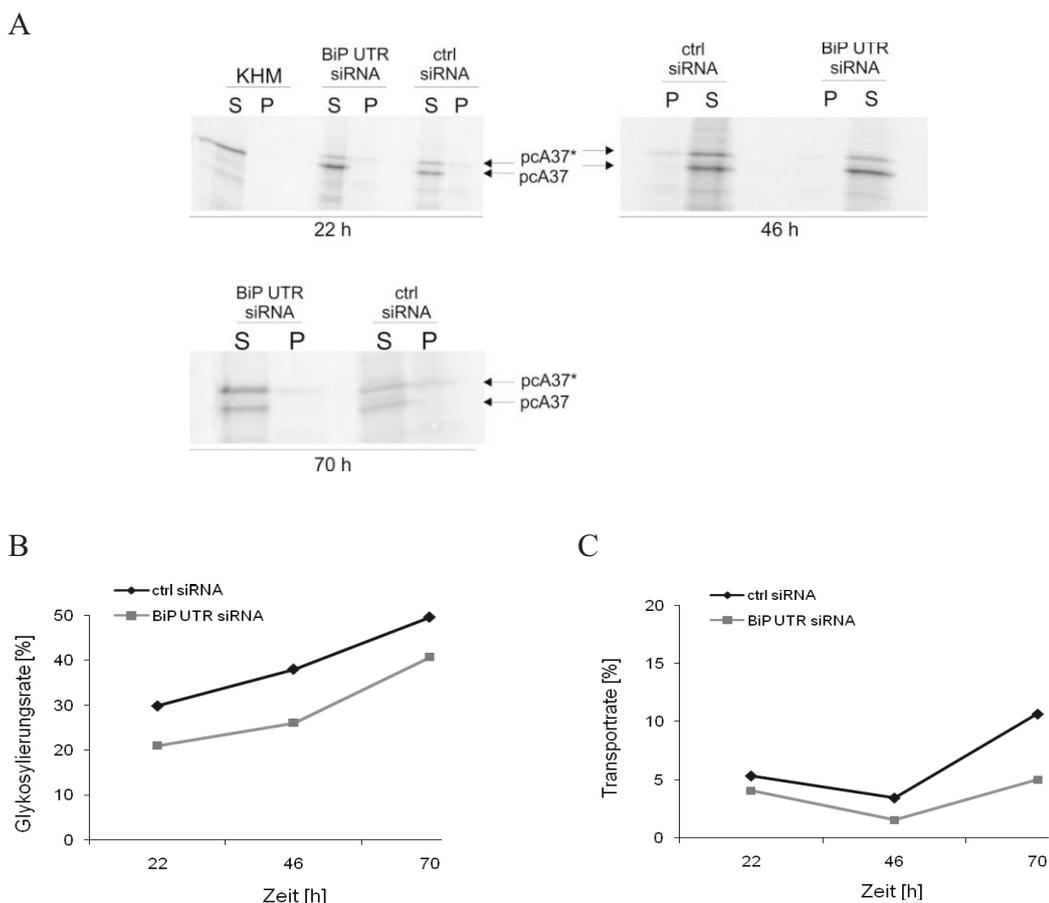


**Abb. 4.14: Transport von ppL in BiP depletierte HeLa-Zellen.**

Nachweis des Transportes von ppL in das ER BiP depletierter HeLa- und Kontrollzellen. Aufgeführt ist als Beispiel das Ergebnis eines Versuches.

**A:** ppL wurde mittels TNT-Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (Promega) synthetisiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. BiP UTR siRNA sowie ctrl siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden mit Digitonin [EK: 25 µg/ml] permeabilisiert. Für die Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Transportansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S) und 0,34 mg/ml Proteinase K (P) versetzt und 60 min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min. auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **B:** Bestimmung der Prozessierungsrate von ppL. Der Wert stellt den prozentualen Anteil der prozessierten Ketten im Saccharose-Ansatz (S) bezogen auf die Gesamtsynthesemenge von ppL und pL (S) dar. **C:** Bestimmung der Transporteffizienz von ppL in das ER BiP depletierter HeLa- und Kontrollzellen. Der Wert entspricht dem prozentualen Anteil an geschütztem, reifem Prolaktin im Proteinase K-Ansatz (P) bezogen auf die prozessierten Ketten pL im Saccharose-Ansatz (S).

In *Abb. 4.15* ist der parallel durchgeführte Transportversuch mit Aryl-Sulfatase A (pcA37 WT) in das Zell-ER BiP depletierter HeLa- versus Kontrollzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion dargestellt. Bei pcA37 handelt es sich um ein lysosomales Protein, welches im Zuge seiner Reifung im ER glykosyliert wird. Wie aus *Abb. 4.15 A* erkennbar ist, wurde die Aryl-Sulfatase A sowohl in das ER der Kontrollzellen als auch in das der BiP depletierten Zellen importiert und glykosyliert. Bezüglich der Effizienz der Glykosylierungs- und Transportrate in den depletierten Zellen im Vergleich zu der der Kontrollzellen ergaben sich analog zu den Transportversuchen mit ppL nur geringfügige Unterschiede (*Abb. 4.15 B & C*). Die Prozessierungsrate und somit die Glykosylierungseffizienz der Aryl-Sulfatase war in den depletierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen um ca. 9% vermindert (*Abb. 4.15 B*), die Transporteffizienz um ca. 2% bis 5% (*Abb. 4.15 C*).



**Abb. 4.15: Transport von pcA37 in BiP depletierte HeLa-Zellen.**

Nachweis des Transportes von pcA37 in das ER BiP depletierter HeLa- und Kontrollzellen. Aufgeführt ist als Beispiel das Ergebnis eines Versuches.

**A:** pcA37 wurde mittels TNT-Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (Promega) synthetisiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. BiP UTR siRNA sowie ctrl siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden mit Digitonin [EK: 25 µg/ml] permeabilisiert. Für die Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Transportansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S) und 0,34 mg/ml Proteinase K (P) versetzt und 60 min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min. auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **B:** Bestimmung der Glykosylierungsrate von pcA37. Der Wert stellt den prozentualen Anteil des glykosylierten Proteins im Saccharose-Ansatz (S) bezogen auf die Gesamtsynthesemenge von pcA37 und pcA37\* (S) dar. **C:** Bestimmung der Transporteffizienz von pcA37 in das ER BiP depletierter HeLa- und Kontrollzellen. Der Wert entspricht dem prozentualen Anteil an glykosyliertem pcA37\* im Proteinase K-Ansatz (P) bezogen auf die Glykosylierung im Saccharose-Ansatz (S).

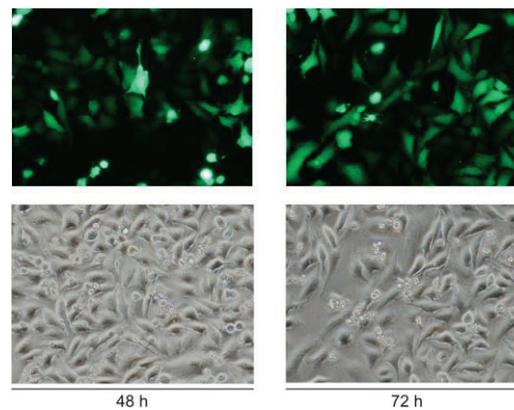
Parallel zu den aufgeführten Transportversuchen wurde der Einfluss einer BiP-Depletion auf den Import von Proteinen anhand der Faltung der *Gaussia* Luziferase (pGluc) untersucht. Das Enzym katalysiert die Oxidation des Luziferins Coelenterazin in einer Reaktion die Licht mit einer Wellenlänge von 475 nm emittiert. Diese Lumineszenz kann nur nach vollständigem ER-Import und korrekter

Faltung der Luziferase nachgewiesen werden. Durch die Messung der Lumineszenz von pGluc in das ER von BiP depletierten Zellen kann durch direkten Vergleich mit der Messung in Kontrollzellen die Transporteffizienz bestimmt werden. Analog zu den gezeigten Transportdaten mit ppL und Aryl-Sulfatase A hatte ein Verlust von BiP keinen Einfluss auf die Faltungseffizienz und somit den Transport der Luziferase. Die Messung der Lumineszenz von pGluc wies zwischen den beiden Ansätzen keine wesentlichen Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt). Eine Beteiligung von BiP am Proteintransport der in dieser Arbeit verwendeten Substrate in das ER von Säugerzellen konnte somit nicht bestätigt werden.

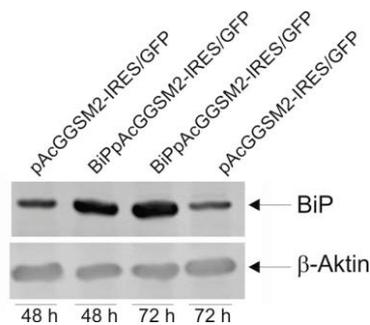
#### 4.1.7 Komplementationsstudien mit *BIP* überexprimierenden Zellen

In Vorbereitung auf weiterführende Studien, insbesondere zum Nachweis, ob die Folgen der Depletion von BiP durch exogene Zugabe des Proteins komplementiert werden kann, wurde BiP zur Expression in Säugerzellen in den pAcGGSM2-IRES/GFP Vektor kloniert. Die mRNA von BiP enthält hierbei keine UTR-Region, so dass die BiP UTR siRNA nicht daran binden und diese degradieren kann. Die *GFP*-Expression ermöglicht zudem über die Fluoreszenzmikroskopie einen Nachweis der Transfektionseffizienz. In *Abb. 4.16 A* ist die Fluoreszenzaufnahme BiP pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter HeLa-Zellen dargestellt. 48 h nach Plasmidtransfektion konnte bereits eine Transfektionseffizienz von ca. 60% - 70%, nach 72 h von über 80% erzielt werden. Die Western Blot-Analyse in *Abb. 4.16 B* zeigt, dass sich die Überexpression von BiP auch auf Proteinebene bestätigen ließ. In den BiP pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierten Zellen konnte nach 48 h etwa viermal und nach 72 h ca. fünfmal mehr BiP als in den mit dem Leervektor-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. BiP konnte auch erfolgreich in PC3-Zellen überexprimiert werden (Daten nicht gezeigt).

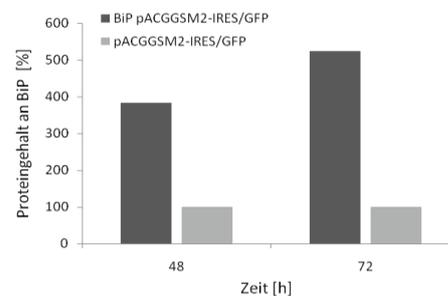
A



B



C



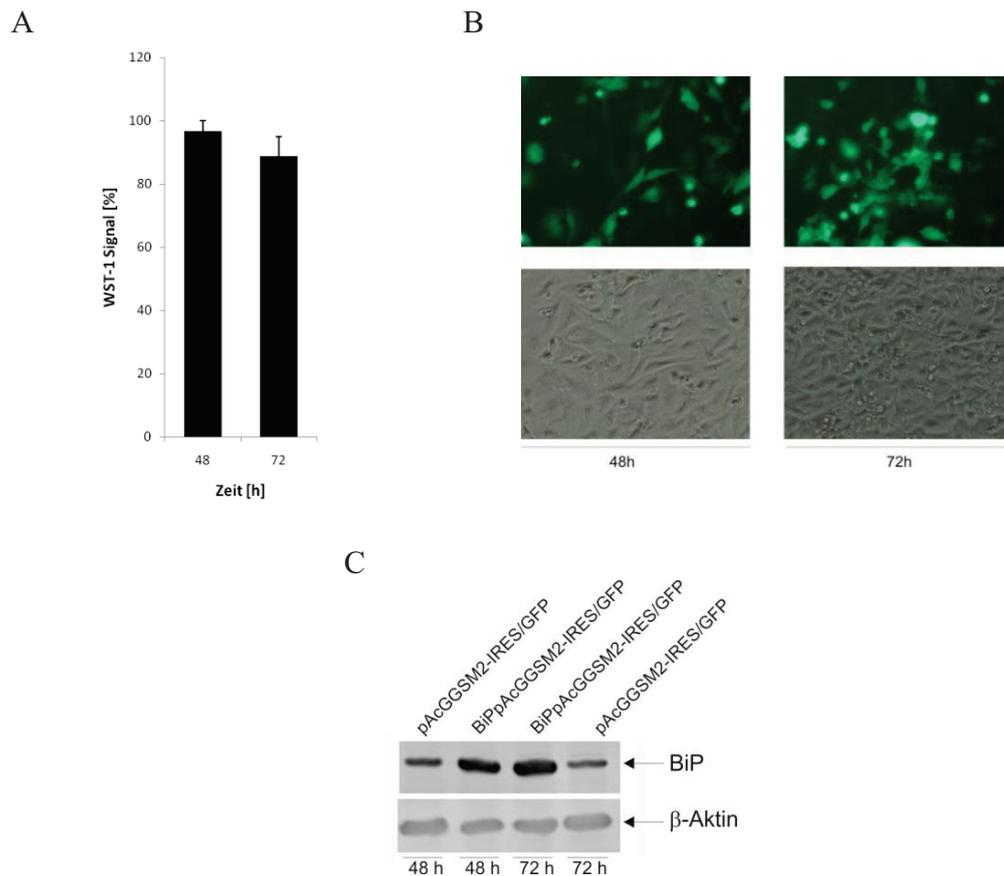
#### Abb. 4.16: Überexpression von *BIP* in HeLa-Zellen.

**A:** HeLa-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.2 beschrieben, mit 3  $\mu\text{g}$  BiP pAcGGSM2-IRES/GFP Plasmid-DNA transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurde die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop unter 200-facher Vergrößerung bestimmt. **B:** Western Blot-Analyse. Die immunologische Detektion erfolgte mit primärem anti-BiP-Antikörper (1:300) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). **C:** Gehalt an BiP bezogen auf die Kontrollzellen.

Durch die Konstruktion des Plasmids BiP pAcGGSM2-IRES/GFP ist es gelungen, das Hsp70 Chaperon erfolgreich in Säugerzellen überzuproduzieren.

#### 4.1.8 Einfluss der Überexpression von *BIP* auf die Zellvitalität

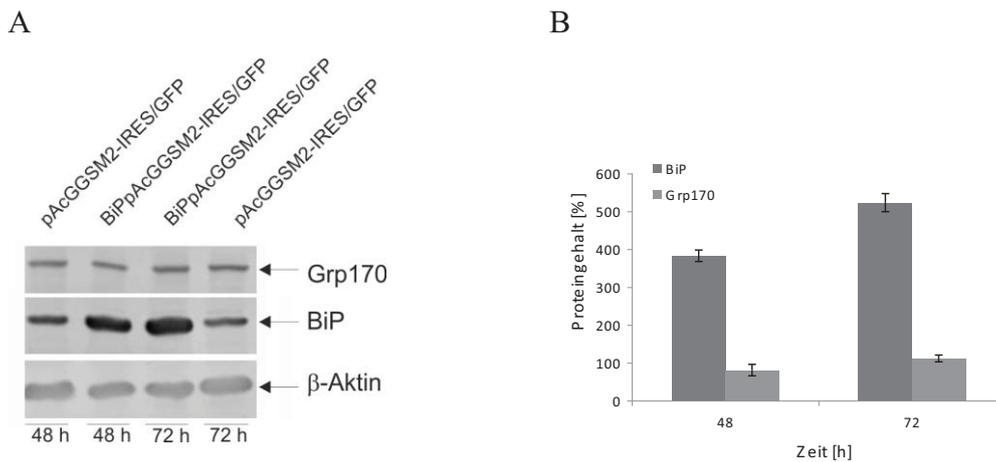
Um zu überprüfen, ob die Überexpression von *BIP* möglicherweise per se einen negativen Effekt auf die Vitalität der Zellen hat wurde die Zellvitalität anhand des WST-1 Assays untersucht. Aus Abb. 4.17 A geht hervor, dass sich das WST-1 Signal 72 h nach Transfektion bei einer Transfektionseffizienz von etwa 80% um ca. ein Achtel gegenüber dem der mit dem Leervektor transfizierten Zellen reduzierte. Dieselben Ergebnisse wurden auch in transfizierten PC3-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.17: WST-1 Assay BiP pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter HeLa-Zellen.**

**A:** WST-1 Assay BiP pAcGGSM2-IRES/GFP und Leervektor transfizierter HeLa-Zellen. Nach 48 h und 72 h wurden die Zellen mit je 10% WST-1 Reagenz über 15 min. und 30 min. inkubiert und die Farbumsetzung im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen. Zur Erfassung der Vitalität wurde das WST-1 Signal der transfizierten Zellen in Bezug zu dem der Kontrollzellen gegen die Zeit dargestellt (n=2). **B:** Fluoreszenzaufnahmen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz bei 200-facher Vergrößerung. **C:** Western Blot-Analyse und immunologische Detektion mittels anti-BiP-Antikörper.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob nach Überexpression von *BIP* die Synthese von Grp170 erhöht ist. Grp170 ist ein molekulares Chaperon, welches nach Induktion der UPR verstärkt synthetisiert wird und somit mögliche Hinweise auf ER-Stress signalisiert. In *Abb. 4.18* ist die Western Blot-Analyse BiP pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter HeLa-Zellen nach Inkubation mit dem Grp170-Antikörper dargestellt. Die Quantifizierungsdaten in Teil B verdeutlichen, dass eine Erhöhung des Gehaltes von BiP auf mehr als das Fünffache gegenüber den Kontrollzellen zu keinem Anstieg der Menge an Grp170 führte.



**Abb. 4.18: Western Blot zum Nachweis des Gehaltes an Grp170 nach Überexpression von *BIP*.**

**A:** HeLa-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.2 beschrieben, mit 3  $\mu$ g BiP pAcGGSM2-IRES/GFP transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte über Western Blot-Analyse mittels Antikörpers gegen BiP. **B:** Bestimmung des Proteingehaltes an BiP und Grp170 bezogen auf den der Kontrollzellen.

Die erhobenen Daten zeigen, dass eine Überexpression von *BIP* keinen Einfluss auf die Vitalität von HeLa- und PC3-Zellen hat. Zudem konnte auch kein Anstieg der Menge an Grp170 detektiert und somit keine Hinweise auf möglichen ER-Stress erhoben werden.

## 4.2 Kar2p, das Hefeortholog zu BiP

Kar2p ist das Hefeortholog zu BiP (Rose *et al.*, 1989; Normington *et al.*, 1989). Wie sein Säugerortholog ist Kar2p am Transport von Proteinen in das ER der Hefe beteiligt. Zusammen mit Sec63p wird das Protein sowohl für den posttranslationalen als auch für den cotranslationalen Transport benötigt. Kar2p spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung (Simons *et al.*, 1995), dem Import durch den Sec61p-Komplex (Vogel *et al.*, 1990) sowie beim Export missgefalteter Proteine durch den „Endoplasmatischen Retikulum assoziierten Degradations-Pathway“ (ERAD) (Kabani *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2001; Denic *et al.*, 2006). Die Transkription von *KAR2* wird durch die Anwesenheit ungefalteter Polypeptide im ER stimuliert. Studien haben zudem gezeigt, dass das Protein essentiell für das Zellwachstum ist (Normington *et al.*, 1989). In den Studien von Alder *et al.* (2005) konnte überdies gezeigt werden, dass Kar2p in Säugermikrosomen

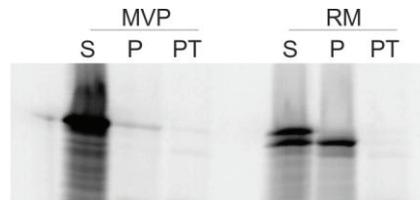
BiP beim Schließen des Sec61-Kanals nicht ersetzen kann, sondern vielmehr in Anwesenheit von BiP einen dominant-negativen Effekt auf das Verschließen der Pore ausübt.

Durch Expression von *KAR2* sollte im Folgenden untersucht werden, ob das Hefehomolog auch in Säugerzellen einen dominant-negativen Effekt aufweist. Zur Expression von *KAR2* in Säugerzellen wurde dessen DNA in den pAcGFP1-N1 sowie pAcGGSM2-IRES/GFP und für *in vitro* Versuche in den bakteriellen low copy Expressionsvektor pQE60-T7 kloniert.

#### 4.2.1 Expression von *KAR2* in Säugerzellen

Um zunächst zu überprüfen, ob Kar2p in das Säuger-ER importiert wird, wurde das Plasmid Kar2 pQE60-T7 *in vitro* translatiert und anschließend die Methode der Sequestrierung angewandt. Zur Proteinsynthese wurde ein gekoppeltes Transkriptions- und Translations-Kaninchen-Retikulozytenlysate („TnT“-Lysat, Promega) eingesetzt, in dem alle erforderlichen Proteine und Co-Faktoren enthalten sind. Durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin wurden die Substrate zum Nachweis über Phosphorimaging radioaktiv markiert. Die Translationsansätze für die *in vitro*-Synthese von Kar2p wurden nach dem unter Punkt 3.2.7.2 beschriebenen Protokoll angesetzt. Der T7-Promotor ermöglichte hierbei die Expression unter Einsatz der T7-Polymerase. Nach erfolgter *in vitro* Synthese wurde zum Nachweis der Expression sowie des Importes in das ER die Sequestrierung durchgeführt. Als ER wurden im Folgenden Hundepankreas-mikrosomen (RM) eingesetzt, Vesikel, die sowohl in der Membran als auch im Lumen dieselbe Zusammensetzung aufweisen wie das raue Endoplasmatische Retikulum des Säugers. Sie repräsentieren somit ein System, in dem der Transport von sekretorischen Vorstufenproteinen verfolgt werden kann (Blobel & Dobberstein, 1975c; Watts *et al.*, 1983). Zusätzlich wurde für den Transport ein Ansatz mit einer Pufferkontrolle (MVP = Mikrosomen-Verdünnungspuffer) mitgeführt. Die Proben wurden auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte über Phosphorimaging. In Abb. 4.19 ist die *in vitro* Synthese und die Sequestrierung aufgeführt. Hieraus ist deutlich erkennbar, dass Kar2p in RMs importiert wurde. Während im Ansatz mit Saccharose-Lösung sowohl die Vorläuferform als auch die prozessierte Form erkennbar ist, enthält der

Ansatz mit Proteinase K nur noch die reife, prozessierte und somit internalisierte Form. Durch Zugabe von Triton X-100 zum Proteinase-Ansatz wurden dagegen alle Peptide verdaut. Aus der Pufferkontrolle wird zudem deutlich, dass ohne Zugabe von Mikrosomen keine Prozessierung stattfand.



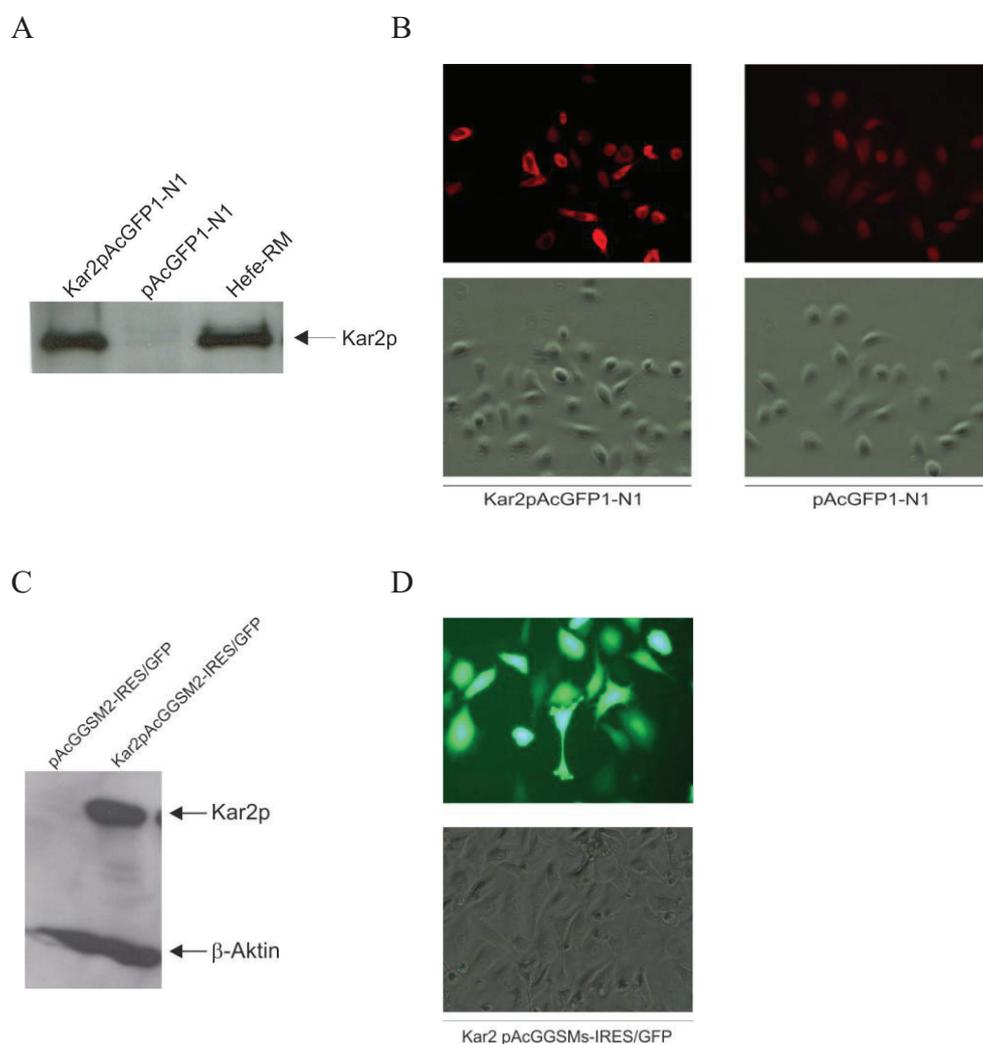
**Abb. 4.19: *In vitro* Translation und Transport von Kar2p in RMs.**

Nachweis des Transports von Kar2p in RMs (Raue Hundemikrosomen). Das Plasmid Kar2 pQE60-T7 wurde im TNT-Lysat (Promega) translatiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert (3.2.7.2). RMs wurden mit 25 µg/ml Digitonin permeabilisiert. Zur Untersuchung des Transports von Kar2p in RMs wurden dem Translationsansatz 0,7 µl RMs und als Pufferkontrolle 0,7 µl MVP (Mikrosomenverdünnungspuffer) zugegeben. Zur nachfolgenden Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Ansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S), 0,34 mg/ml Proteinase K (P) sowie Proteinase K + Triton X-100 (0,2%) (PT) versetzt und 60 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min. auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging.

Anhand des Kar2 pQE60-T7 Konstruktes konnte gezeigt werden, dass Kar2p in RMs von Säugern importiert wurde. Im Folgenden wurde die Synthese von Kar2p in Säugerzellen auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurde die DNA von *KAR2* in die Säuger-Expressionsplasmide pAcGFP1-N1 sowie pAcGFP1-N1 kloniert. Nach Plasmidtransfektion der Zellen erfolgte der Nachweis der Proteinsynthese mittels Western Blots und anti-Kar2-Antikörpers (Abb. 4.20). Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte für die Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierten Zellen über Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb. 4.20 B), die der Kar2 pAGGGSM2-IRES/GFP transfizierten Zellen über die Expression von *GFP* (Abb. 4.20 D).

Die Western Blot-Analysen in Abb. 4.20 A und Abb. 4.20 C 48 h bzw. 72 h nach Plasmidtransfektion zeigen, dass Kar2p in PC3-Zellen synthetisiert werden konnte. In den Leervektor transfizierten Kontrollzellen wurde kein Signal detektiert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich noch RMs der Hefe aufgetragen. Die Aufnahmen der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zur Bewertung der Transfektionseffizienz nach 48 h der mit dem Vektor pAcGFP1-N1-1 transfizierten Zellen lassen im Kontrollansatz eine hohe Hintergrundfluoreszenz erkennen (Abb. 4.20 B). Im

Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierten Ansatz zeigten einige Zellen bei gleicher Belichtungszeit eine etwas intensivere Färbung mit einer Abgrenzung des Zellkerns, wie sie für eine ER-Färbung charakteristisch ist. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die *KAR2* exprimierenden Zellen handelt. Verglichen mit den Kontrollzellen ergab sich somit eine Transfektionseffizienz von ungefähr 40% - 50%. In den Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierten Zellen konnte die Transfektionseffizienz durch die Expression von *GFP* eindeutig bestimmt werden. Nach 48 h wurde hierbei eine Effizienz von ca. 50% erzielt (Abb. 4.20 D). *KAR2* konnte auch erfolgreich in HeLa-Zellen überexprimiert werden (Daten nicht gezeigt).



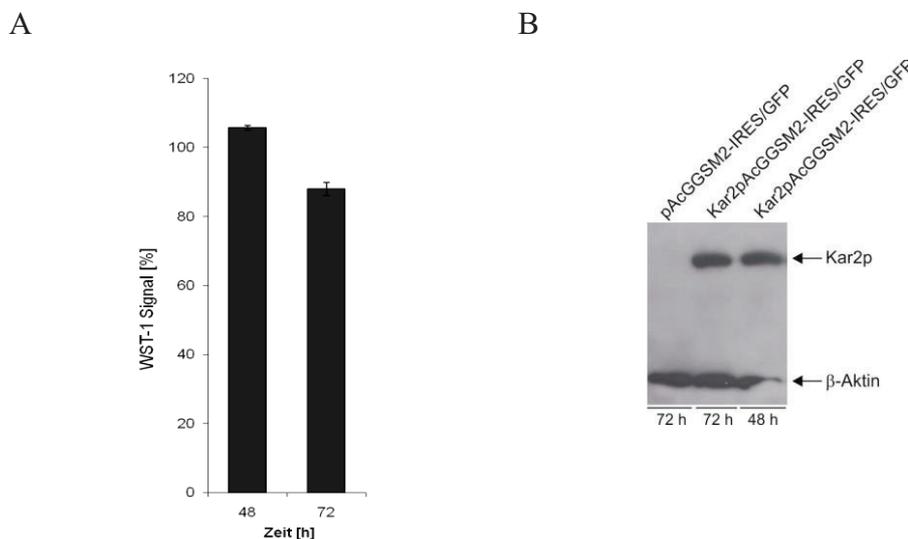
**Abb. 4.20: Western Blot-Analyse und Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis der Synthese von Kar2p.**

**A:** Western Blot-Analyse 48 h nach Plasmid-Transfektion. PC3-Zellen wurden mit Kar2 pAcGFP1-N1 und pAcGFP1-N1 transfiziert (3.2.9.4.1). Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert, im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte im Western Blot mit

primärem-anti-Kar2-Antikörper (1:10.000) und sekundärem Texas Red-konjugiertem anti-sheep-Antikörper (1:1000). Zur Kontrolle wurden Hefe-RMs mitgeführt. **B:** Immunfluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Transfektionseffizienz 48 h nach Plasmid-Transfektion. Die Zellen wurden mit 3,7% Formaldehyd fixiert und mit einem Antikörper gegen Kar2p inkubiert. Die Detektion erfolgte bei 200-facher Vergrößerung. **C:** Western Blot-Analyse der Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP Plasmid-DNA transfizierten Zellen nach 72 h. **D:** Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Transfektionseffizienz nach 72 h über *GFP*-Expression. Die Detektion erfolgte bei 200-facher Vergrößerung.

#### 4.2.2 Einfluss der Expression von *KAR2* auf die Vitalität von Säugerzellen

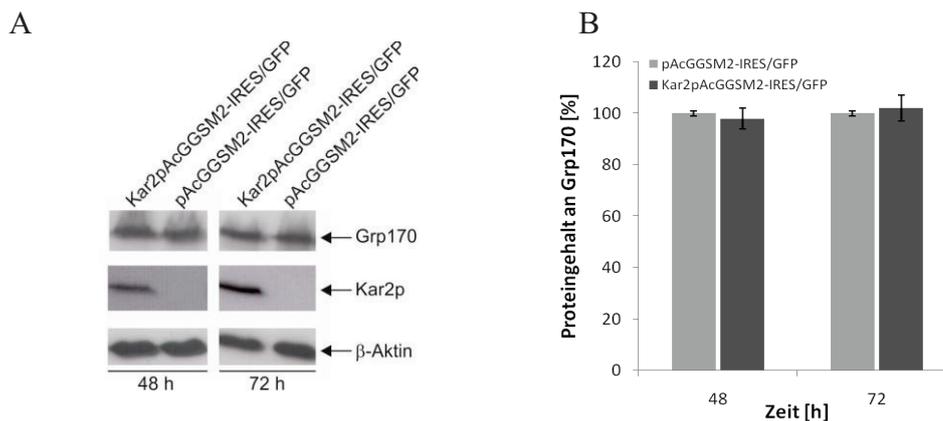
Im Folgenden wurde überprüft, welchen Einfluss die Expression von *KAR2* auf die Vitalität der PC3-Zellen hat. Die Vitalität der Zellen wurde 48 h und 72 h nach Plasmidtransfektion mittels WST-1 Assay untersucht (*Abb. 4.21*). Aus *Abb. 4.21 A* geht hervor, dass sich 72 h nach Transfektion mit Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP bei einer Transfektionseffizienz von ca. 70% das WST-1 Signal gegenüber den Kontrollzellen um ca. 10% reduzierte. Ein Vergleich der Zellzahlen zeigte keine Unterschiede im Proliferationsverhalten. Ein Einfluss auf die Vitalität von HeLa-Zellen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.21: WST-1 Assay Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter PC3-Zellen.**

**A:** PC3-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.2 beschrieben, mit Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP und pAcGGSM2-IRES/GFP transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurden die Zellen mit je 10% WST-1 Reagenz über 15 min. und 30 min. inkubiert und die Farbumsetzung im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen. Zur Erfassung der Vitalität wurde das WST-1 Signal der transfizierten Zellen in Bezug zu dem der Kontrollzellen gegen die Zeit dargestellt (n=2). **B:** Western Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörper gegen Kar2p und  $\beta$ -Aktin.

Zum Nachweis, ob eine Expression von *KAR2* möglicherweise zu ER-Stress führt, wurde nachfolgend die Synthese des UPR-induzierten Proteins Grp170 untersucht. In *Abb. 4.22 A* ist die Western Blot-Analyse Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter PC3-Zellen dargestellt. Die Quantifizierungsdaten in Teil B zeigen, dass die Expression von *KAR2* kein Anstieg in der Synthese von Grp170 bewirkte.



**Abb. 4.22: Western Blot zum Nachweis des Gehaltes an Grp170 nach Expression von *KAR2*.**

**A:** PC3-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.2 beschrieben, mit Kar2 pAcGGSM2-IRES/GFP transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte über Western Blot-Analyse mit Antikörpern gegen Kar2p, Grp170 und  $\beta$ -Aktin. **B:** Bestimmung des Proteingehaltes an Grp170 bezogen auf den der Kontrollzellen.

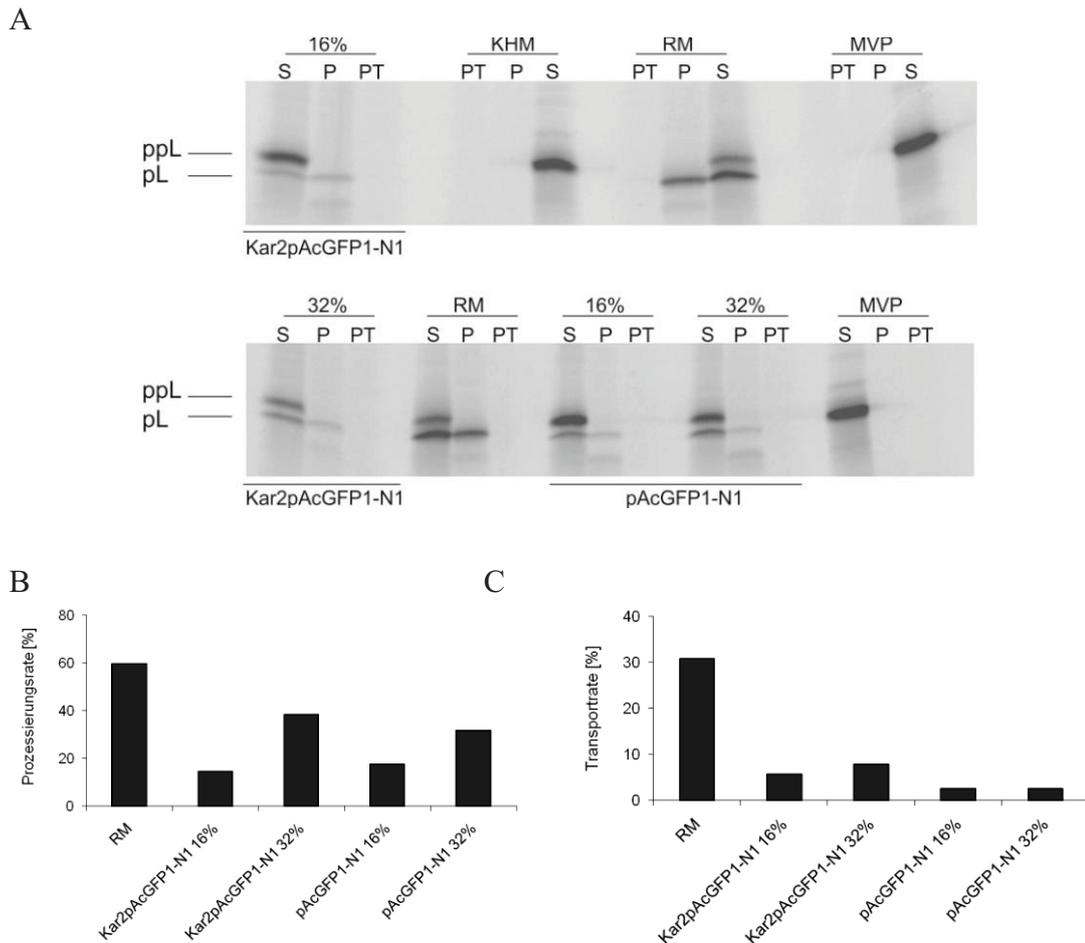
Die erhobenen Daten zeigen, dass die Synthese von Kar2p keinen Einfluss auf die Vitalität von HeLa- und PC3-Zellen hat. Zudem konnte auch kein Anstieg der Menge an Grp170 detektiert und somit keine Hinweise auf möglichen ER-Stress erhoben werden.

### 4.2.3 Auswirkungen der Expression von *KAR2* auf den Proteinimport von Säugerzellen

Im Folgenden wurden Transportstudien mit *KAR2* exprimierenden Zellen durchgeführt um zu prüfen, ob sich der von Alder *et al.* (2005) beschriebene dominant-negativen Effekt von Kar2p hinsichtlich der Funktion von BiP beim Schließen der Translokationspore, auch *in vivo* beobachten lässt. Demnach wäre mit einer veränderten Transporteffizienz zu rechnen. Transporteffizienz gegenüber der Die Transportstudien wurden in PC3-Zellen ausgeführt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass diese eine bessere Transport- und Prozessierungseffizienz als HeLa-Zellen aufwiesen.

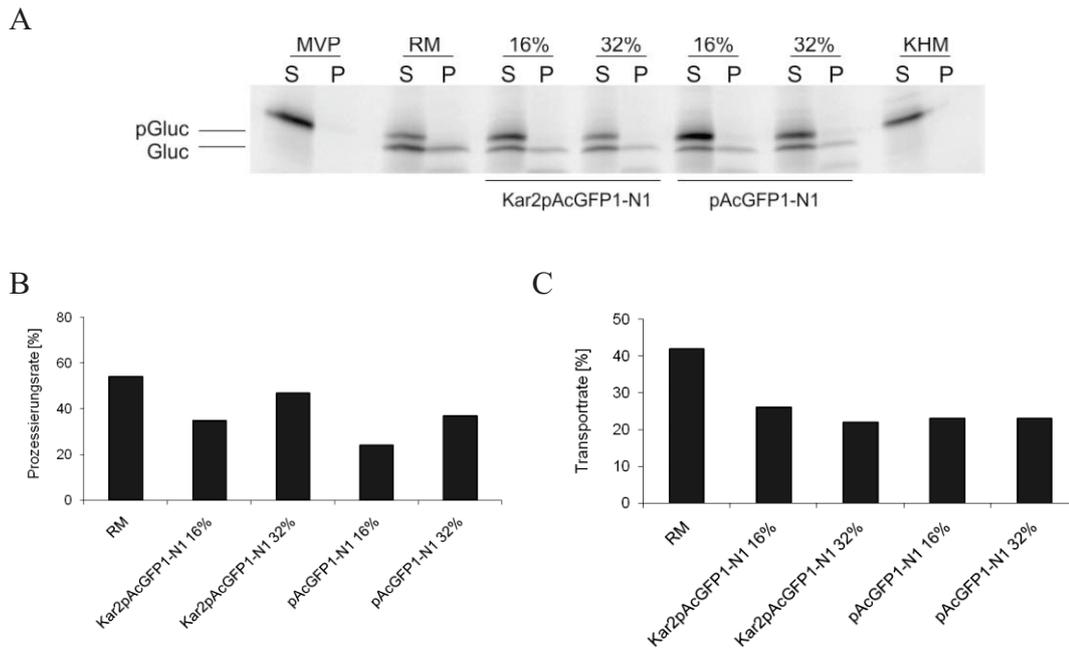
24 h nach Plasmidtransfektion wurden die Zellen nach dem unter Punkt 3.2.8.1 beschriebenen Verfahren permeabilisiert. Nach *in vitro* Synthese von ppL und pGluc wurde zur Quantifizierung der Transporteffizienz die Methode der Sequestrierung angewandt (*Abb. 4.23 & 4.24*). Zur Kontrolle wurden die Pufferkontrollen (KHM und MVP) sowie ein Ansatz mit RMs mitgeführt.

Aus *Abb. 4.23 A* geht hervor, dass ppL sowohl in den Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierten als auch in den Kontrollzellen zu pL prozessiert und somit importiert wurde. Das Balkendiagramm mit den Prozessierungsdaten verdeutlicht, dass zwischen den Kar2 pAcGFP1-N1 Plasmid transfizierten Zellen und den Kontrollzellen nur geringfügige Abweichungen detektiert wurden. Die Berechnung der Transporteffizienz zeigte in den Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierten Zellen eine im Vergleich zu den Kontrollzellen etwa 5% höhere Effizienz. Die geringfügigen Unterschiede im Transportverhalten liegen im Rahmen der Fehlertoleranz und können auf den Einsatz leicht abweichender Mengen an Zell-ER zurückgeführt werden. Die Transportstudien mit der Luziferase pGluc zeigten ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede in der Prozessierungs- und Transporteffizienz von Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen (*Abb. 4.24*).



**Abb. 4.23: Transport von ppL in das ER von Kar2pAcGFP1-N1 transfizierten PC3-Zellen.**

Nachweis des Transportes von ppL in das ER Kar2pAcGFP1-N1 und pAcGFP1-N1 transfizierter PC3-Zellen. Aufgeführt ist als Beispiel das Ergebnis eines Versuches. **A:** ppL wurde mittels TNT-Lysat translatiert und durch Einbau von [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin radioaktiv markiert. Die Plasmid transfizierten PC3-Zellen wurden mit Digitonin [EK: 25  $\mu\text{g/ml}$ ] permeabilisiert. Für die Sequestrierung wurden je 5  $\mu\text{l}$  jedes Transportansatzes mit 5  $\mu\text{l}$  162,5 mM Saccharose (S), 0,34 mg/ml Proteinase K (P) und Proteinase K + Triton X-100 (0,2%) (PT) versetzt und 60 min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **B:** Bestimmung der Prozessierungsrate von ppL. Der Wert stellt den prozentualen Anteil der prozessierten Ketten im Saccharose-Ansatz (S) bezogen auf die Gesamtsynthesemenge von ppL und pL (S) dar. **C:** Bestimmung der Transporteffizienz von ppL. Der Wert entspricht dem prozentualen Anteil an geschütztem, reifem Prolaktin im Proteinase K-Ansatz (P) bezogen auf die prozessierten Ketten pL im Saccharose-Ansatz (S).



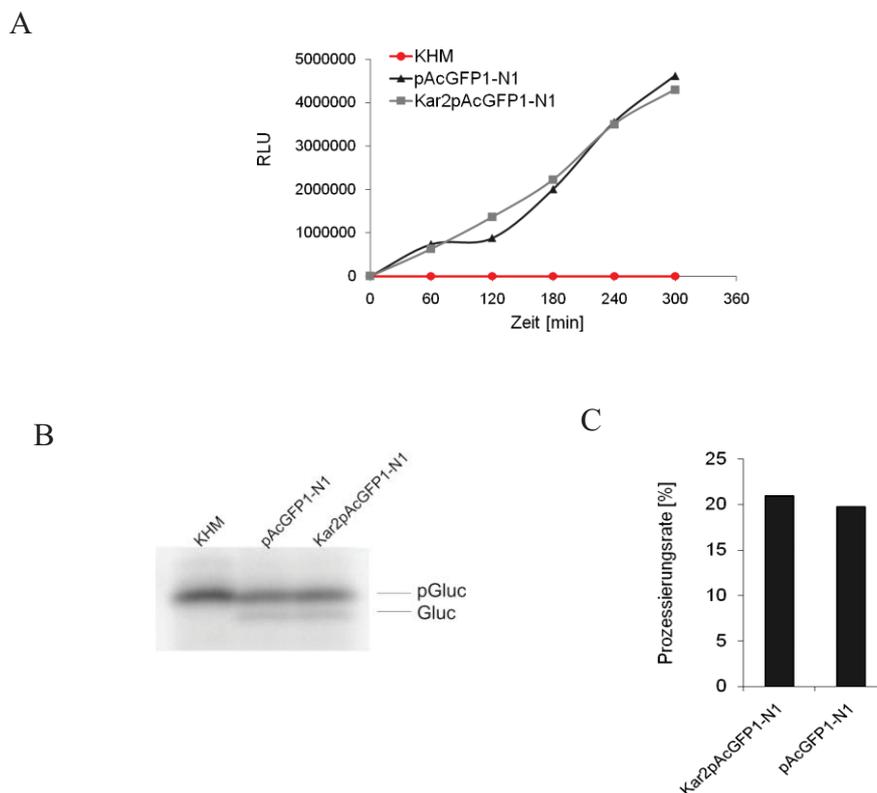
**Abb. 4.24: Transport von pGluc in das ER von Kar2pAcGFP1-N1 transfizierten PC3-Zellen.**

Nachweis des Transportes von pGluc in das ER Kar2pAcGFP1-N1 und pAcGFP1-N1 transfizierter PC3-Zellen. Aufgeführt ist als Beispiel das Ergebnis eines Versuches. **A:** pGluc wurde mittels TNT-Lysat translatiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Plasmid transfizierten PC3-Zellen wurden mit Digitonin [EK: 25 µg/ml] permeabilisiert. Für die Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Transportansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S) und 0,34 mg/ml Proteinase K (P) versetzt und 60 min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 15% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **B:** Bestimmung der Prozessierungsrate von pGluc. Der Wert stellt den prozentualen Anteil der prozessierten Ketten im Saccharose-Ansatz (S) bezogen auf die Gesamtsynthesemenge von pGluc dar. **C:** Bestimmung der Transporteffizienz. Der Wert entspricht dem prozentualen Anteil an geschütztem, reifem pGluc im Proteinase K-Ansatz (P) bezogen auf die prozessierten Ketten im Saccharose-Ansatz (S).

Parallel zum Transportversuch mit ppL wurde die Effizienz des Transportes in *KAR2* exprimierenden Zellen und Kontrollzellen anhand der Faltung der *Gaussia* Luziferase pGluc untersucht (Abb. 4.25).

Der Nachweis der Lumineszenz von pGluc erfolgte nach *in vitro* Translation in Anwesenheit von Zell-ER Plasmid-transfizierter Zellen mit Hilfe des *Gaussia* Luziferase Assay Kits von BioLabs. Zur Kontrolle des Importes wurde zusätzlich ein Ansatz mit radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]-Methionin mitgeführt. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte über einen Zeitraum von 5 h anhand der Biolumineszenz im Luminometer. Um die Hintergrund-Lumineszenz zu bestimmen, wurde parallel eine Pufferkontrolle (KHM) mitgeführt. In Abb. 4.25 A ist die

Biolumineszenz und somit die Aktivität der Luziferase der Plasmid-transfizierten PC3-Zellen dargestellt. Hierbei ist erkennbar, dass die Lumineszenz in den mit dem Leervektor transfizierten Zellen gegenüber der der Kar2 pAcGFP1-N1 transfizierten Zellen keine wesentlichen Unterschiede aufwies. Die Prozessierungsrate aus dem radioaktiv markierten Kontrollansatz zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen (Abb. 4.25 B & C).



**Abb. 4.25: Bestimmung der Aktivität der Luziferase pGluc in Kar2pAcGFP1-N1 transfizierten PC3-Zellen.**

Nachweis der Luziferase-Aktivität von pGluc in Kar2pAcGFP1-N1 und pAcGFP1-N1 transfizierten PC3-Zellen. **A:** Zum Nachweis der Biolumineszenz von pGluc wurde der *Gaussia* Luziferase Assay Kit (Biolabs) verwendet. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte über einen Zeitraum von 5 h über die Biolumineszenz im Luminometer. Um die Hintergrund-Lumineszenz zu bestimmen, wurde parallel eine Pufferkontrolle (KHM) mitgeführt. **B:** Zum Nachweis des Imports wurde parallel ein Translationsansatz unter Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin mitgeführt. Die Proben wurden anschließend in einem 15%igen SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **C:** Bestimmung der Prozessierungsrate von pGluc. Der Wert stellt den prozentualen Anteil der prozessierten Ketten bezogen auf die Gesamtsynthesemenge von pGluc dar.

Anhand der erhobenen Daten wurde gezeigt, dass Kar2p keinen Einfluss hinsichtlich des Transportes der Substratproteine ppL und pGluc in das ER von PC3-Zellen aufweist. Ein dominant-negativer Effekt bezüglich des Proteintransportes und der Faltung wurde somit in Säugerzellen nicht bestätigt.

### 4.3 Der Nukleotidaustauschfaktor Sil1

Sil1 ist ein Nukleotidaustauschfaktor des Endoplasmatischen Retikulums, welcher erstmals in Hefen identifiziert wurde (Tyson & Stirling 2000). Zusammen mit den Hsp40 Chaperonen und den molekularen Chaperonen der Hsp70-Proteinfamilie BiP und Grp170 bildet Sil1 ein funktionales Netzwerk (Zimmermann *et al.*, 2006; Weitzmann *et al.*, 2007; Zahedi *et al.*, 2009). Untersuchungen von Chung *et al.* (2002) haben gezeigt, dass Sil1 die ATPase-Aktivität von BiP stimuliert, indem es die Freisetzung von ADP begünstigt. Ein Funktionsverlust von Sil1 steht auch in unmittelbarem klinischem Bezug. So haben genetische Studien gezeigt, dass Mutationen im *SIL1*-Gen mit neurodegenerativen Erkrankungen (MSS-Syndrom bei Menschen bzw. „woozy“-Mäuse) assoziiert sind (Senderek *et al.*, 2005; Anttonen *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Die degenerierenden Purkinjezellen der „woozy“-Mäuse weisen im Zuge einer Mutation im *SIL1*-Gen Proteinaggregate im ER und im Zellkern auf (Zhao *et al.*, 2005). Dies könnte möglicherweise die Folge einer gestörten Proteintranslokation sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand Sil1 depletierter Zelllinien untersucht werden, zu welchen zellulären Folgen ein Verlust von funktionellem Sil1 führt sowie welche Rolle der Nukleotidaustauschfaktor beim Proteintransport in das ER spielt.

#### 4.3.1 Depletion von Sil1 mittels RNA-Interferenz

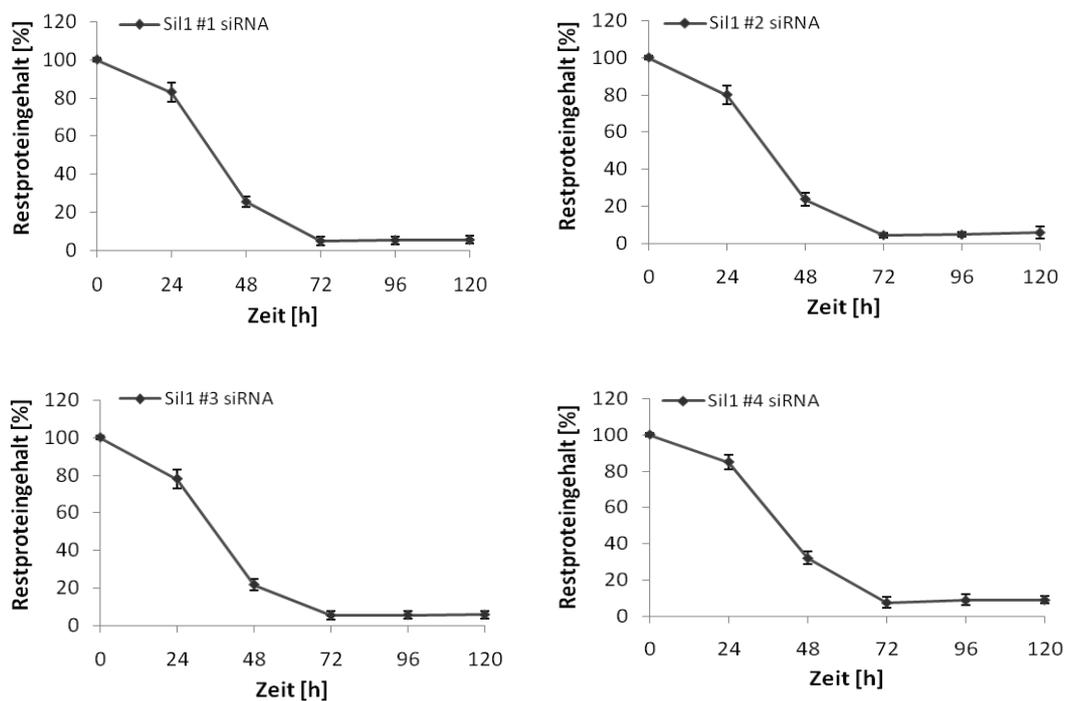
Zur Herstellung Sil1-depletierter Zelllinien wurden, um „off-target“ Effekte auszuschließen, verschiedene, im Folgenden als #1 bis #4 bezeichnete, siRNAs verwendet. Die siRNAs wurden in HeLa-Zellen auf ihre Wirksamkeit hin überprüft, wobei auch die einzusetzenden Konzentrationen sowie die Transfektionsbedingungen anhand von Vorversuchen optimiert wurden. Um den optimalen Zeitpunkt der Proteinreduktion festzustellen, wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet (Abb. 4.26). Relevante Homologien der benutzten siRNAs zu anderen Genen konnten durch Datenbankanalysen ausgeschlossen werden.

Das „Monitoring“ der Proteinreduktion erfolgte über gelelektrophoretische Auftrennung der Zellextrakte mittels SDS-PAGE und anschließender immunologischer Detektion über Western Blot-Analyse. Zur Auswertung wurden

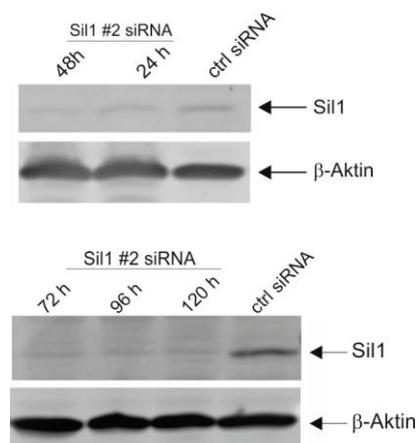
die Proteinbanden densitometrisch quantifiziert, der Proteingehalt des depletierten Proteins auf  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein normiert und anschließend in Verhältnis zu den parallel dazu mit ctrl siRNA transfizierten Kontrollzellen gesetzt.

In *Abb. 4.26* ist der grafische Verlauf der Restproteingehalte der transfizierten HeLa-Zellen 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach der Transfektion mit je 25 nM der verschiedenen siRNAs dargestellt. Die immunologische Detektion mittels Western Blot-Analyse erfolgte unter Verwendung eines anti-Sil1-Antikörpers. *Abb. 4.26* veranschaulicht, dass der zelluläre Proteingehalt von Sil1 mit allen vier siRNAs nahezu gleichermaßen reduziert werden konnte. Der in der Teilabbildung B als Beispiel aufgeführte Western Blot zeigt, dass die Sil1 spezifische Bande bei ca. 54 kDa in den Sil1 siRNA transfizierten Zellen deutlich gegenüber den Kontrollzellen reduziert war. Eine Quantifizierung der erhobenen Daten ergab, dass 72 h nach Transfektion das Minimum mit weniger als 10% an Sil1 erreicht wurde (*Abb. 4.26 A*). Bis 120 h nach Transfektion war kein Anstieg der Menge an Sil1 zu beobachten. Um die auf Proteinebene gezeigte Depletion auch auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde die Menge an zellulärer Sil1-mRNA nach siRNA-Transfektion über eine RT-PCR bestimmt. Auf Grund der vergleichbaren Effektivität der verwendeten siRNAs wurde der Versuch mit Sil1 #2 siRNA durchgeführt. Hierfür wurde zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“ die Gesamt-RNA sowohl aus den Sil1 siRNA- als auch aus den ctrl siRNA transfizierten Zellen isoliert. Gemäß der im Protokoll 3.2.11 beschriebenen RT-PCR wurde die Menge an Sil1-mRNA in einer anschließenden Gelanalyse bestimmt. Zur Quantifizierung wurde der Gehalt der mRNA von Sil1 sowohl der ctrl- als auch der Sil1 #2 siRNA transfizierten Zellen auf die mRNA der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin normiert und schließlich in Verhältnis zur Sil1-mRNA der Kontrollzellen gesetzt. *Abb. 4.26 C* veranschaulicht, dass nach 72 h in den Sil1 siRNA transfizierten Zellen das Amplifikat deutlich gegenüber dem der Kontrollzellen reduziert war. Die quantitative Berechnung ergab einen verbleibenden mRNA Gehalt von ca. 4%. Dies korreliert mit dem aus der Western Blot-Analyse erzielten Restproteingehalt von weniger als 5%.

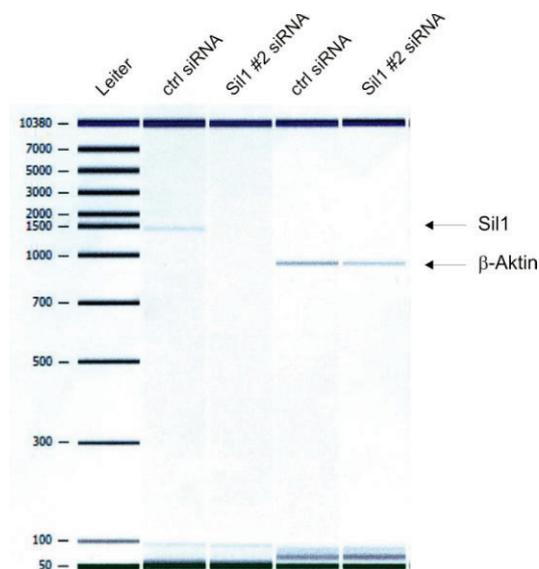
A



B



C



**Abb. 4.26: Nachweis der Depletion von Sil1 in HeLa-Zellen mittels Western Blot-Analyse und RT-PCR.**

A: Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden mit 25 nM Sil1 #1 siRNA, Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA, Sil1 #4 siRNA und ctrl siRNA transfiziert (siehe Punkt 3.2.9.4.4). Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE und Western Blot mittels primärem anti-Sil1-Antikörper (1:500) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit-Antikörper (1:1250) analysiert. Zur quantitativen Erfassung des Restproteingehaltes wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin) normiert und in Verhältnis zu denen der parallel mitgeführten Kontrollzellen gesetzt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus mehreren Versuchsreihen

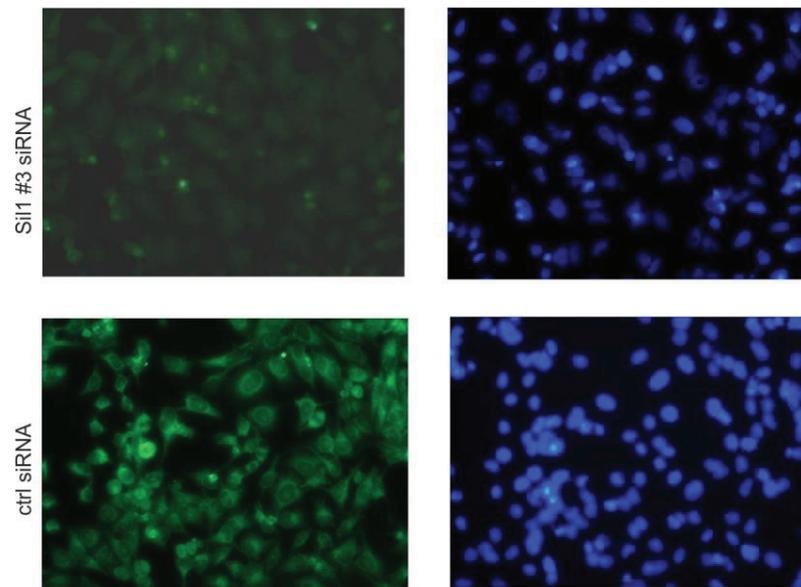
(n=5). **B:** Western Blot-Analyse Sil1 #2 siRNA transfizierter Zellen. Die immunologische Detektion erfolgte mittels primären anti-Sil1-Antikörpers (1:500) und sekundären cy5-konjugierten anti-rabbit-Antikörpers (1:1250). Als Bezugspunkt dienten ctrl siRNA transfizierte Zellen. **C:** RT-PCR: 72 h nach Transfektion von HeLa-Zellen mit Sil1 #2 siRNA und ctrl siRNA wurde die Gesamt-RNA isoliert, mit spezifischen Sil1 und  $\beta$ -Aktin Primer in cDNA umgeschrieben und über PCR amplifiziert. Die erhaltenen Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

Anhand der „silencing“-Experimente wurde gezeigt, dass Sil1 effektiv in HeLa-Zellen depletiert wurde, wobei der optimale Restproteingehalt nach 72 h erreicht wurde.

#### 4.3.1.1 Nachweis der Depletion von Sil1 mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die mittels Western Blot-Analyse und RT-PCR gezeigte Reduktion der zellulären Menge an Sil1 wurde im Folgenden in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Eine Proteinfärbung unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen das Zielprotein führt in Abhängigkeit der Reduktion des Proteingehaltes zu einer verminderten Fluoreszenzintensität bis hin zu einem vollständigen Erlöschen des Signals.

Zur Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen gemäß Punkt 3.2.6 auf Glasplättchen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit Sil1 #3 siRNA transfiziert. Zum Zeitpunkt des optimalen „Silencing“, 72 h nach Transfektion, wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert, mit anti-Sil1-Antikörper und sekundärem FITC-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop unter gleichen Belichtungszeiten visualisiert (*Abb. 4.27*). Parallel dazu wurden ctrl siRNA transfizierte Zellen mitgeführt und ein Teil der Zellen zur Überprüfung des Restproteingehaltes im Western Blot analysiert. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbung in *Abb. 4.27* lassen bei den Sil1 depletierten Zellen bei einem Restproteingehalt von < 10% eine deutliche Reduktion in der Fluoreszenzintensität gegenüber den Kontrollzellen erkennen. Das gleiche Ergebnis wurde nach Transfektion der Zellen mit Sil1 #2 siRNA erzielt (Daten nicht aufgeführt).



**Abb. 4.27: Nachweis der Sil1 Depletion durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.**

Jeweils  $0,9 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden auf Glasplättchen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 25 nM Sil1 #3 siRNA und ctrl siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd fixiert und mit primärem anti-Sil1-Antikörper (1:500) und sekundärem FITC-gekoppelten anti-rabbit-Antikörper (1:1000) inkubiert. Die Detektion erfolgt unter gleichen Belichtungszeiten bei einer 200-fachen Vergrößerung. Die gezeigten Bildausschnitte sind repräsentativ für das gesamte Präparat.

Die mittels RNA-Interferenz über Western Blot-Analyse und auf mRNA Ebene durch RT-PCR erzielte Depletion von Sil1 ließ sich über eine Immunfluoreszenz-Färbung intakter Zellen anhand der deutlichen Reduktion der Fluoreszenzintensität bestätigen. Darüber hinaus zeigten diese Befunde, dass der verwendete Antikörper natives Sil1 detektiert.

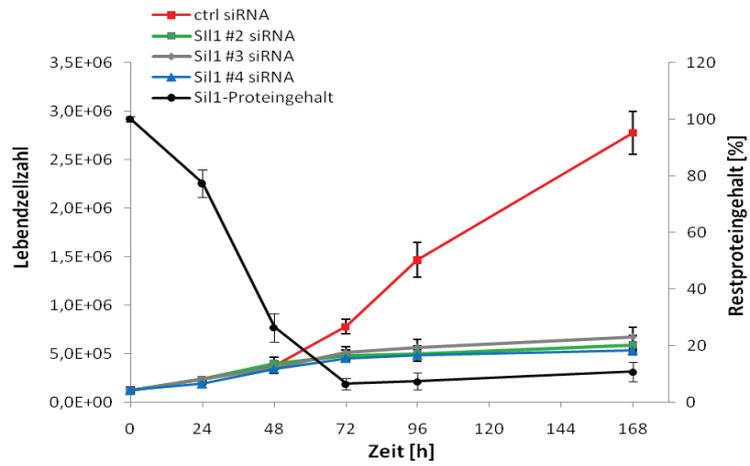
#### 4.3.2 Zellspezifische Folgen des Ausfalls von Sil1

Ein Verlust von Sil1 ist weder beim Menschen noch bei der Maus letal, vielmehr führt es zu einem scharf begrenzten Muster der Organschädigung. Hierbei hat sich gezeigt, dass ein Defizit von funktionellem Sil1 zu einer Degeneration der Purkinje-Zellen der Maus (Zhao, *et al.*, 2005) sowie unter anderem zu einer angeborenen Kleinhirnatrophie bei MSS-Patienten führt (Anttonen, *et al.*, 2005; Senderek, *et al.*, 2005). Diese Auswirkungen könnten mitunter die Folge einer gestörten Proliferation der Zellen sein. Im Folgenden wurde anhand verschiedener Assays untersucht, inwiefern sich ein Verlust von funktionellem Sil1 auf das Wachstumsverhalten und die Vitalität der Zellen auswirkt.

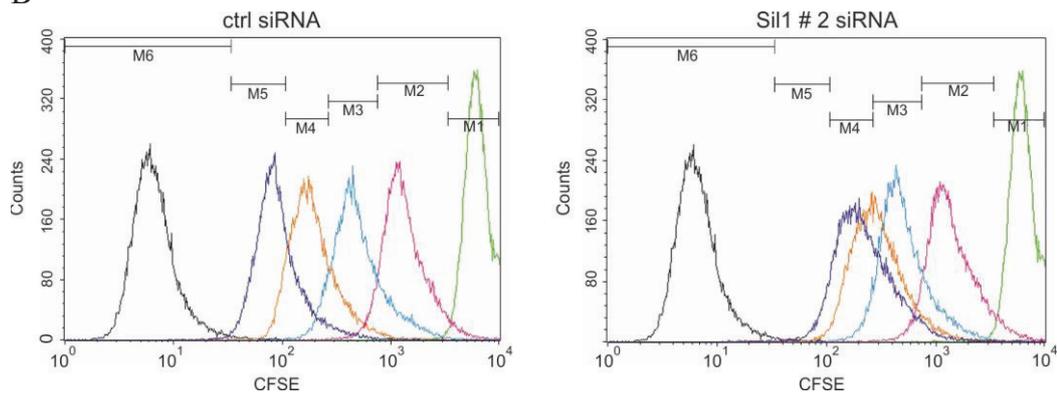
Hierzu wurden zum einen HeLa-Zellen mit den verschiedenen siRNAs gegen die mRNA von Sill transfiziert. Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 168 h wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl durch Auszählen der lebenden Zellen mittels Neubauerkammer bestimmt. Parallel wurden ctrl siRNA transfizierte Zellen mitgeführt. *Abb. 4.28 A* zeigt grafisch den Verlauf der Zellzahlen Sill depletierter Zellen und Kontrollzellen, sowie den Restproteingehalt an Sill bezogen auf den der Kontrollzellen in Abhängigkeit der Zeit. Der Verlust von endogenem Sill führte in den Zellen unter Verwendung aller Sill siRNAs gegenüber den Kontrollzellen zu einer deutlichen Reduktion des Zellwachstums. Bis 48 h nach Transfektion und einem ermittelten Restproteingehalt von etwa 20% bis 30% war kein Unterschied zwischen den depletierten Zellen und den Kontrollzellen erkennbar. Nach 72 h und einem Gehalt an Sill von weniger als 10% stieg die Zellzahl nur leicht an, während sie bis 96 h bei etwa gleichem Restproteingehalt nahezu konstant blieb. Nach 168 h war ein leichter Anstieg sowohl des Restproteingehaltes als auch der Zellzahlen Sill depletierter Zellen erkennbar. Bei den Kontrollzellen wurde währenddessen ein deutlicher Anstieg der Zellzahl gemessen. Parallel wurde der Einfluss von Sill hinsichtlich der Zellproliferation anhand der CFSE-Färbung untersucht (*Abb. 4.28 B & C*). Dazu wurden die HeLa-Zellen mit 5  $\mu$ M CFSE wie unter Punkt 3.2.9.5.4.1 beschrieben, gefärbt und mit Sill siRNA sowie ctrl siRNA transfiziert. Parallel wurden ungefärbte Zellen mitgeführt. 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 144 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Zellproliferation mittels FACS detektiert (*Abb. 4.28 B & C*). Der grüne Peak zeigt die Intensität der Färbung zum Zeitpunkt 0 h, der schwarze die ungefärbten Zellen. Die Messung der Kontrollzellen zeigte eine deutliche Abnahme der Intensität von CFSE bei zunehmender Zellteilung. Bis zu einem Zeitpunkt von 72 h nach Sill siRNA Transfektion und einer Reduktion des Proteinlevels auf ca. 10% wurden bei den Sill depletierten Zellen keine wesentlichen Unterschiede in der Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes gegenüber den Kontrollzellen detektiert. Von 72 h bis 96 h war dagegen keine Abnahme der intrazellulären CFSE-Konzentration detektiert worden, was impliziert, dass die Zellen in ihrer Teilung arretiert waren. Diese Beobachtung bestätigt den zwischen 72 h und 96 h in der Zellzahlbestimmung gezeigten Wachstumsarrest. Nach 144 h haben sich einige Zellen im Sill

depletierten Ansatz wieder geteilt, was an der Abnahme der Fluoreszenzintensität von CFSE erkennbar ist (Abb. 4.28 C).

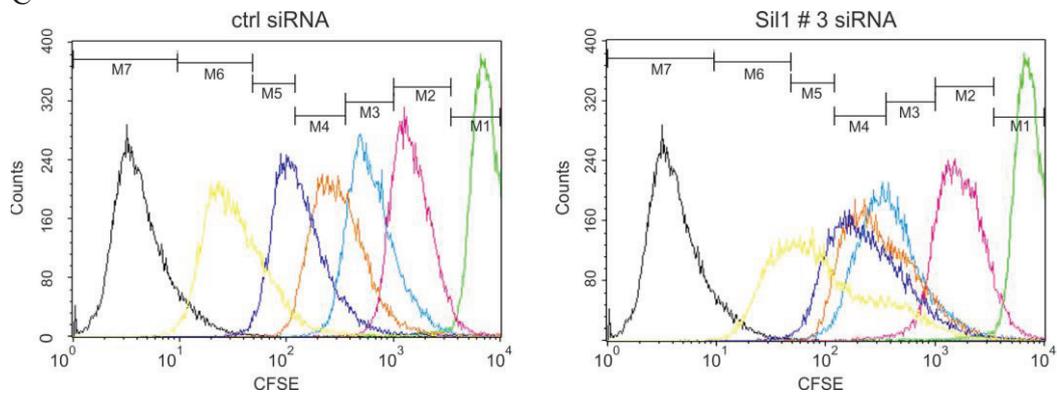
A

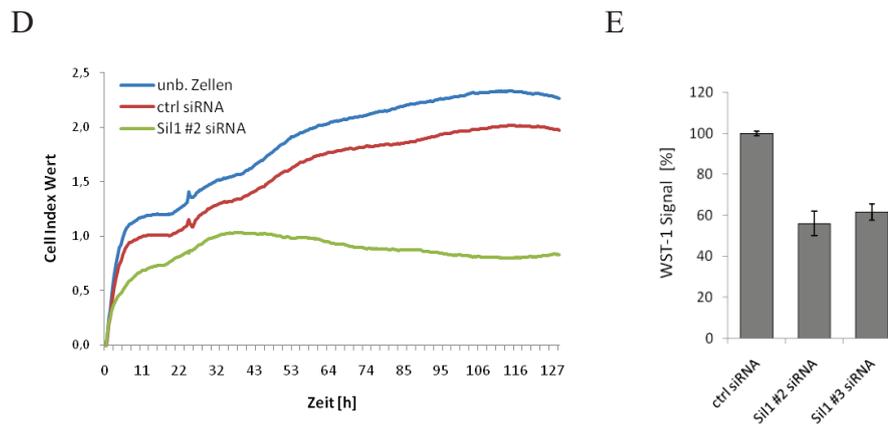


B



C





**Abb. 4.28: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten Sil1 depletierter HeLa-Zellen.**

**A:** Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 25 nM Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA, Sil1 #4 siRNA und ctrl siRNA transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 168 h geerntet und die Zellzahlen durch Auszählen mittels Neubauerkammer bestimmt (n=3). **B:** CFSE-Färbung Sil1 #2 siRNA und ctrl siRNA transfizierter HeLa-Zellen. 0 h (grün), 24 h (pink), 48 h (hellblau), 72 h (orange) und 96 h (dunkelblau) nach siRNA Transfektion und Färbung mit 5  $\mu$ M CFSE wurden die Zellen geerntet und im FACS analysiert. Schwarz sind die ungefärbten Zellen dargestellt. **C:** CFSE-Färbung Sil1 #3 siRNA und ctrl siRNA transfizierter HeLa-Zellen. 0 h (grün), 24 h (pink), 48 h (hellblau), 72 h (orange) 96 h (dunkelblau) und 144 h (gelb) nach siRNA-Transfektion und Färbung mit 5  $\mu$ M CFSE wurden die Zellen geerntet und im FACS analysiert. Der zum 48 h Zeitpunkt gegenüber den Kontrollzellen leicht nach links gedriftete Peak entstand durch eine zeitlich verzögerte Messung, wodurch sich die Zellen gegenüber den Kontrollzellen bereits ein weiteres Mal geteilt haben. **D:** Messung der Zellaktivität mittels xCeLLigence. Je  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden mit jeweils 25 nM Sil1 #2 siRNA und ctrl siRNA transfiziert. Nach 20 h wurden die Zellen trypsinisiert und zu je 7.500 Zellen in eine E-Plate 96 ausgesät. Parallel wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Messung des Proliferationsverhaltens erfolgte im xCeLLigence über einen Zeitraum von 130 h. **E:** WST-Assay Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierter HeLa-Zellen. Nach 72 h wurden die Zellen mit je 10% WST-1 Reagenz über 15 min. und 30 min. inkubiert und die Farbumsetzung im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen. Zur Erfassung der Vitalität wurde das WST-1 Signal der depletierten Zellen in Bezug zu dem der Kontrollzellen gegen die Zeit dargestellt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Parallel wurde die Zellvitalität Sil1 depletierter Zellen anhand des Real-Time Cell Analyzer Systems xCeLLigence von Roche Applied Science bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung des elektrischen Widerstandes zwischen Elektroden, welche auf dem Boden von Mikrotiterplatten fixiert sind. Setzen sich adhärenente Zellen darauf ab, verändert sich der elektrische Widerstand zwischen den Elektroden. Jede Veränderung im Zellstatus führt demnach zu messbaren Widerstandsänderungen. Verglichen mit Kontrollzellen können somit mögliche Unterschiede im Zellwachstum Sil1 depletierter Zellen gemessen werden. In dem in der *Abb. 4.28 D* gezeigten Experiment wurde der Cell Index Wert, welcher ein Maß für die Anzahl, die Ausbreitung und die Anheftung der

Zellen ist, von Sil1 depletierten Zellen, ctrl siRNA transfizierten sowie unbehandelten Zellen gemessen.

Auf Grund der zuvor beobachteten gleichen Wirkungsweise der verwendeten siRNAs wurde die Zellvitalitätsmessung mit der Sil1 #2 siRNA durchgeführt. 20 h nach siRNA Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und zu je 7.500 Zellen in eine 96-Well-Platte (E-Plate 96) ausgesät. Parallel wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Messung im xCELLigence erfolgte über einen Zeitraum von 130 h (*Abb. 4.28 D*). Aus *Abb. 4.28 D* ist erkennbar, dass in den ersten Stunden der Cell Index Wert bei allen Ansätzen anstieg, was auf ein erstes Anheften der Zellen zurückzuführen ist. Hierbei zeigten sich bei den Sil1 depletierten Zellen bereits deutliche Unterschiede gegenüber den Kontrollzellen. Während bei den Kontrollzellen in den ersten 13 Stunden ein Cell Index Wert von 0,98 erreicht wurde, stieg dieser bei den Sil1 depletierten Zellen nur auf 0,71 an. Im weiteren Verlauf zeigte sich sowohl bei den unbehandelten als auch bei den ctrl siRNA transfizierten Zellen ein deutlicher Anstieg im Kurvenverlauf, obgleich der der Kontrollzellen um einen Cell Index Wert von 0,27 Einheiten geringer verlief. Erst nach 117 h war ein leichter Rückgang des Cell Index Wertes erkennbar, was auf die zunehmende Konfluenz und des dadurch bedingten Ablösens einiger Zellen begründbar ist. Bei den Sil1 depletierten Zellen wurde bereits nach ca. 39 h bis 65 h ein leichter Abfall im Kurvenverlauf von einem Cell Index Wert von 0,98 auf ca. 0,85 gemessen. Im weiteren Verlauf verlief die Kurve nahezu konstant, während nach 130 h ein leichter Anstieg messbar war.

In einem weiteren vergleichbaren Versuchsansatz wurde die Vitalität der depletierten Zellen zusätzlich anhand des WST-1 Assays untersucht. Die Messung der Aktivität erfolgte zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“, 72 h nach Transfektion mit Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA sowie ctrl siRNA (*Abb. 4.28 E*). Zur Erfassung der Vitalität wurden die Signale der depletierten Zellen auf die der Kontrollzellen bezogen. In *Abb. 4.28 E* ist nach 72 h bei einem Restproteingehalt an Sil1 von < 10% eine deutliche Reduktion des WST-1 Signals um ca. 40% bis 45% erkennbar. Aufgrund der Eigenschaften des Assays kann dies eine Abnahme der Vitalität der Zellen signalisieren. Der Rückgang der Zellzahl Sil1 depletierter Zellen im Verhältnis zu den Kontrollzellen verhielt sich nach 72 h analog zur gezeigten Reduktion der im WST-Assay gemessenen Vitalität.

Anhand der angewandten Wachstums- und Vitalitäts-Assays wurde somit gezeigt, dass der Nukleotidaustauschfaktor essentiell für die Proliferation der Zellen ist.

#### 4.3.3 Einfluss der Depletion von Sil1 auf die Zellmorphologie

In den vorangegangenen Zellproliferationsstudien wurde gezeigt, dass ein Funktionsverlust von endogenem Sil1 zu einem Zellteilungsarrest führte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Depletion auch zellmorphologische Auswirkungen aufweist.

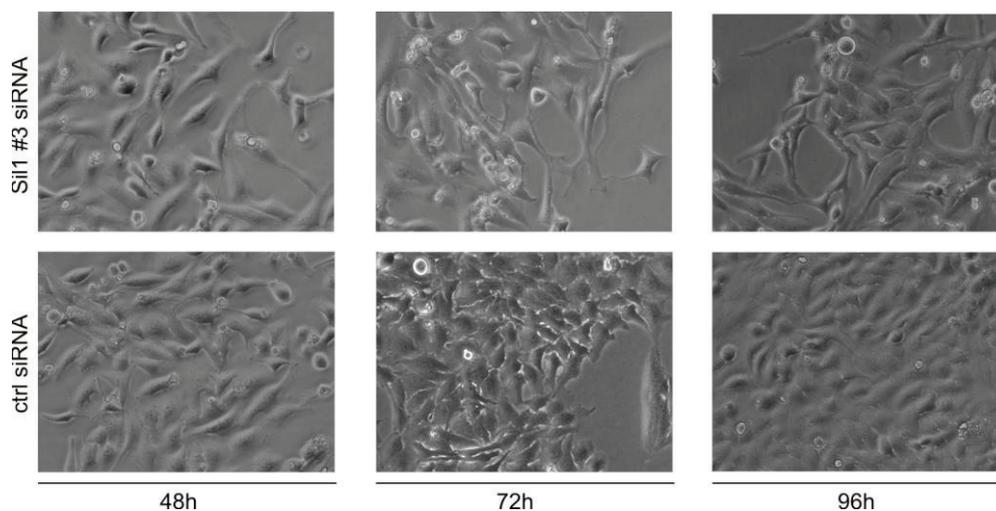
Zum Nachweis der Auswirkung des Verlustes von Sil1 hinsichtlich der Zellmorphologie, wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.9.4.4 beschrieben, transfiziert und die Morphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert. *Abb. 4.29* veranschaulicht, dass bis 48 h nach siRNA Transfektion und einem Restproteingehalt zwischen 25% und 30% keine morphologischen Unterschiede zwischen den Sil1 depletierten und den Kontrollzellen erkennbar waren. Ab 72 h nach Transfektion bei einem Gehalt an Sil1 von < 10% wiesen die Zellen gegenüber den Kontrollzellen eine eher langgezogene Morphologie mit dentritenförmigen Ausläufern auf, was mitunter die Folge der im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachteten geringeren Zelldichte sein könnte. Um zu prüfen, ob diese veränderte Morphologie der Sil1 depletierten Zellen durch die geringere Zelldichte und die fehlende Kontaktinhibition zustande kam oder ob dies eine zelluläre Reaktion infolge des Verlustes von Sil1 ist, wurde nachfolgend die Stabilität der Aktin-bindenden Proteine Ezrin, Radixin und Moesin untersucht.

Zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“, 72 h nach Transfektion, wurden hierzu die siRNA transfizierten Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte nach Western Blot-Analyse durch Inkubation mit primärem Ezrin/Radixin/Moesin-Antikörpergemisch und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit-Antikörper. In *Abb. 4.29 B* ist die Western Blot-Analyse dargestellt. Die Quantifizierungsdaten lassen erkennen, dass ein Verlust von endogenem Sil1 von mehr als 93% keine wesentlichen Unterschiede in der Stabilität von Ezrin, Radixin sowie Moesin gegenüber den Kontrollzellen zur Folge hatte (*Abb. 4.29 C*).

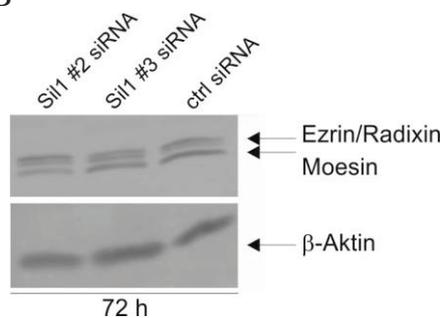
In der vorangegangenen Untersuchung wurde gezeigt, dass eine Depletion von Sil1 zu einer keinen Veränderungen innerhalb der Aktin-bindenden Proteine

der ERM-Familie führte. Um ferner zu überprüfen, ob ein Verlust von funktionellem Sil1 einen Einfluss auf die Morphologie des ER ausübt, wurde die Methode der ER-Tracker™ Blue-White DPX Färbung angewandt. 72 h und 96 h nach siRNA Transfektion wurden die Zellen nach Färbung mit 1 mM ER-Tracker™ Blue-White DPX (Punkt 3.2.9.5.5) unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem UV-Filter detektiert (*Abb. 4.29 D*). Die ER-Färbung in *Abb. 4.29 D* veranschaulicht, dass ein Verlust von endogenem Sil1 um mehr als 90% keinen Einfluss auf die Struktur des ER hat. Ein direkter Vergleich mit den Kontrollzellen lässt keine Unterschiede in der Morphologie des ER erkennen. Das gleiche Ergebnis wurde nach Transfektion der Zellen mit Sil1 #2 erzielt (Daten nicht aufgeführt). Demnach führt eine Reduktion von Sil1 innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 96 h zu keiner gestörten Morphologie des ER.

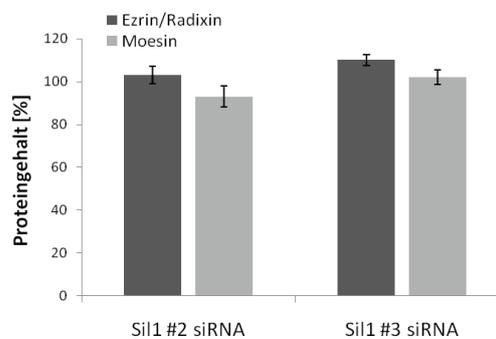
A



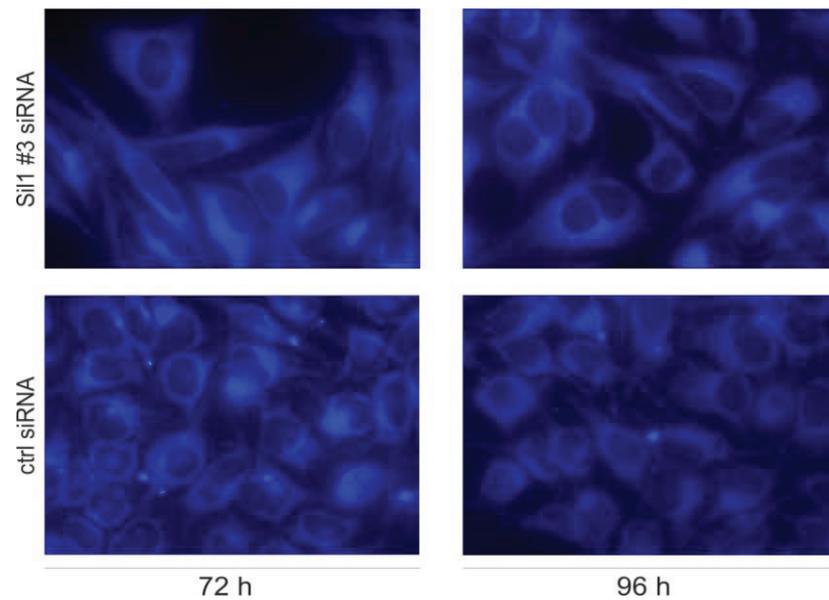
B



C



D



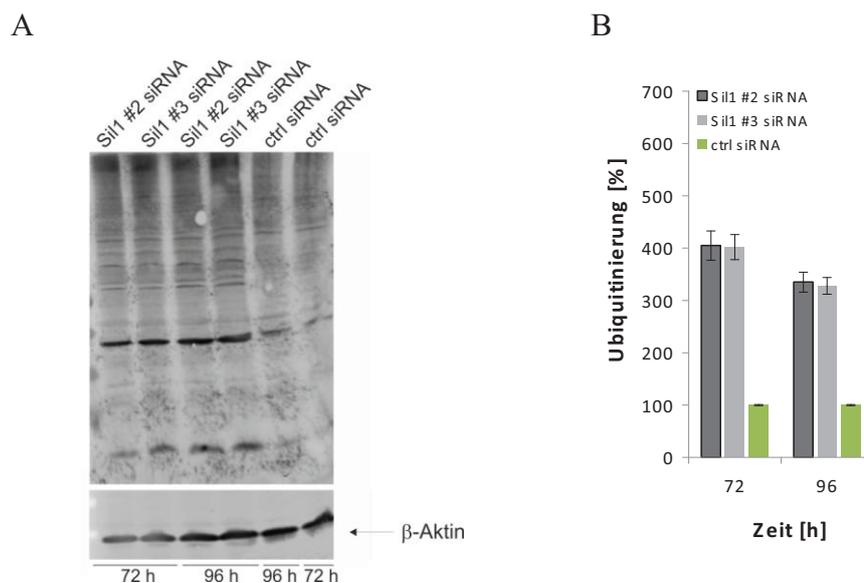
**Abb. 4.29: Morphologie Sil1 depletierter HeLa-Zellen.**

**A:** Phasenkontrastaufnahmen Sil1 #3 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierter HeLa-Zellen 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion bei 200-facher Vergrößerung. **B:** Nachweis von Ezrin/Radixin und Moesin in Sil1 depletierten HeLa-Zellen mittels Western Blot-Analyse. Je  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden mit 25 nM Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA und ctrl siRNA transfiziert, nach 72 h geerntet, lysiert und über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit primärem anti-Ezrin/Radixin/Moesin-Antikörpergemisch (1:750) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. **C:** Zur Quantifizierung wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle normiert und in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt ( $n=2$ ). **D:** ER-Tracker Färbung Sil1 depletierter HeLa-Zellen. Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 25 nM Sil1 #3 siRNA sowie ctrl siRNA transfiziert. 72 h und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 1 mM ER-Tracker™ Blue-White DPX über 30 min. bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 600-facher Vergrößerung detektiert.

Anhand der erhobenen Daten wurde gezeigt, dass ein Verlust des Nukleotidaustauschfaktors Sil1 zu keiner veränderten Morphologie der Zellen führt.

#### 4.3.4 Untersuchungen zur Akkumulation und Ubiquitinierung von Proteinen nach Depletion von Sil1

Bei Sil1 handelt es sich um einen Nukleotidaustauschfaktor des Hsp70 Chaperons BiP (Chung *et al.*, 2002). Ein Verlust von funktionellem Sil1 könnte mitunter zu einer gestörten Funktion von BiP führen, was infolge verminderter Proteinfaltungskapazität im ER oder einer gestörten Retrotranslokation eine Aggregation ungefalteter, missgefalteter sowie ubiquitinerter Proteine zur Folge haben könnte. Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Verlust von Sil1 zur Erhöhung ubiquitinerter Proteine und durch Überlastung an ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen zur Induktion der UPR führt. Zum Nachweis der Akkumulation ubiquitinerter Proteine wurden Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierte HeLa-Zellen nach 72 h und 96 h geerntet, lysiert und im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Western Blot Analyse erfolgte die immunologische Detektion mittels anti-Ubiquitin Antikörpers (Abb. 4.30). Aus Abb. 4.30 geht hervor, dass das Ubiquitinierungsmuster in den Sil1 depletierten Zellen bei einem Restproteingehalt von < 10% deutlich gegenüber dem der Kontrollzellen erhöht war. Nach 72 h stieg der Gehalt an ubiquitinerter Proteine um das Vierfache an, nach 96 h war der Gehalt noch um das ca. 3,4-Fache erhöht.

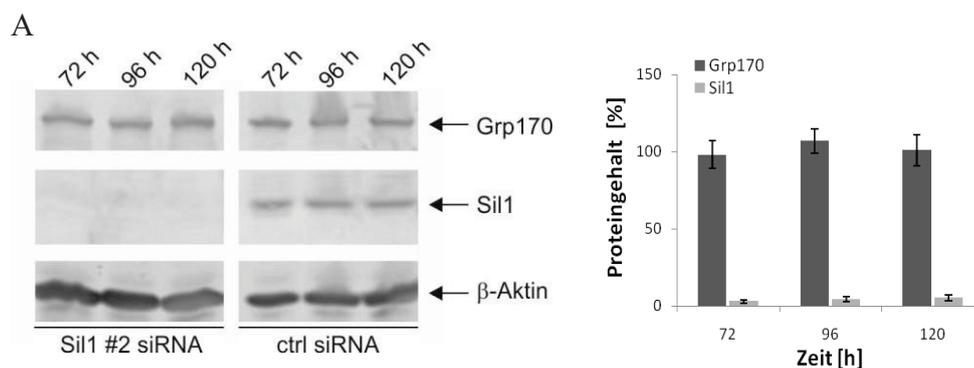


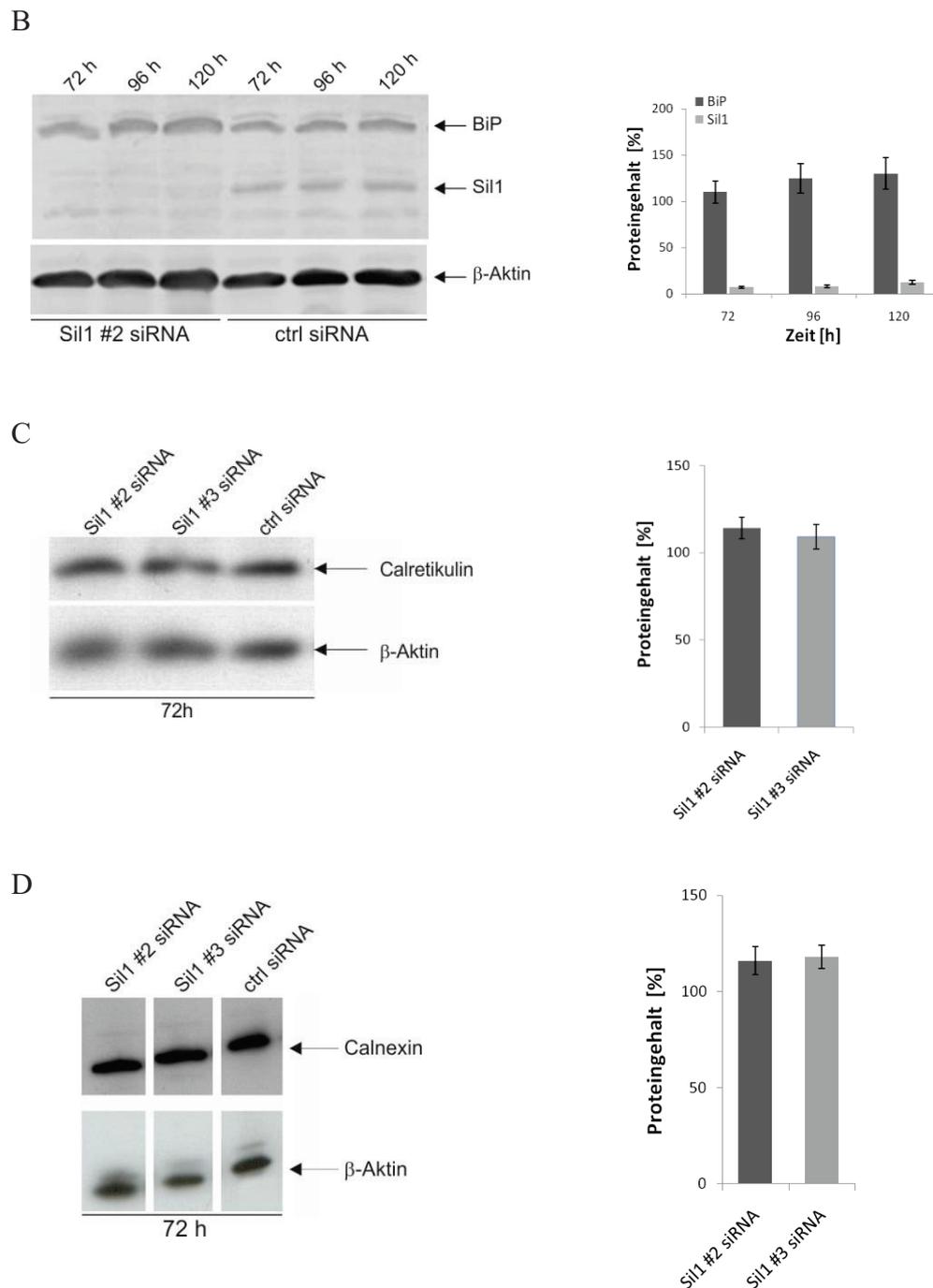
**Abb. 4.30: Ubiquitinierung nach Depletion von Sil1**

A: Die mit 25 nM Sil1 #2 siRNA, Sil1 #3 siRNA und ctrl siRNA transfizierten HeLa-Zellen wurden nach 72 h und 96 h geerntet, lysiert, über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel

aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit primärem anti-Ub-Antikörper (1:80) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. Hierzu wurde der Blot mit Antikörper (1:4000) und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1250) inkubiert. **B:** Zur Quantifizierung wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle normiert und in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt (n=2).

Die Überprüfung der UPR-Induktion erfolgte auf Proteinebene über den Nachweis der UPR-Markerproteine Grp170 und BiP. Hierfür wurden die mit Sil1#2 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierten HeLa-Zellen nach 72 h, 96 h und 120 h im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte nach Western Blot-Analyse durch Inkubation mit anti-Grp170 sowie anti-BiP Antikörper (*Abb. 4.31*). Die Western Blots in *Abb. 4.31* A und B veranschaulichen, dass nach Depletion von Sil1 kein wesentlicher Anstieg an Grp170 sowie BiP erkennbar war. Nach 96 h wurde eine Zunahme in der Synthese von BiP um das ca. 1,2- bis 1,3-Fache bestimmt. Die Menge an Grp170 stieg nur unwesentlich an. Das gleiche Ergebnis wurde nach Transfektion der Zellen mit Sil1 #3 siRNA sowie Sil1 #4 siRNA erzielt (Daten nicht aufgeführt). Parallel wurde zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“, 72 h nach Transfektion, bei einem Restproteingehalt von Sil1 von <10%, die Synthese der Lektine Calretikulin und Calnexin untersucht. Wie aus *Abb. 4.31* C hervorgeht, führte die Depletion von Sil1 verglichen mit den Kontrollzellen zu keinem wesentlich veränderten Proteingehalt an Calretikulin. Auch die Synthese von Calnexin war gegenüber den Kontrollzellen nur geringfügig um das ca. 1,1-Fache erhöht (*Abb. 4.31* D). Die Untersuchungen haben somit gezeigt, dass ein Verlust von endogenem Sil1 nur eine mäßige Induktion der Synthese von BiP und keine Erhöhung der Bildung von Grp170, Calnexin und Calretikulin bewirkte, wodurch sich keine eindeutigen Hinweise auf eine Induktion der UPR ergaben.





**Abb. 4.31: Gehalt an Grp170, BiP, Calretikulin und Calnexin in Sil1 depletierten Zellen**

Die mit 25 nM Sil1 #2 siRNA und ctrl siRNA transfizierten HeLa-Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, lysiert, über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Diagramme zeigen die Quantifizierungsdaten. **A:** Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an Grp170 72 h, 96 h und 120 h nach Depletion von Sil1 mittels primärem anti-Grp170-Antikörper (1:800) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. Hierzu wurde der Blot mit primärem anti  $\beta$ -Aktin Antikörper (1:4000) und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1250) inkubiert. **B:** Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an BiP 72 h, 96 h und 120 h nach Sil1 #2 siRNA Transfektion mittels primärem anti-BiP-Antikörper (1:300) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250).

C: Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an Calretikulin 72 h nach Sil1 #2 siRNA sowie Sil1 #3 siRNA Transfektion mittels primärem anti-Calretikulin-Antikörper (1:1000) und sekundärem Peroxidase-gekoppelten anti-rabbit Antikörper (1:1000). D: Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an Calnexin 72 h nach Sil1 #2 siRNA sowie Sil1 #3 siRNA Transfektion mittels primärem anti-Calnexin-Antikörper (1:1000) und sekundärem Peroxidase-gekoppelten anti-rabbit Antikörper (1:1000).

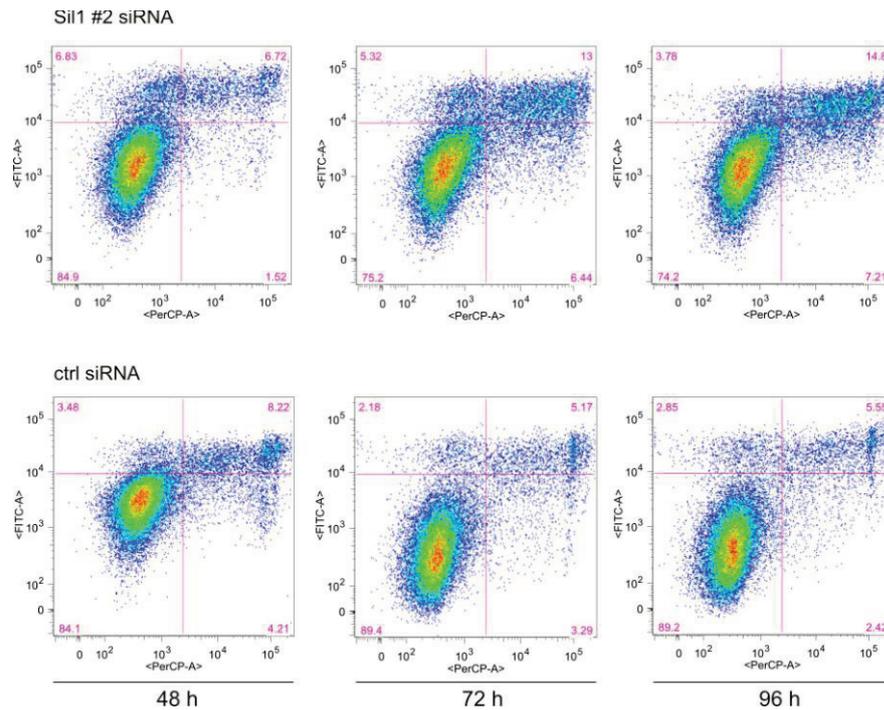
In einem vergleichbaren Versuchsansatz wurde ferner überprüft, ob die Zellen nach Zugabe von 0,5 µg/ml Tunicamycin durch die Depletion von Sil1 sensitiver werden und zu einer veränderten Stressantwort führen. 48 h, 72 h und 96 h nach siRNA Transfektion wurden hierzu die Zellen geerntet und die Zellzahlen der Tunicamycin-behandelten Zellen mit denen der nicht mit dem Stressor versetzten Zellen verglichen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zugabe von Tunicamycin zu keinem veränderten Wachstumsverhalten der Zellen führte (Daten nicht aufgeführt). Anhand der erhobenen Daten konnte somit keine veränderte Stressantwort der Zellen nach Verlust von funktionellem Sil1 belegt werden.

#### 4.3.5 Untersuchungen zur Induktion der Apoptose und Nekrose nach Sil1 Depletion

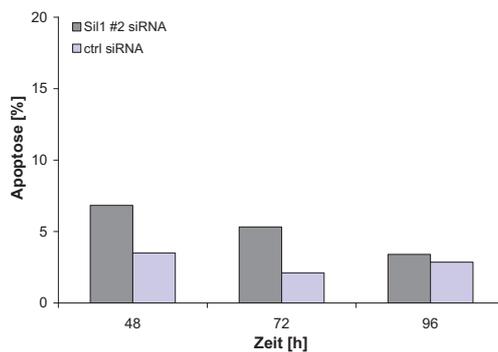
Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Verlust von Sil1 möglicherweise zur Induktion der Apoptose oder Nekrose führt. Hierfür wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach siRNA Transfektion mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid gefärbt und anschließend im FACS analysiert (Abb. 4.32 A). Aus Abb. 4.32 A bis C wird deutlich, dass bei den Sil1 depletierten Zellen ab 72 h bei einem Restproteingehalt von <10% gegenüber den Kontrollzellen ca. 3% mehr Annexin V positive und Propidiumiodid negative Zellen vorhanden waren, während der Anteil an Annexin V und Propidiumiodid positiven Zellen um ca. 8% bis 10% zunahm. Dies besagt, dass nach Depletion von Sil1 die Zellen vermehrt in Nekrose gingen. Eine Induktion der Apoptose wurde somit nicht bewiesen.

Parallel wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) zum Nachweis der Nekrose anhand des Cytotoxicity Detection Kits gemessen (Abb. 4.32 D). Gegenüber den Kontrollzellen war in den Sil1 depletierten Zellen die Aktivität von LDH und somit der Anteil an nekrotischen Zellen leicht erhöht.

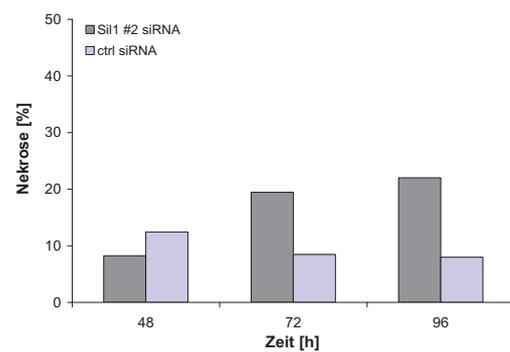
A



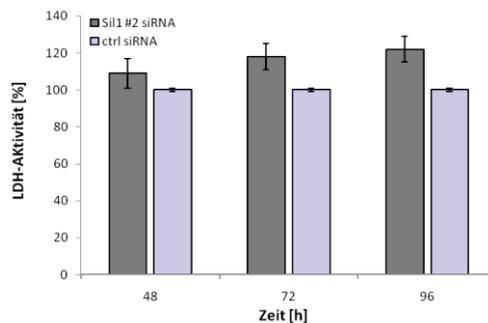
B



C



D



**Abb. 4.32: Nachweis von Apoptose und Nekrose nach Sil1 Depletion in HeLa-Zellen mittels Annexin V Markierung und LDH-Assay**

HeLa-Zellen wurden mit je 25 nM Sil1 #2 siRNA und ctrl siRNA transfiziert. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen geerntet, mit FITC-konjugiertem Annexin V und Propidiumiodid über 15 min gefärbt (Punkt 3.2.9.5.4.2) und die Färbung mittels FACS detektiert. **A:** FACS-Messung der siRNA transfizierten HeLa-Zellen. Auf der x-Achse ist der Kanal für Propidiumiodid, auf der

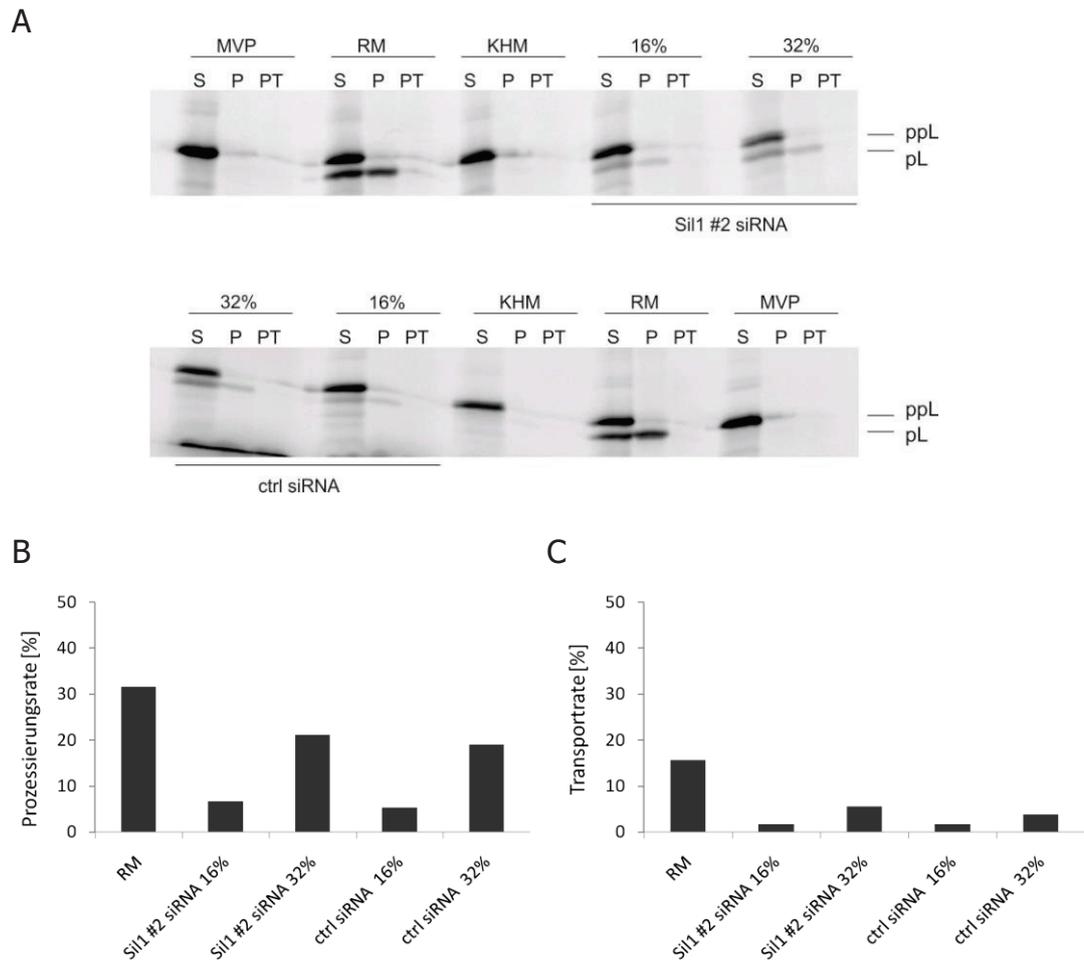
y-Achse der für das FITC-konjugierte Annexin V dargestellt. **B:** Grafische Darstellung der Apoptoserate der transfizierten Zellen. **C:** Grafische Darstellung der Nekroserate der transfizierten Zellen. **D:** LDH-Assay. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurde im zellfreien Überstand die Aktivität der LDH durch Umsetzung von Jodtetrozolchlorid (INT) zu Formazan durch Messung der Absorption bei 490 nm photometrisch bestimmt. In der Grafik wurde die Aktivität von LDH in Bezug auf die der ctrl siRNA transfizierten Zellen dargestellt (n=2).

Anhand der erhobenen Daten wurde gezeigt, dass die Zellen nach Verlust von Sil1 nicht in Apoptose gingen, womit das in der Zellwachstumsanalyse gezeigte Verhalten insofern bestätigt wird, als dass keine Reduktion der Zellzahl nachgewiesen werden konnte.

#### 4.3.6 Untersuchungen zum Einfluss der Depletion von Sil1 auf den Proteintransport

Im Folgenden wurde der Effekt des Verlustes von Sil1 auf den co-translationalen Proteinimport in das ER von Säugerzellen über *in vitro* Synthese von Substratproteinen und anschließender Quantifizierung der Transporteffizienz in Sil1 depletierten HeLa-Zellen anhand der Methode der Sequestrierung untersucht (3.2.8.2). Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Sil1 #2 siRNA und ctrl siRNA, wie unter Punkt 3.2.9.4.4 beschrieben, transfiziert. Zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“ wurde Zell-ER präpariert (3.2.8.1). Dieses wurde zu einem *in vitro*-Translationsansatz gegeben, in dem das Substratprotein ppL synthetisiert wurde. Anschließend wurde die Methode der Sequestrierung angewandt.

*Abb. 4.33* zeigt den Transportversuch von ppL in das Zell-ER Sil1-depletierter HeLa- sowie Kontrollzellen 72 h nach siRNA Transfektion bei einem Restproteingehalt an Sil1 von < 10%. Als Pufferkontrolle wurde ein Ansatz mit KHM anstelle des Zell-ERs mitgeführt, in dem kein Transport und somit auch keine Prozessierung zu sehen war. Bezüglich der Prozessierungs- und Transportrate von ppL in das Zell-ER Sil1 depletierter Zellen versus Kontrollzellen ergaben sich nur geringfügige Unterschiede (*Abb. 4.33 B & C*). Die Prozessierungsrate von ppL zeigte in den depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Unterschiede (*Abb. 4.33 B*). In der Transporteffizienz wurde in den Sil1 depletierten Zellen eine minimale Steigerung von ca. 3% gegenüber den Kontrollzellen gemessen (*Abb. 4.33 C*).



**Abb. 4.33: Transport von ppL in Si11 depletierte HeLa-Zellen.**

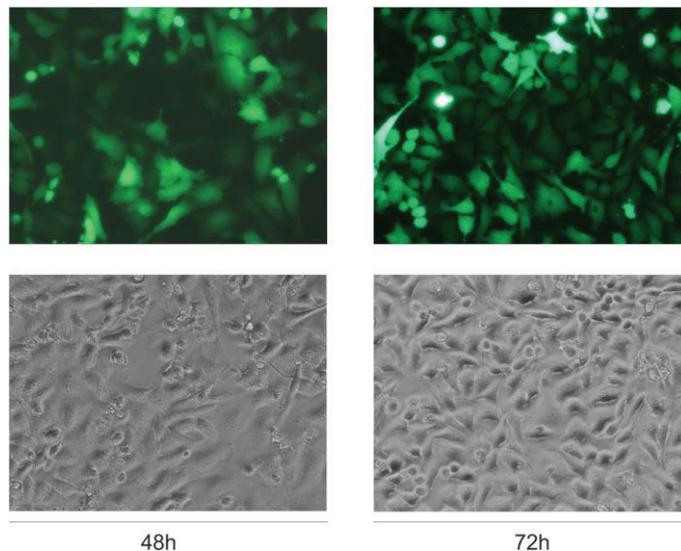
Nachweis des Transportes von ppL in das ER Si11 depletierter HeLa- und Kontrollzellen. **A:** ppL wurde mittels TNT-Lysat synthetisiert und durch Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Si11 #2 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden mit Digitonin [EK: 25 µg/ml] permeabilisiert. Für die Sequestrierung wurden je 5 µl jedes Transportansatzes mit 5 µl 162,5 mM Saccharose (S), 0,34 mg/ml Proteinase K (P) und Proteinase K + Triton X-100 (0,2%) (PT) versetzt und 60 min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 11,5 mM) und Inkubation für 5 min. auf Eis gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf ein 12,5% SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Phosphorimaging. **B:** Bestimmung der Prozessierungsrate von ppL. Der Wert stellt den prozentualen Anteil der prozessierten Ketten im Saccharose-Ansatz (S) bezogen auf die Gesamtsynthesemenge von ppL und pL (S) dar. **C:** Bestimmung der Transporteffizienz von ppL in das ER Si11 depletierter HeLa- und Kontrollzellen. Der Wert entspricht dem prozentualen Anteil an geschütztem, reifem Prolaktin im Proteinase K-Ansatz (P) bezogen auf die prozessierten Ketten pL im Saccharose-Ansatz (S).

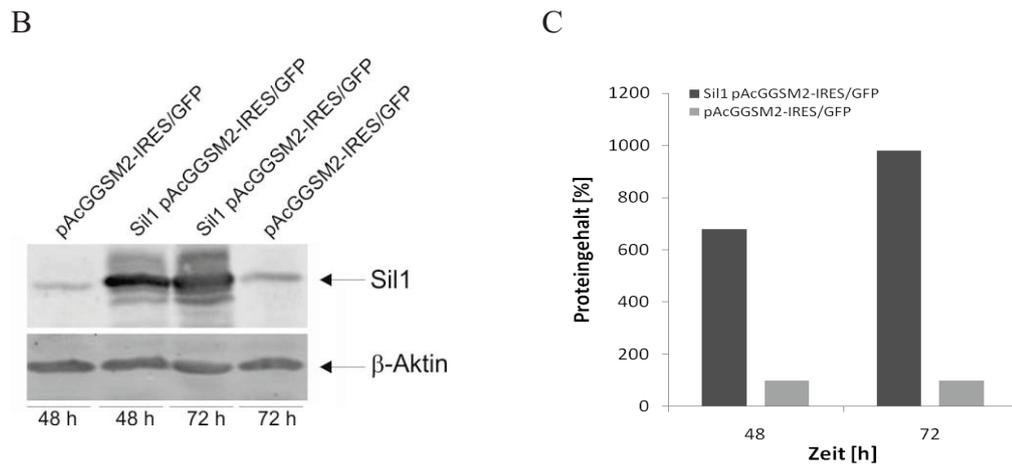
Anhand der erhobenen Daten wurde eine Beteiligung von Si11 am Proteintransport von ppL nicht bestätigt.

#### 4.3.7 Überexpression von *SIL1* in Säugerzellen

In Vorbereitung auf weiterführende Studien zum Nachweis, ob der durch Verlust von Sil1 beobachtete Effekt hinsichtlich der Zellproliferation durch exogene Zugabe von Sil1 aufgehoben werden kann, wurde *SIL1* zur Expression in Säugerzellen in den pAcGGSM2-IRES/GFP Vektor kloniert. Zur Überprüfung, ob Sil1 erfolgreich in HeLa-Zellen überexprimiert wird, wurden die Zellen 24 h vor der Plasmidtransfektion in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät. Zur Transfektion wurden 2 µg Plasmid-DNA und 6 µl FuGeneHD-Reagenz eingesetzt. In *Abb. 4.34 A* ist die Fluoreszenzaufnahme Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter HeLa-Zellen dargestellt. Nach 48 h konnte bereits eine Transfektionseffizienz von ca. 60% - 70% erzielt werden, nach 72 h sogar von über 85%. Die Western Blot-Analyse in *Abb. 4.34 B* zeigt, dass sich die Überexpression von *SIL1* auch auf Proteinebene bestätigen ließ. In den Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierten Zellen konnte nach 48 h etwa siebenmal und nach 72 h ca. zehnmal mehr Sil1 als in den mit dem Leervektor-transfizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden (*Abb. 4.34 C*).

A





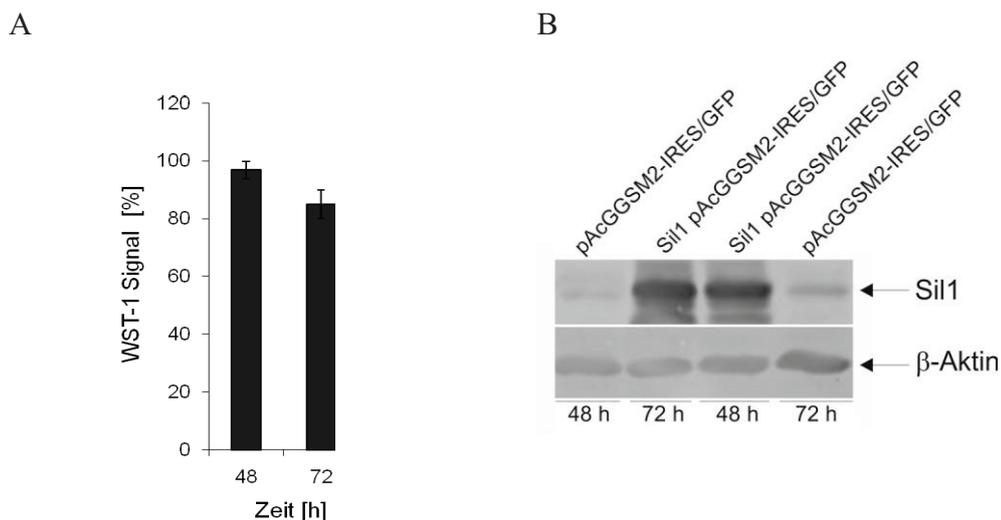
**Abb. 4.34: Überexpression von *SIL1* in HeLa-Zellen.**

**A:** HeLa-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.1 beschrieben, mit 2  $\mu$ g Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP Plasmid-DNA transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurde die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop (200-fache Vergrößerung) und über Western Blot-Analyse bestimmt. **B:** Western Blot-Analyse Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter Zellen. Die immunologische Detektion erfolgte mit primärem anti-Sil1-Antikörper (1:500) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Zur Ladekontrolle wurde der Blot mit primärem anti- $\beta$ -Aktin und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1250) inkubiert. **C:** Gehalt an Sil1 bezogen auf die Kontrollzellen.

Durch die Konstruktion des Plasmids Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP ist es gelungen, den Nukleotidaustauschfaktor in Säugerzellen erfolgreich überzusynthetisieren.

#### 4.3.8 Einfluss der Überexpression von *SIL1* auf die Zellvitalität

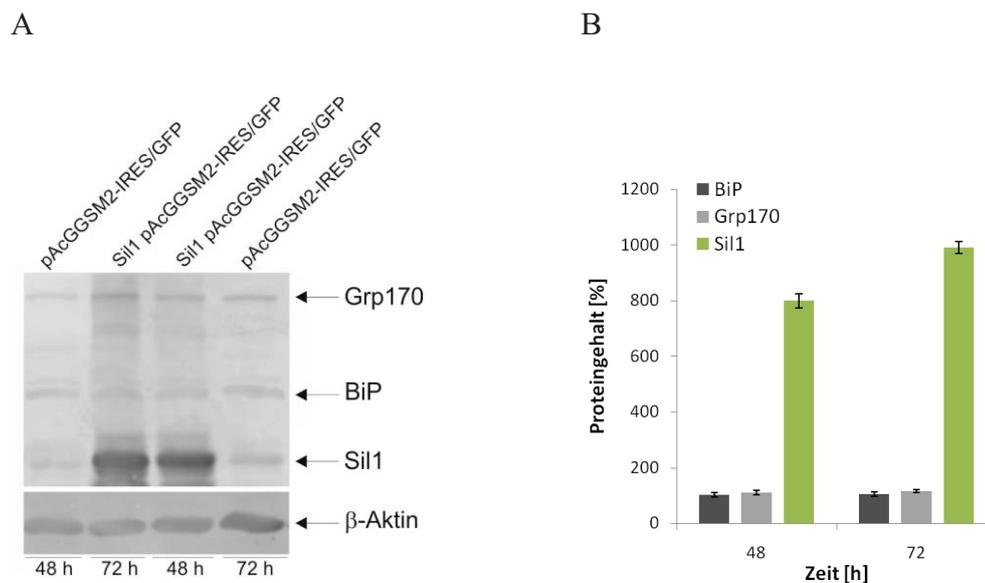
Studien von Awe *et al.* (2008) haben gezeigt, dass Sil1 zudem eine inhibitorische Funktion zu BiP aufweist, indem eine Überexpression den Komplex aus BiP und importierten Proteinen destabilisiert. Um zu überprüfen, ob die Überexpression von *SIL1* zudem einen Effekt auf die Vitalität der Zellen hat, wurde diese anhand des WST-1 Assays 48 h und 72 h nach Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP sowie pAcGGSM2-IRES/GFP Transfektion untersucht. Zur Erfassung der Vitalität wurden die Signale der Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierten Zellen auf die der Kontrollzellen bezogen. Aus Abb. 4.35 A geht hervor, dass sich 72 h nach Transfektion mit Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP und einer Menge an Sil1 von mehr als dem Siebenfachen, das WST-1 Signal gegenüber den Kontrollzellen um ca. 12% reduzierte. Ein Vergleich der Zellzahlen zeigte keine Unterschiede im Proliferationsverhalten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.35: WST-1-Assay Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter HeLa-Zellen.**

**A:** HeLa-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.1 beschrieben, mit Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP und pAcGGSM2-IRES/GFP transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurden die Zellen mit je 10% WST-1 Reagenz über 15 min. und 30 min. inkubiert und die Farbumsetzung im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen. Zur Erfassung der Vitalität wurde das WST-1 Signal der transfizierten Zellen in Bezug zu dem der Kontrollzellen gegen die Zeit dargestellt (n=2). **B:** Western Blot-Analyse zum Nachweis der Synthese von Sil1. Die immunologische Detektion erfolgte mittels anti-Sil1-Antikörpers (1:500) und anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpers (1:4000).

Ferner wurde überprüft, ob nach Überexpression von *SIL1* die Synthese der Chaperone Grp170 oder BiP erhöht ist, was Hinweise auf eventuellen ER-Stress gäbe. In *Abb. 4.36* ist die Western Blot Analyse Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfizierter HeLa-Zellen nach Inkubation mit anti-BiP- und anti-Grp170-Antikörper dargestellt. Die Quantifizierungsdaten in Teil B verdeutlichen, dass durch eine Erhöhung des Gehaltes an Sil1 auf mehr als das Sieben- bis Achtfache gegenüber den Kontrollzellen weder die Synthese von BiP noch die von Grp170 gesteigert wurde.



**Abb. 4.36: Western Blot zum Nachweis des Gehaltes an Grp170 und BiP nach Überexpression von *SIL1*.**

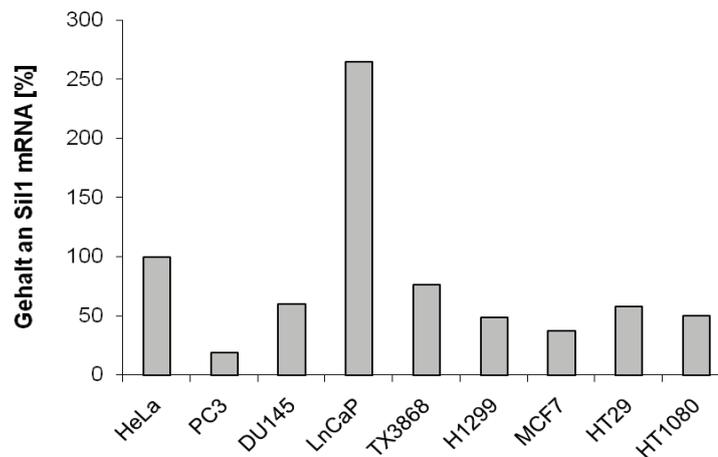
**A:** HeLa-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.9.4.1 beschrieben, mit Sil1 pAcGGSM2-IRES/GFP transfiziert. Nach 48 h und 72 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte über Western Blot-Analyse mit primärem anti-BiP- (1:300) sowie anti-Grp170-Antikörper (1:800) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Zur Ladekontrolle wurde der Blot mit primärem anti-β-Aktin und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1250) inkubiert. **B:** Bestimmung des Proteingehaltes an BiP und Grp170 bezogen auf den der Kontrollzellen (n=2).

Die erhobenen Daten zeigen, dass eine Überexpression von *SIL1* keinen Einfluss auf die Vitalität von HeLa-Zellen hat. Zudem konnte auch kein Anstieg der Synthese von Grp170 und BiP detektiert und somit keine Hinweise auf möglichen ER-Stress erhoben werden.

#### 4.3.9 Gehalt an Sil1 in verschiedenen Zelllinien

Auf Grund der selektiven Betroffenheit bestimmter Gewebe bei MSS-Patienten wäre denkbar, dass Sil1 zellspezifisch exprimiert wird oder dass in bestimmten Geweben die Funktion von einem anderen Protein wie beispielsweise Grp170, welches als alternativer Nukleotidaustauschfaktor von BiP identifiziert wurde, übernommen wird (Weitzmann, 2006). Um ein zellspezifisches Vorkommen von Sil1 zu überprüfen, wurde im Folgenden dessen Gehalt in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierzu wurde die Menge an Sil1 auf mRNA-Ebene mittels Quantitativer RT-PCR in den Zelllinien PC3 (Prostatakrebs-Zelllinie), DU145 (Prostatakrebs-Zelllinie), LnCaP (Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie), TX3868

(Glioblastom-Zelllinie), H1299 (Lungenkarzinom-Zelllinie), MCF7 (Brustkrebs-Zelllinie), HT29 (Darmkrebs-Zelllinie) sowie HT1080 (Fibrosarkom-Zelllinie) untersucht und auf HeLa-Zellen normiert (Abb. 4.37). Abb. 4.37 verdeutlicht, dass die Menge an Sil1 in den verschiedenen Zelllinien variiert. PC3-Zellen wiesen gegenüber den HeLa-Zellen ca. ein Fünftel des Gehaltes an Sil1 auf, während LnCaP-Zellen nahezu dreimal mehr Sil1 besitzen. Dagegen lag der Gehalt der mRNA des Nukleotidaustauschfaktors in den Zelllinien DU145, TX3868, H1299, MCF7, HT29 und HT1080 unter dem in HeLa-Zellen.

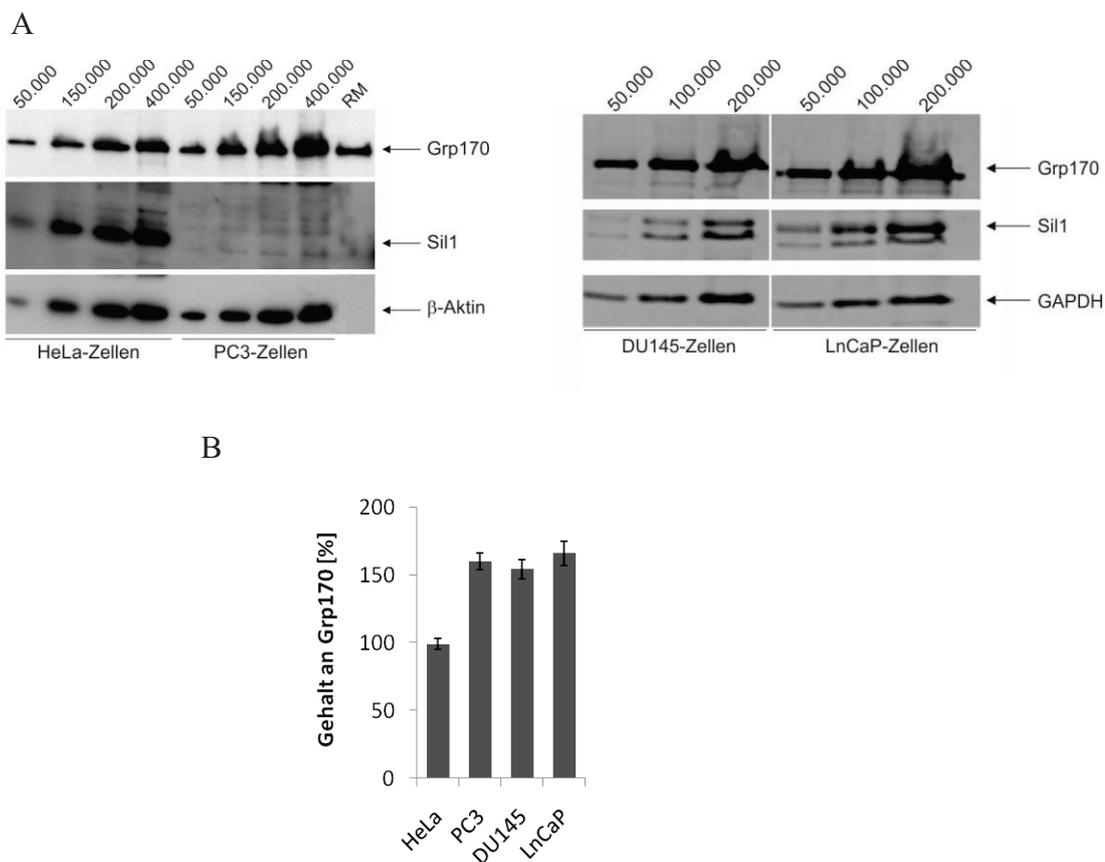


**Abb. 4.37: Übersicht des Gehaltes an Sil1 in verschiedenen Zelllinien.**

Zur Bestimmung der Menge an Sil1 in verschiedenen Zelllinien wurde aus den jeweiligen Zelllinien die Gesamt-RNA isoliert, mit Sil1-spezifischen Primer in cDNA umgeschrieben und über Q-PCR amplifiziert und quantifiziert. Der Gehalt an Sil1 wurde hierbei auf den in HeLa-Zellen normiert. **PC3**: Prostatakrebs-Zelllinie. **DU145**: Prostatakrebs-Zelllinie. **LnCaP**: Prostata-Adenokarzinom-Zelllinie. **TX3868**: Glioblastom-Zelllinie. **H1299**: Lungenkarzinom-Zelllinie. **MCF7**: Brustkrebs-Zelllinie. **HT29**: Darmkrebs-Zelllinie. **HT1080**: Fibrosarkom-Zelllinie.

Um zu überprüfen, ob sich die Synthese von Grp170 in den Zelllinien die wenig bzw. viel *SIL1* exprimieren, unterscheidet, was mögliche Hinweise auf eine redundante Funktion liefern könnte, wurde der Gehalt an Grp170 auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Die Quantifizierungsdaten des in Abb. 4.38 A aufgeführten Blots der Zellzahltitration von HeLa- und PC3-Zellen zeigt, dass in PC3-Zellen gegenüber den HeLa-Zellen ca. 1,6-mal mehr Grp170 detektiert wurde, während Sil1 nicht nachweisbar war. Die Menge an Grp170 in DU145- und LnCaP-Zellen war gegenüber den HeLa-Zellen gleichermaßen um das ca. 1,5-Fache erhöht (Abb. 4.38 B).

Anhand dieser Daten konnten Hinweise auf eine zell/gewebespezifische Expression von *SIL1* erzielt werden.



**Abb. 4.38: Übersicht des Gehaltes an Grp170 in HeLa-, PC3-, DU145- und LnCaP-Zellen.**

**A:** Western Blot-Analyse zum Nachweis der Menge an Grp170 in verschiedenen Zelllinien. Zur Bestimmung der Menge an Grp170 wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte über Western Blot-Analyse mit primärem anti-Grp170-Antikörper (1:800) und sekundärem Peroxidase-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1000). Zur Ladekontrolle wurde der Blot mit primärem anti- $\beta$ -Aktin und sekundärem Peroxidase-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1000) inkubiert.

**B:** Quantifizierung der Menge an Grp170. Zur Berechnung wurde der Gehalt an Grp170 auf den in HeLa-Zellen bezogen.

## 4.4 Das molekulare Grp170 Chaperon

Bei Grp170 (170 kDa glucose-regulated protein) handelt es sich um ein Hsp70-verwandtes Protein des Endoplasmatischen Retikulums von Säugerzellen, welches mit nichtassemblierten Immunglobulinen interagiert. Von Park *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass Grp170 durch Bindung an denaturierte Proteine eine Hitze-induzierte Protein-Aggregation verhindert. Die Assoziation mit BiP und Grp94 lässt zudem eine Rolle bei der Assemblierung und Faltung von sekretorischen Proteinen vermuten (Kuznetsov *et al.*, 1997). In der Arbeit von A. Weitzmann (2006) wurde gezeigt, dass Grp170 den Nukleotidaustausch von BiP stimuliert und so als alternativer Nukleotidaustauschfaktor zu Sill agiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand Grp170 depletierter Zelllinien die Funktion von Grp170 weiter charakterisiert werden. Insbesondere Fragestellungen, zu welchen zellulären Folgen ein Verlust von funktionellem Grp170 führt und welche Rolle das Protein im ER-Chaperon Netzwerk hinsichtlich seiner möglichen Funktion als alternativen Nukleotidaustauschfaktor zu Sill spielt, sollten bearbeitet werden.

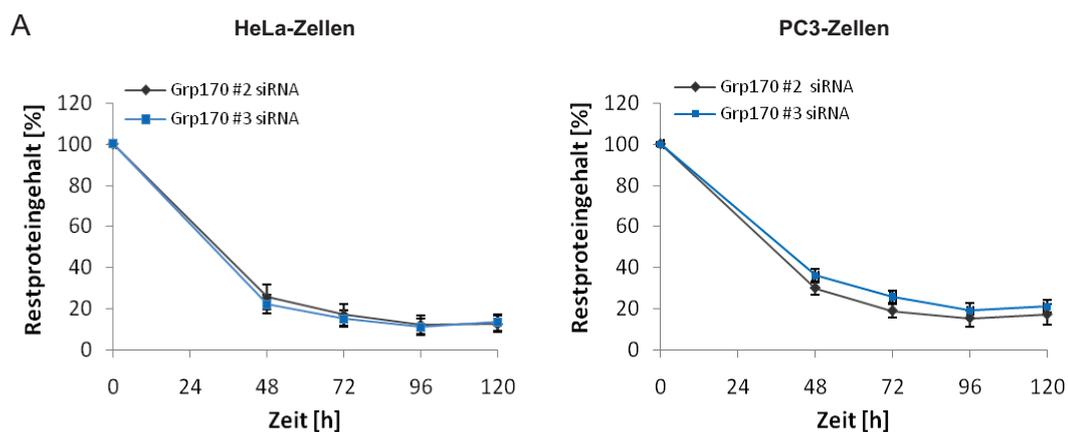
### 4.4.1 Depletion von Grp170 mittels RNA-Interferenz

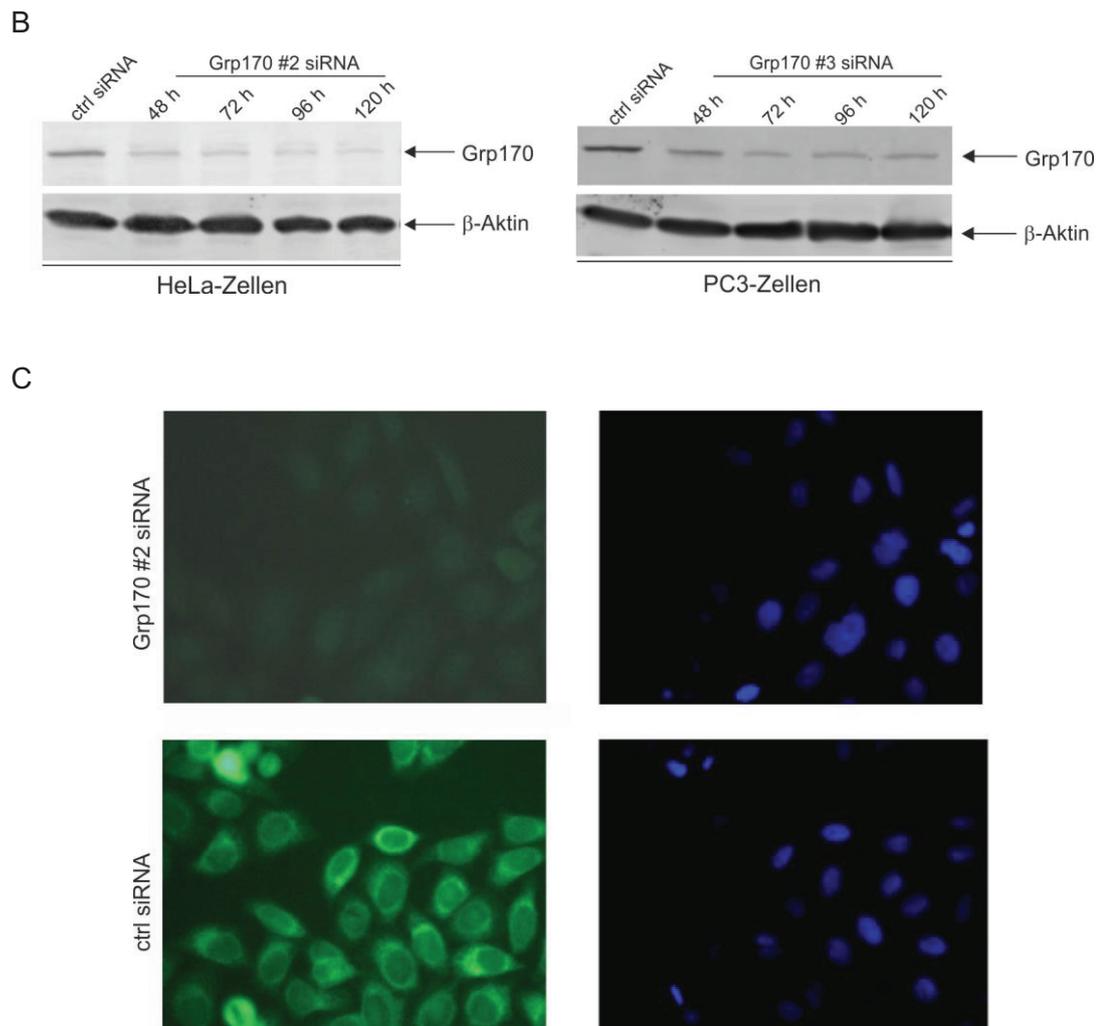
Die Herstellung Grp170-depletierter Zelllinien erfolgte unter Verwendung der im Folgenden als #2 und #3 bezeichneten siRNAs. Sowohl in HeLa- als auch in PC3-Zellen wurden die siRNAs auf ihre Wirksamkeit hin überprüft, wobei auch die einzusetzenden Konzentrationen sowie die Transfektionsbedingungen anhand von Vorversuchen optimiert wurden. Zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Proteinreduktion wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet (*Abb. 4.39*). Relevante Homologien der benutzten siRNAs zu anderen Genen konnten durch Datenbankanalysen ausgeschlossen werden.

Die Detektion der Proteinreduktion erfolgte anhand der Western Blot-Analyse unter Verwendung eines anti-Grp170-Antikörpers nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Zellextrakte im SDS-PAGE. Hierbei wurden die Zellen mit je 35 nM der verschiedenen siRNAs transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit 35 nM siRNA nachtransfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Transfektion (*Abb. 4.39*). *Abb. 4.39 A* veranschaulicht, dass der zelluläre Proteingehalt von Grp170 in HeLa-Zellen mit beiden siRNAs

nahezu gleichermaßen reduziert werden konnte. Der in der Teilabbildung B als Beispiel aufgeführte Western Blot zeigt, dass die spezifische Bande von Grp170 bei ungefähr 150 kDa in den Grp170 siRNA transfizierten Zellen deutlich gegenüber den Kontrollzellen reduziert war. Eine Quantifizierung der Daten ergab, dass 96 h nach Transfektion das Minimum mit durchschnittlich 13% an Restprotein erreicht wurde (Abb. 4.39 A). Der erzielte Restproteingehalt von Grp170 in PC3-Zellen lag nach 96 h mit Werten zwischen 15% und 21% leicht höher als bei HeLa-Zellen. Bis 120 h konnte in beiden Zelllinien kein Anstieg der Menge an Grp170 detektiert werden.

Die mittels Western Blot-Analyse gezeigte Reduktion der zellulären Menge an Grp170 wurde ferner über Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Zur Färbung wurden die Zellen zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“ fixiert, mit anti-Grp170-Antikörper und sekundärem FITC-konjugierten anti-rabbit Antikörper inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop unter gleichen Belichtungszeiten visualisiert (Abb. 4.39 C). Die Aufnahmen in Abb. 4.39 C lassen bei den Grp170 depletierten HeLa-Zellen bei einem Restproteingehalt von ca. 10% eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzintensität gegenüber der charakteristischen ER-Färbung in Kontrollzellen erkennen. Die Befunde zeigten zudem, dass der verwendete Antikörper natives Grp170 detektiert. Die gleichen Ergebnisse wurde zudem in depletierten PC3-Zellen erzielt (Daten nicht aufgeführt).





**Abb. 4.39: Nachweis der Depletion von Grp170 in HeLa- und PC3-Zellen mittels Western Blot-Analyse und Immunfluoreszenz-Mikroskopie.**

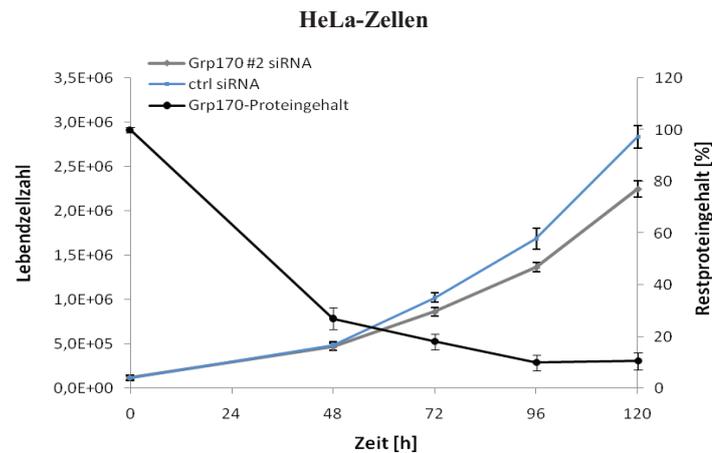
**A:** Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa- und PC3-Zellen wurden mit 35 nM Grp170 #2 siRNA, Grp170 #3 siRNA und ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit je 35 nM siRNA nachtransfiziert (siehe Punkt 3.2.9.4.4). Nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und im SDS-PAGE und Western Blot mittels primärem anti-Grp170-Antikörper (1:800) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit-Antikörper (1:1250) analysiert. Zur quantitativen Erfassung des Restproteingehaltes wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle ( $\beta$ -Aktin) normiert und in Verhältnis zu denen der parallel mitgeführten Kontrollzellen gesetzt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus mehreren Versuchsreihen ( $n=3$ ). **B:** Western Blot-Analyse Grp170 #2 siRNA transfizierter HeLa- sowie Grp170 #3 siRNA transfizierter PC3-Zellen. Die immunologische Detektion erfolgte mittels primären anti-Grp170-Antikörpers (1:800) und sekundären cy5-konjugierten anti-rabbit-Antikörpers (1:1250). Als Bezugspunkt dienten ctrl siRNA transfizierte Zellen. **C:** Nachweis der Grp170 Depletion in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Jeweils  $0,9 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden auf Glasplättchen in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 35 nM Grp170 #2 siRNA und ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit je 35 nM siRNA nachtransfiziert. Nach 96 h wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd fixiert und mit primärem anti-Grp170-Antikörper (1:800) und sekundärem FITC-gekoppelten anti-rabbit-Antikörper (1:1000) inkubiert. Die Detektion erfolgt unter gleichen Belichtungszeiten bei einer 200-fachen Vergrößerung. Die gezeigten Bildausschnitte sind repräsentativ für das gesamte Präparat. Das gleiche Ergebnis wurde nach Transfektion der Zellen mit Grp170 #3 siRNA sowie Grp170 depletierten PC3-Zellen erzielt (Daten nicht aufgeführt).

#### 4.4.2 Zellspezifische Folgen des Ausfalls von Grp170

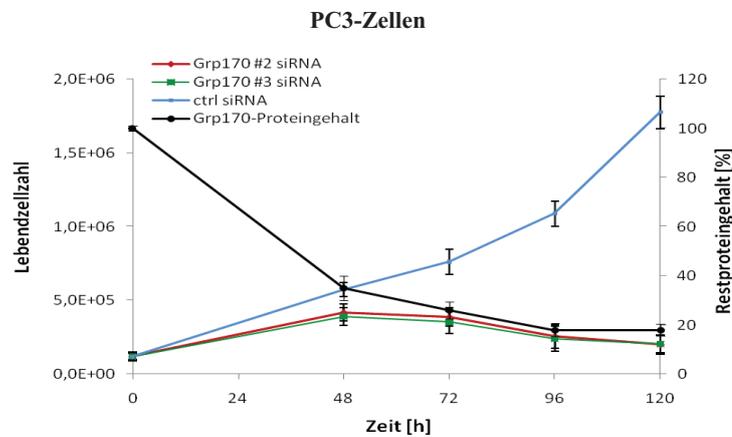
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Verlust von Sil1 in HeLa-Zellen zu einem Wachstumsarrest führte, während in PC3-Zellen kein Sil1 nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung dieser gewebespezifischen Funktion könnte darin liegen, dass die Funktion von Sil1 in PC3-Zellen durch ein anderes Protein übernommen wird. Studien von Weitzmann *et al.* (2006) haben gezeigt, dass Grp170 als alternativer Nukleotidaustauschfaktor zu Sil1 fungiert und somit möglicherweise den Funktionsverlust von Sil1 kompensieren kann. Vor diesem Hintergrund wurden in weiterer Folge die Auswirkungen eines Funktionsverlustes von Grp170 hinsichtlich Wachstums und Vitalität dieser beiden Zelllinien untersucht. Untersuchungen in der Hefe haben zudem gezeigt, dass Lhs1p, das Hefehomolog zu Grp170, nicht essentiell ist, obgleich eine Nullmutation Defekte in der post-translationalen Translokation (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996) sowie bei der Reparatur fehlgefalteter Proteine im ER hervorruft (Saris *et al.*, 1997). Eine Doppelmutation von *LHS1* und *SILI* ist dagegen letal und führt zu einer vollständigen Blockade des Proteintransportes in das ER (Tyson & Stirling, 2000).

Zunächst wurde die Zellzahl der lebenden Zellen nach Grp170 siRNA Transfektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und mit der parallel mitgeführten Kontrollzellen verglichen. Aus dem grafischen Verlauf der in *Abb. 4.40 A* aufgeführten Zellzahlen transfizierter HeLa-Zellen wird deutlich, dass ein Verlust von Grp170 keine wesentlichen Folgen auf das Zellwachstum hatte. Während bei den Kontrollzellen nach 120 h ca.  $2,8 \times 10^6$  Zellen gezählt wurden, waren bei dem Grp170 #2 siRNA transfizierten Ansatz etwa  $2,2 \times 10^6$  Zellen vorhanden. Somit wurde gegenüber den Kontrollzellen jedoch ein geringerer Anstieg der Zellzahl beobachtet. Das gleiche Verhalten konnte zudem nach Transfektion mit Grp170 #3 siRNA beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Verlust von Grp170 in PC3-Zellen führte dagegen zu einer deutlichen Reduktion im Zellwachstum (*Abb. 4.40 B*). Bis 48 h nach Transfektion und einem ermittelten Restproteingehalt von etwa 35% war kein Unterschied zwischen den depletierten Zellen und den Kontrollzellen erkennbar. Ab einem Gehalt an Grp170 von weniger als 20% wurde eine deutliche Reduktion der Zellzahl gemessen. Bei den Kontrollzellen wurde währenddessen ein deutlicher Anstieg der Zellzahl beobachtet.

A



B

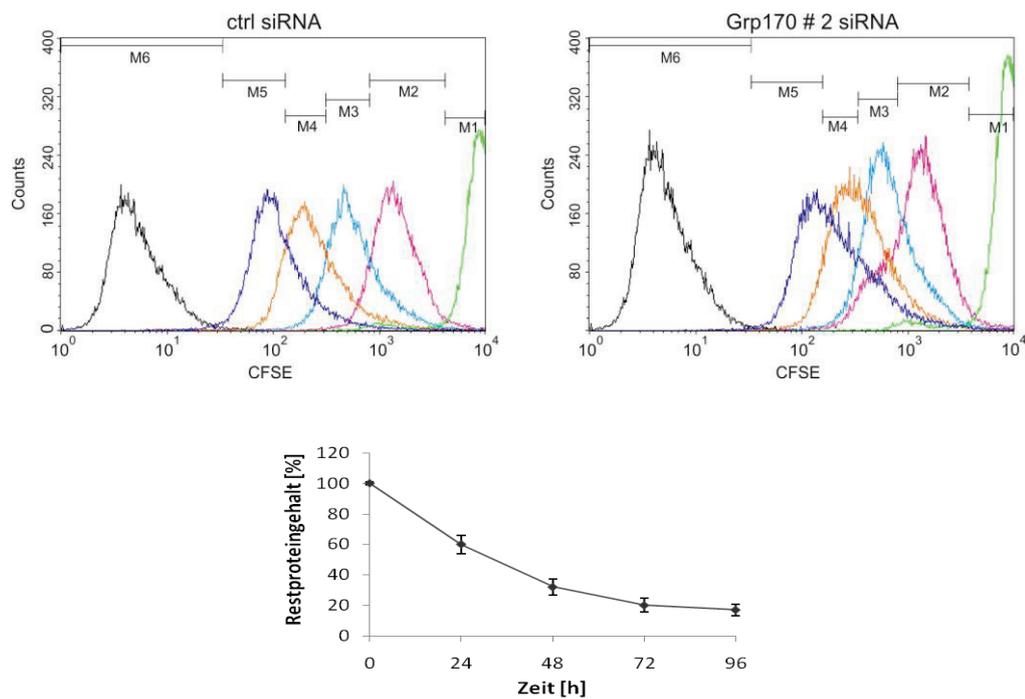


**Abb. 4.40: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten Grp170 depletierter Zellen.**

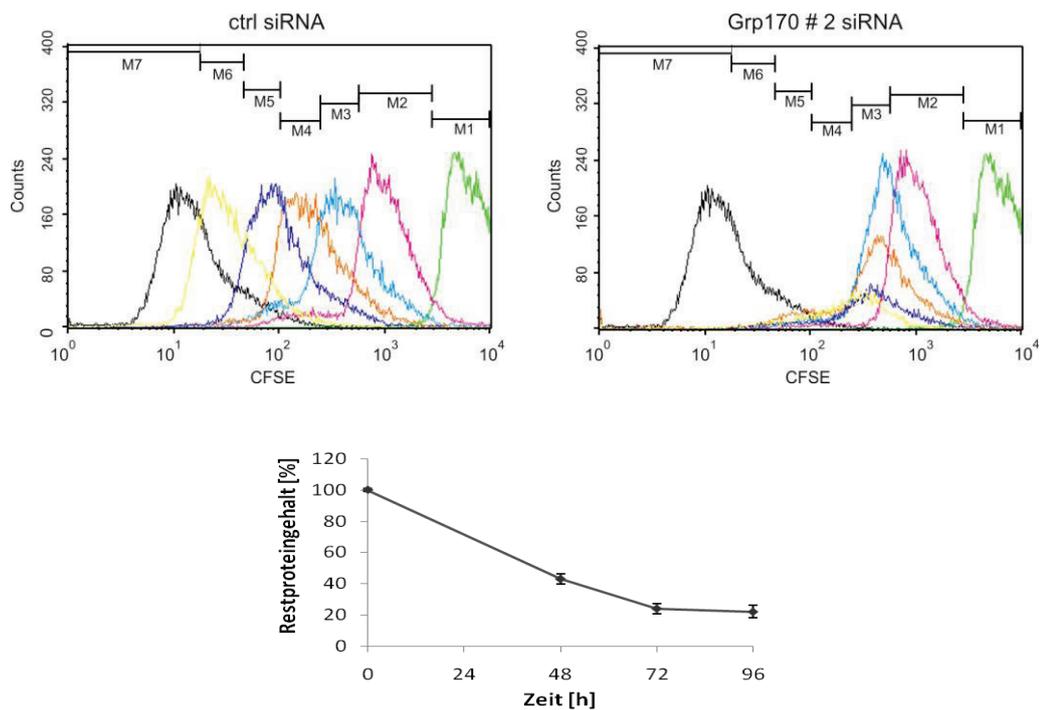
Jeweils  $1,2 \times 10^5$  HeLa- (A) & PC3-Zellen (B) wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 35 nM Grp170 #2 siRNA und ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit 35 nM siRNA nachtransfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h geerntet und die Zellzahlen durch Auszählen mittels Neubauerkammer bestimmt (n=3).

Parallel wurde der Einfluss von Grp170 hinsichtlich der Zellproliferation anhand der CFSE-Färbung untersucht (Abb. 4.41). Aus Abb. 4.41 A wird deutlich, dass sich die Fluoreszenzintensität von CFSE bei den Grp170 depletierten HeLa-Zellen über den Untersuchungszeitraum von 96 h kontinuierlich reduzierte. Der Restproteingehalt an Grp170 lag nach 96 h bei ca. 17%. Bei den Grp170 depletierten PC3-Zellen wurde dagegen bereits nach 48 h keine Reduktion der Intensität des Farbstoffes detektiert, was einen Wachstumsarrest signalisiert (Abb. 4.41 B). Der Gehalt an Grp170 betrug nach 96 h ca. 20%. Demzufolge konnten die aus der Zellzahlbestimmung erhobenen Daten untermauert werden.

A



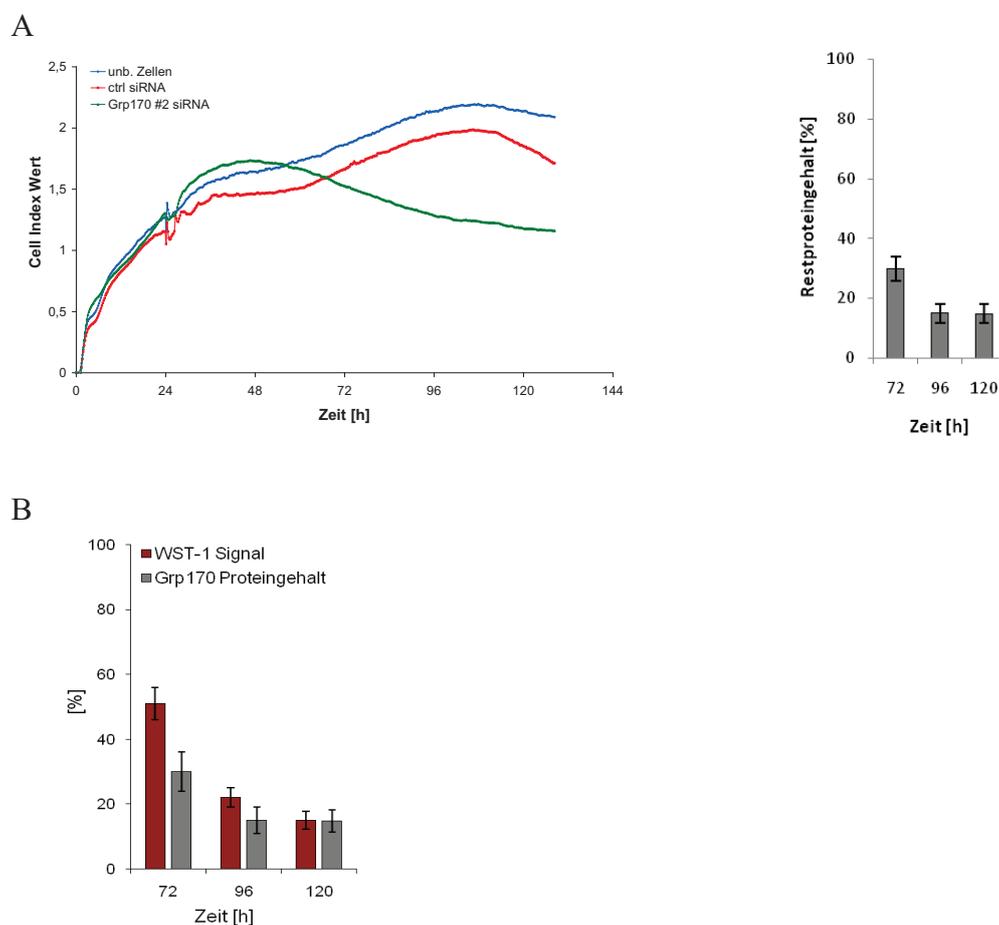
B



**Abb. 4.41: CFSE-Färbung Grp170 depletierter Zellen zum Nachweis des Proliferationsverhaltens.**

CFSE-Färbung Grp170 #2 siRNA und ctrl siRNA transfizierter HeLa- (A) & PC3-Zellen (B). 0 h (grün), 24 h (pink), 48 h (hellblau), 72 h (orange) und 96 h (dunkelblau) nach siRNA Transfektion und Färbung mit 5  $\mu$ M CFSE wurden die Zellen geerntet und im FACS analysiert. Schwarz sind die ungefärbten Zellen dargestellt. Angegeben ist zudem der Restproteingehalt an Grp170 zu den verschiedenen Messzeiten.

Neben der Zellzahlbestimmung und der CFSE-Färbung wurde das Zellwachstum Grp170 depletierter PC3-Zellen anhand des Real-Time Cell Analyzer Systems xCELLigence bestimmt (3.2.9.5.3). In dem in *Abb. 4.42 A* gezeigten Experiment Grp170 depletierter PC3-Zellen ist erkennbar, dass eine Depletion des Proteins zu einem veränderten Wachstumsverhalten gegenüber den Kontrollzellen führte. Der Cell Index Wert sowohl der unbehandelten als auch der Kontrollzellen stieg kontinuierlich an, während bei den Grp170 depletierten Zellen bereits nach 52 h (entspricht 76 h nach Transfektion) die Kurve abfiel. Somit konnten die aus der Zellzahlbestimmung und der CFSE-Färbung erhobenen Daten untermauert werden.



**Abb. 4.42: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten Grp170 depletierter PC3-Zellen mittels xCELLigence und WST-1 Assay.**

**A:** Messung der Zellvitalität mittels xCELLigence. Je  $1,2 \times 10^5$  PC3-Zellen wurden mit jeweils 35 nM Grp170 #2 siRNA und ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit 35 nM siRNA nachtransfiziert. Nach 20 h wurden die Zellen trypsinisiert und zu je 7.500 Zellen in eine E-Plate 96 ausgesät. Parallel wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Die Messung des Proliferationsverhaltens erfolgte im xCELLigence über einen Zeitraum von 128 h. Der rechte Bildausschnitt zeigt den Restproteingehalt an Grp170 72 h, 96 h und 120 h nach siRNA-Transfektion. **B:** WST-Assay Grp170 #2 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierter PC3-Zellen. Nach 72 h, 96 h und 120 h wurden die

---

Zellen mit je 10% WST-1 Reagenz über 15 min. und 30 min. inkubiert und die Farbumsetzung im Spektralphotometer bei 450 nm gemessen. Zur Erfassung der Vitalität wurde das WST-1 Signal der depletierten Zellen in Bezug zu dem der Kontrollzellen gegen die Zeit dargestellt. Aufgeführt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen.

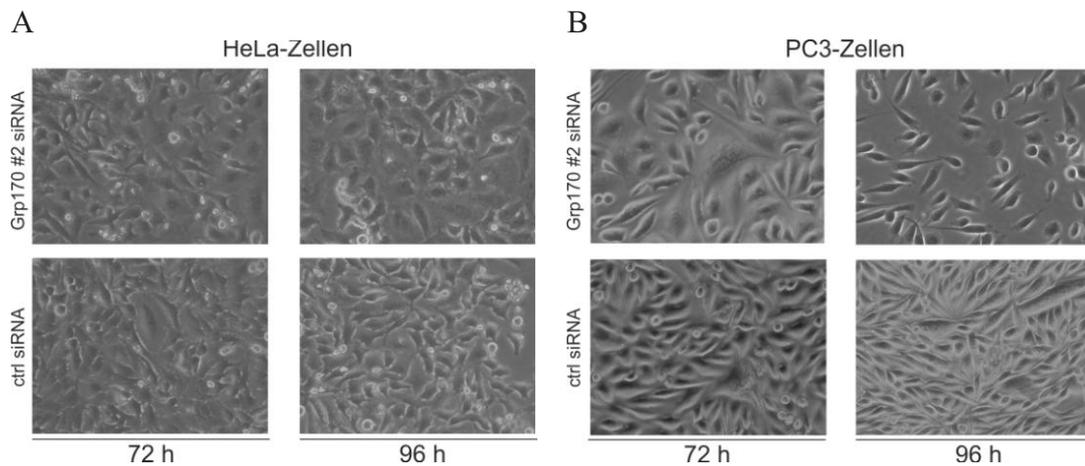
In einem weiteren vergleichbaren Versuchsansatz wurde die Vitalität der Grp170 depletierten HeLa- als auch PC3-Zellen anhand des WST-1 Assays untersucht. Zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“ bei einem Restproteingehalt von ~ 15% wurde keine Reduktion des WST-1 Signals in HeLa-Zellen gemessen (Daten nicht gezeigt), wohingegen ein Funktionsverlust des Chaperons in PC3-Zellen zu einem deutlichen Rückgang des WST-1 Signals führte (*Abb. 4.42 B*). Aufgrund der Eigenschaften des Assays kann dies eine Abnahme der Vitalität der Zellen signalisieren. Der Rückgang der Zellzahl Grp170 depletierter Zellen im Verhältnis zu den Kontrollzellen verhielt sich somit analog zur gezeigten Reduktion der im WST-Assay gemessenen Vitalität.

Anhand der angewandten Wachstums- und Vitalitäts-Assays wurde gezeigt, dass das Chaperon Grp170 keinen Einfluss auf die Proliferation von HeLa-Zellen hat, jedoch essentiell für das Wachstum von PC3-Zellen ist.

#### 4.4.3 Einfluss der Depletion von Grp170 auf die Zellmorphologie

Die Zellproliferationsstudien haben gezeigt, dass ein Funktionsverlust von Grp170 in HeLa-Zellen keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten zeigte, wohingegen ein Verlust des Proteins in PC3-Zellen zu einem Zellteilungsarrest führte. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, inwiefern sich der Verlust von Grp170 auf die Morphologie der Zellen auswirkt.

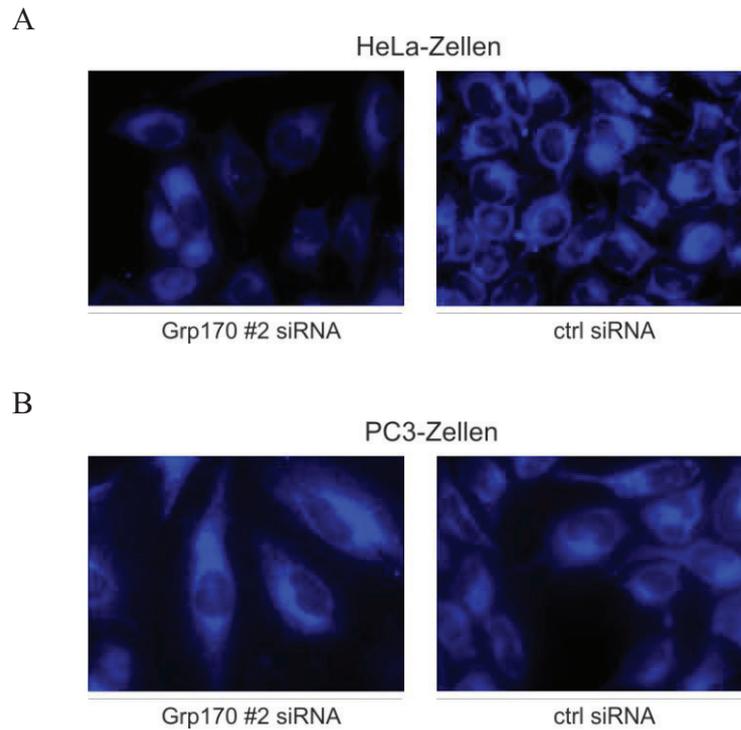
Die phasenkontrastmikroskopischen Aufzeichnungen in *Abb. 4.43 A* veranschaulichen, dass Grp170 depletierte HeLa-Zellen keine morphologischen Unterschiede zu den Kontrollzellen aufwiesen. Auch in der Morphologie der depletierten PC3-Zellen wurden keine wesentlichen Veränderungen gegenüber derer der Kontrollzellen beobachtet (*Abb. 4.43 B*). Nach 96 h und einem Restproteingehalt an Grp170 von ca. 15% ist jedoch eine deutliche Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu der der Kontrollzellen erkennbar. Diese Beobachtung bestätigt folglich die aus den vorangegangenen Experimenten erhobenen Daten.



**Abb. 4.43: Morphologie Grp170 depletierter Zellen.**

Phasenkontrastaufnahmen Grp170 #2 siRNA sowie ctrl siRNA transfizierter HeLa- (A) und PC3-Zellen (B) 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion bei 200-facher Vergrößerung.

Untersuchungen zur Morphologie des ER innerhalb dieser Arbeit haben zudem gezeigt, dass ein Verlust des Hsp70 Chaperons BiP sowie seines Nukleotidaustauschfaktors Sil1 zu keinen Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen führten. In Bezug auf die Funktion von Grp170 als alternativer Nukleotidaustauschfaktor zu Sil1 wäre zu erwarten, dass ein Verlust von Grp170 ebenfalls keinen Einfluss auf die Morphologie des ER ausübt. Um diese Annahme zu belegen oder um eine mögliche weitere, Nukleotidaustauschfaktor unabhängige, Funktion von Grp170 zu untersuchen, wurden Grp170 depletierte HeLa- sowie PC3-Zellen mit ER-Tracker™ Blue-White DPX gefärbt (3.2.9.5.5) und 96 h nach siRNA Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert (Abb. 4.44). Die ER-Färbung in Abb. 4.44 veranschaulicht, dass ein Verlust von Grp170 weder in HeLa- noch in PC3-Zellen einen Einfluss auf die Struktur des ER hat. Ein direkter Vergleich mit den Kontrollzellen ließ keine Unterschiede in der Morphologie des ER erkennen. Demnach führt eine Reduktion des Proteins zu keiner gestörten Morphologie des Kompartimentes. Dieselben Ergebnisse wurden auch nach Transfektion mit Grp170 #3 siRNA erzielt (Daten nicht aufgeführt).



**Abb. 4.44: ER-Färbung Grp170 depletierter Zellen.**

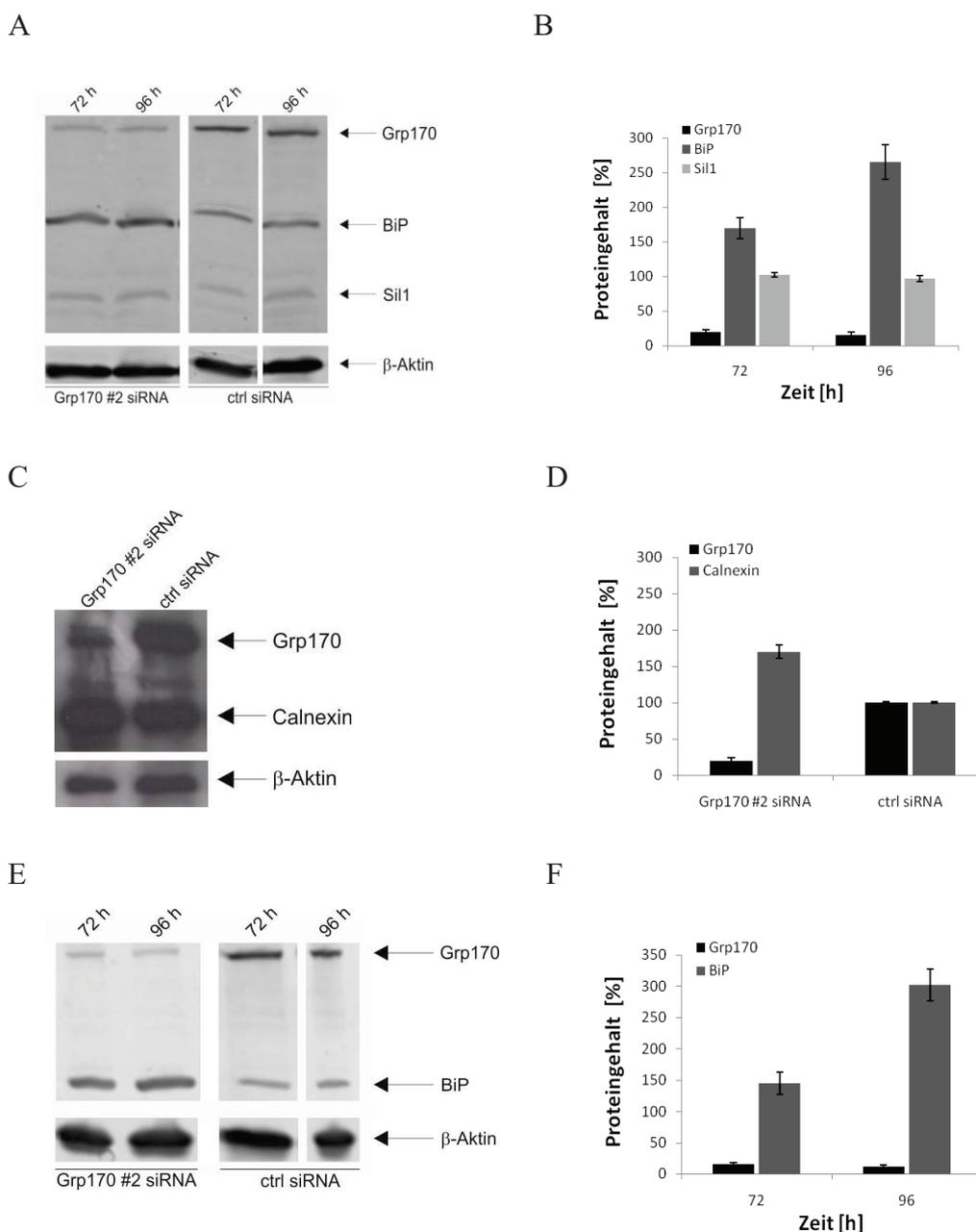
ER-Tracker Färbung Grp170 depletierter HeLa- (A) und PC3-Zellen (B). Jeweils  $1,2 \times 10^5$  Zellen wurden in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit je 35 nM Grp170 #2 siRNA sowie ctrl siRNA transfiziert und nach 24 h erneut mit 35 nM siRNA nachtransfiziert. 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 1 mM ER-Tracker™ Blue-White DPX über 30 min. bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 600-facher Vergrößerung detektiert.

Anhand der erhobenen Daten wurde gezeigt, dass ein Verlust des Chaperons zu keiner veränderten Morphologie der Zellen führte.

#### 4.4.4 Untersuchungen zur Akkumulation und Ubiquitinierung von Proteinen nach Depletion von Grp170

Zusammen mit BiP, Grp94, PDI (Protein Disulfid Isomerase) und anderen Faltungsenzymen wurde Grp170 in einem Multiproteinkomplex vorgefunden, welcher mit nichtassemblierten und unvollständig gefalteten schweren Ketten von Immunglobulinen assoziieren kann (Meunier *et al.*, 2002). Zudem wurde eine Funktion als alternativen Nukleotidaustauschfaktor zu BiP beschrieben (Weitzmann, A. *et al.*, 2007). Studien in Hefen haben gezeigt, dass *Δlgs1* mutierte Zellen eine Induktion der UPR aufweisen (Craven *et al.*, 1996). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein Verlust von Grp170 auch in Säugerzellen zur Induktion der UPR führt.

Die Überprüfung der UPR-Induktion erfolgte auf Proteinebene über den Nachweis des UPR-Markerproteins BiP. Der Western Blot in *Abb. 4.45 A* veranschaulicht, dass eine Depletion von Grp170 in HeLa-Zellen nach 72 h eine Zunahme in der Synthese von BiP um das ca. 1,7-Fache und nach 96 h um das ca. 2,7-Fache bewirkte. Parallel konnte kein Anstieg der Menge an S11 beobachtet werden (*Abb. 4.45 B*). Hierbei wäre denkbar gewesen, dass sich ein Funktionsverlust von Grp170 hinsichtlich der Nukleotidaustauschaktivität durch eine erhöhte Synthese von S11 erkennbar gemacht hätte. Ein Funktionsverlust von Grp170 in PC3-Zellen führte ebenso zu einer verstärkten Synthese des Hsp70 Chaperons BiP (*Abb. 4.45 E*). Nach 72 h wurde ein Anstieg der Menge an BiP um das 1,5-Fache und nach 96 h um das ca. 3-Fache gemessen (*Abb. 4.45 F*). Parallel wurde zum Zeitpunkt des optimalen „silencing“ die Synthese des Lektins Calnexin in HeLa-Zellen untersucht. Wie aus *Abb. 4.45 C* hervorgeht, führte die Depletion von Grp170 verglichen mit den Kontrollzellen zu einer Erhöhung des Proteingehaltes um das ca. 1,7-Fache (*Abb. 4.45 D*). Die Untersuchungen haben demnach gezeigt, dass ein Verlust des Hsp70 Chaperons zur Induktion der Synthese von BiP und Calnexin führte, was Hinweise auf eine Induktion der UPR ergibt.



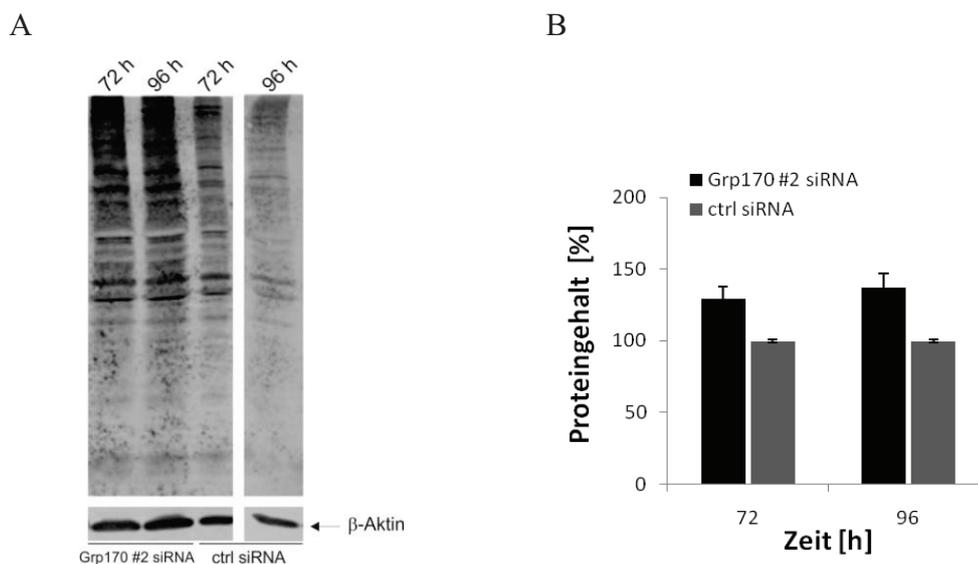
**Abb. 4.45: Gehalt an BiP, Sil1 und Calnexin in Grp170 depletierten Zellen**

Die mit 35 nM Grp170 #2 siRNA und ctrl siRNA transfizierten Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, lysiert, über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. **A:** Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an BiP und Sil1 72 h und 96 h nach Depletion von Grp170 in HeLa-Zellen mittels primärem anti-BiP-Antikörper (1:300) bzw. anti-Sil1-Antikörper (1:500) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. Hierzu wurde der Blot mit primärem anti  $\beta$ -Aktin Antikörper (1:4000) und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1250) inkubiert. **B:** Quantitative Berechnung der Menge an BiP, Grp170 und Sil1 bezogen auf den jeweiligen Gehalt in den Kontrollzellen ( $n=3$ ). **C:** Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an Calnexin 96 h nach Grp170 #2 siRNA Transfektion von HeLa-Zellen mittels primärem anti-Calnexin-Antikörper (1:1000) und sekundärem Peroxidase-gekoppelten anti-rabbit Antikörper (1:1000). **D:** Quantitative Berechnung der Menge an Grp170 und Calnexin bezogen auf den jeweiligen Gehalt in den Kontrollzellen ( $n=2$ ). **E:** Immunologische Detektion zum Nachweis der Menge an BiP 72 h und 96 h nach Depletion von Grp170 in PC3-Zellen mittels primärem anti-BiP-Antikörper (1:300) und

sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. Hierzu wurde der Blot mit primärem anti  $\beta$ -Aktin Antikörper (1:4000) und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper (1:1250) inkubiert. **F:** Quantitative Berechnung der Menge an BiP und Grp170 bezogen auf den jeweiligen Gehalt in den Kontrollzellen (n=3).

Neben seiner möglichen Rolle bei der Assemblierung sowie Faltung von sekretorischen Proteinen (Kuznetsov *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003) wurde Grp170 auch eine Funktion als alternativer Nukleotidaustauschfaktor von BiP zugeschrieben (Weitzmann, 2006). Ein Verlust des Proteins könnte demnach eine Aggregation ungefalteter, missgefalteter sowie ubiquitiniertes Proteine zur Folge haben.

Ein Nachweis der Akkumulation ubiquitiniertes Proteinen nach Grp170 Depletion in PC3-Zellen konnte anhand der Western Blot-Analyse über immunologische Detektion mittels anti-Ubiquitin Antikörpers erbracht werden (*Abb. 4.46 A*). Wie aus *Abb. 4.46 A* ersichtlich, führte ein Verlust von Grp170 um ca. 85% zu einer gegenüber den Kontrollzellen ca. 1,3- bis 1,4-fach erhöhten Ubiquitinierung.



#### **Abb. 4.46: Ubiquitinierung nach Depletion von S11**

**A:** Die mit 35 nM Grp170 #2 siRNA und ctrl siRNA transfizierten PC3-Zellen wurden nach 72 h und 96 h geerntet, lysiert, über SDS-PAGE in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit primärem anti-Ubiquitin-Antikörper (1:80) und sekundärem cy5-konjugierten anti-rabbit Antikörper (1:1250). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin genutzt. Hierzu wurde der Blot mit primärem anti  $\beta$ -Aktin Antikörper (1:4000) und sekundärem cy3-konjugierten anti-mouse Antikörper inkubiert. **B:** Zur Quantifizierung wurden die Proteinbanden auf die Ladekontrolle normiert und in Verhältnis zu denen der Kontrollzellen gesetzt (n=2).

## 5. Diskussion

Die Biosynthese von Proteinen, welche zu vielen verschiedenen Membranen transportiert oder von der Zelle sezerniert werden, findet im Endoplasmatischen Retikulum statt. Das ER besteht aus einem weit verzweigten Membran-Netzwerk, welches die korrekte Faltung, Assemblierung sowie Glykosylierung von Proteinen sicherstellen muss (Lodish *et al.*, 2000). Unterstützt werden diese Abläufe durch eine Vielzahl molekularer Chaperone und Faltungsenzyme, die zusammen ein funktionales Netzwerk bilden. Die Aufrechterhaltung dieser ER-Homöostase ist ein essentieller Bestandteil für das Überleben einer Zelle. Eine Zerstörung dieser physiologischen Funktionen führt beispielsweise durch Akkumulation ungefalteter Proteine zu ER-Stress was mitunter Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson hervorruft. Dies unterstreicht die Bedeutung eines funktionierenden Zusammenspiels einer Vielzahl von Komponenten, von denen einige im Rahmen dieser Arbeit auf zellulärer charakterisiert wurden.

### 5.1 Charakterisierung des Hsp70 Chaperons BiP

Das Hsp70 Chaperon BiP ist ein zentraler Regulator der ER-Homöostase. Es handelt sich hierbei um ein Stress-induziertes Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums (Lee, 1992; Jolly & Morimoto, 2000), für welches anhand von *in vitro* Untersuchungen eine Beteiligung an einer Vielzahl von Prozessen wie beispielsweise bei der Proteinfaltung, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, der UPR, oder der Permeabilitätserhaltung beschrieben wurde (Bertolotti *et al.*, 2000; Lee, 2001; Shen *et al.*, 2002; Kleizen & Braakman, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Im Folgenden wurde unter Anwendung verschiedener zellbasierter Assays die Rolle von BiP in Säugerzellen insbesondere im Hinblick auf das Zellwachstum und den Proteinimport näher untersucht.

#### 5.1.1 BiP-depletierte Zelllinien

Um die Funktion des Hsp70 Chaperons auf zellulärer Ebene weiter charakterisieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit im Labor die siRNA basierte Depletion von BiP in verschiedenen Zelllinien etabliert. Mit Hilfe dieser RNA-Interferenz-Technologie konnte der zelluläre Gehalt an BiP sowohl in HeLa- als auch in PC3-

Zellen unter Verwendung von zwei verschiedenen siRNAs effektiv minimiert werden. Das Optimum der Proteinreduktion wurde 72 h nach siRNA-Transfektion mit ca. 5% - 15% in HeLa- bzw. 10% - 20% in PC3-Zellen erreicht (*Abb. 4.1*). Vergleichbare „silencing“-Raten wurden auch nach 48 h in HeLa S3-Zellen, welche mit 2'-*O*-Methyl-Ribonukleotid modifizierten siRNAs gegen die mRNA von *BIP* transfiziert wurden, erzielt (Suzuki *et al.*, 2007). Dieser zeitliche Versatz ist durch den Einsatz unterschiedlicher siRNA-Konzentrationen sowie Transfektionsreagenzien erklärbar. Der im weiteren zeitlichen Verlauf verzeichnete Anstieg des Gehaltes an BiP konnte auch anhand der Daten von Suzuki *et al.* (2007) beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die regressive Verfügbarkeit der siRNA dieser transienten Transfektionsmethode. Der Effekt könnte zudem dadurch verstärkt werden, dass ein Verlust des Hsp70 Chaperons zu ER-Stress und somit zur Aktivierung der UPR führt, welche wiederum eine erhöhte Synthese von BiP induziert. Als negativer Regulator der UPR interagiert BiP mit den Transmembranproteinen PERK, ATF6 und IRE1 durch Bindung an deren luminalen Domänen (Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Freies BiP im ER-Lumen wechselt zwischen dem monomeren und oligomeren Status (Freiden *et al.*, 1992; Blond-Elguindi *et al.*, 1993), wobei nur monomeres BiP mit neu synthetisierten Proteinen assoziiert, um deren Faltung zu erleichtern. Der oligomere Zustand stellt einen Pool dar, von welchem monomeres BiP bei Akkumulation von ungefalteten Proteinen rekrutiert wird. Die Rekrutierung von BiP aus diesem Pool für die Bindung an ungefaltete Proteine während ER-Stress führt dazu, dass das Protein von PERK, ATF6 und IRE1 dissoziiert, wodurch nachgeschaltete UPR-Signal-Kaskaden aktiviert werden, in deren weiteren Folge die Synthese von BiP hochreguliert wird, um den oligomeren Pool zu regenerieren (Zu *et al.*, 2006).

Zur Bestätigung der über die Western-Blot-Analyse gezeigten Depletion von BiP wurde zudem eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung eines Antiserums gegen BiP durchgeführt, wobei jedoch keine Reduktion detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine denkbare Möglichkeit hierfür wäre, dass der Restproteingehalt ausreichend sein könnte, eine Signalreduktion auf Grund der Auflösung des Mikroskops nicht visualisieren zu können. Insofern, dass anhand der Depletionsstudie von Sill auch bei niedrigerem Restproteingehalt eine Reduktion der Signalintensität mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert werden konnte, ist diese Annahme jedoch eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnte die über

Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht nachweisbare Reduktion des Signals von BiP am eingesetzten Antiserum liegen. Kreuzreaktionen mit anderen zellulären Komponenten könnten hierbei zu falsch-positiven Resultaten führen. Durch die Verwendung eines affinitätsgereinigten Antikörpers könnte dies überprüft werden. Während der Antikörper bei der Western-Blot-Analyse denaturierte Proteine bindet, werden bei der Immunfluoreszenz eher native Proteine nach Fixierung detektiert. Durch diese Fixierung können mitunter Epitope entstehen und dadurch artifizielle Strukturen erkannt werden, die falsch-positive Ergebnisse erzeugen können. Bei der Fixierung mit Aldehyden besteht im Gegensatz zur Alkohol-Fixierung zudem die Gefahr eines erhöhten Hintergrundes, da die Aldehyde mit Aminen der Proteine reagieren und somit (auto-) fluoreszierendes Material produzieren. Um dies zu überprüfen, könnten statt der gewählten Formaldehyd-Fixierung andere Fixative wie beispielsweise Methanol oder Dimethylsuberimidat, welche bei der Fixierung einen geringeren Fluoreszenz-Hintergrund produzieren, ausgetestet werden.

### 5.1.2 Auswirkungen des Verlustes von BiP auf das Zellwachstum und die zelluläre Stressreaktion

Bislang wurden diverse Studien veröffentlicht, welche sich mit der zellulären Stressreaktion sowie des Zellwachstumsverhaltens nach siRNA-vermittelter Degradation der mRNA von BIP befassten. Einige haben gezeigt, dass eine Reduktion des Proteinlevels an BiP keine UPR induziert (Zhai *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2005; Zu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006), während andere wiederum beschrieben haben, dass nach Verlust des Hsp70 Chaperons die Expression von UPR-induzierten Genen wie GRP94, CHOP sowie PDI deutlich erhöht ist und die UPR induziert wurde (Suzuki *et al.*, 2007). Auch ein zellspezifischer Effekt im Hinblick auf das Zellwachstum und die Induktion der Apoptose wurden beschrieben (Suzuki *et al.*, 2007). Luo *et al.* (2007) wiesen darauf hin, dass BiP essentiell für das embryonale Zellwachstum ist. Anhand von konditionalen „knockout“-Mäuse zeigte sich zudem, dass BiP-depletierte Purkinje-Zellen eine Zelldegeneration entwickelten, assoziiert mit schwerwiegenden motorischen Koordinationsdefekten und zerebellarer Atrophie (Wang *et al.* 2010).

Eine essentielle Bedeutung von BiP hinsichtlich des Zellwachstums wurde anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten unter Anwendung verschiedener Assays belegt.

Über die Bestimmung der Lebendzellzahl BiP depletierter Zellen versus Kontrollzellen konnte gezeigt werden, dass BiP essentiell für die Proliferation von HeLa- sowie PC3-Zellen ist. In beiden Zelllinien wurde nach Depletion des Hsp70 Chaperons ab drei Tagen eine Reduktion der Zellzahl gemessen. Obgleich der Restproteingehalt über den Untersuchungszeitraum wieder leicht anstieg, war keine Zunahme der Lebendzellzahl erkennbar (*Abb. 4.2 & 4.3*). Dies impliziert, dass die Zellen nach Depletion von BiP irreversibel geschädigt sind und dass keine Mechanismen existieren, welche die Funktion des Proteins kompensieren können. Durch Einsatz von jeweils zwei verschiedenen siRNAs mit Spezifität für dieselbe Ziel-mRNA konnten zudem unspezifische Effekte, wie sie beispielsweise durch eine partielle Komplementarität der siRNAs zu anderen mRNAs entstehen könnten, ausgeschlossen werden. Die deutliche Reduktion der Vitalität nach Verlust von BiP konnte darüber hinaus in beiden Zelllinien unter Anwendung des WST-1 Assays untermauert werden (*Abb. 4.6*). Verglichen mit den Kontrollzellen wiesen die BiP depletierten Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine gegenüber den Kontrollzellen zunehmende Reduktion des WST-1 Signals und somit der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen auf, was wiederum mit einer verminderten Anzahl an vitalen Zellen korrelierte. Anhand der parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Messung nach CFSE-Färbung konnte die Bedeutung von BiP hinsichtlich des Zellwachstums erhärtet werden. Ab 72 h nach siRNA-Transfektion und einem Restproteingehalt an BiP von < 20% waren die Zellen in ihrer Teilung inhibiert (*Abb. 4.4 & 4.5*). Eine Inhibition des Zellwachstums nach Verlust von BiP über siRNA-vermittelte Degradation in HeLa S3-Zellen wurde auch in der Arbeit von Suzuki *et al.* (2007) beschrieben. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzielten Daten wurde hierbei über den Untersuchungszeitraum von neun Tagen ein Anstieg der Zellzahl der BiP depletierten Zellen gemessen. Dies kann dadurch bedingt sein, dass die Zellen subkultiviert wurden bzw. dass die Gesamtzellzahl und nicht die Lebendzellzahl bestimmt wurde. Eine weitere Erklärung könnte die unterschiedliche Effizienz der Depletion von BiP durch die verschiedenen Transfektionsmethoden sein, wobei Differenzen im endogenen Proteingehalt an BiP unterschiedliche Auswirkungen hinsichtlich der Vitalität der Zellen aufweisen könnten. Nach 48 h wurde hierbei nach Transfektion mit der GRP78-1 siRNA ein Restproteingehalt von 17% und nach 96 h von 80% erzielt. Unter Einsatz der GRP78-2 siRNA wurde nach 48 h 17% und nach 96 h 49% an

Protein nachgewiesen. Nach 96 h lag der Proteinlevel gegenüber den in dieser Arbeit gezeigten Daten somit um das ca. 1,6- bzw. 2,7-Fache höher. Nach der durch die Subtilase Cytotoxin (SubAB) verursachten proteolytischen Spaltung zwischen der N-terminalen Nukleotidbindungsstelle und der C-terminalen Substratbindungsstelle von BiP und der somit bedingten Inaktivierung des Proteins (Paton *et al.*, 2006) wurde darüber hinaus auch in Vero-Zellen als Folge von ER-Stress eine Inhibition des Zellwachstums und schließlich ein Zelltod gezeigt (Morinaga *et al.*, 2008). SubAB behandelte Zellen wiesen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase auf, welcher mit der translationalen Inhibition der Synthese des Cyclins D1 sowie der fortschreitenden proteasomalen Degradation des Cyclins assoziiert war (Morinaga *et al.*, 2008).

Eine Folge der akuten Induktion der UPR, der zellulären Antwort auf ER-Stress, ist das Zellwachstum zu inhibieren und bei irreversiblen Schaden die Apoptose einzuleiten (Oyadomari & Mori, 2004; Kim *et al.*, 2006). Über den Nachweis des nach Depletion von BiP beobachteten deutlichen Anstiegs der Synthese von Grp170 und Calnexin (Abb. 4.11 & 4.12), bei denen es sich um UPR-induzierte Proteine handelt, wurden Hinweise auf eine mögliche Induktion der UPR und somit auf ER-Stress erzielt. Nach Induktion der UPR werden in der Zelle verschiedene Signalkaskaden aktiviert, von denen einer zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF6 führt (Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Durch Akkumulation ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine wird ATF6, welches über seine Transmembrandomäne in der Membran des ER verankert ist, zum Golgi transportiert und proteolytisch gespalten. Das N-terminale Fragment von 50 kDa wird anschließend in den Nukleus transloziert, wo es die Transkription von BIP und anderen ER-Stress regulierten Genen induziert (Haze *et al.*, 1999). Der Nachweis dieses Spaltproduktes liefert somit weitere Hinweise auf eine mögliche Induktion der UPR nach Depletion von BiP. Die Versuche, die Aktivierung von ATF6 zu überprüfen, schlugen jedoch auf Grund technischer Schwierigkeiten fehl. Der Nachweis auf Proteinebene mit Hilfe eines kommerziell erworbenen, spezifischen Antikörpers gegen das ATF6-Protein lieferte auch in der Positivkontrolle kein Signal. Dennoch ist es durchaus möglich, dass der ATF6-Signalweg in BiP-depletierten Zellen induziert wird, da dieser bekanntermaßen durch das Hsp70 Chaperon reguliert wird (Zhang *et al.*, 2004). In weiteren Studien BiP depletierter Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass nach Verlust des Proteins zudem der Ire1p-XBP1-Pathway induziert sowie die Expression der UPR-induzierten Gene GRP94 und CHOP erhöht wurde

(Suzuki *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Morinaga *et al.*, 2008). Anhand der SubAB induzierten Depletion von BiP wurde ferner eine Aktivierung des PERK-eIF2 $\alpha$ -Pathways beschrieben (Hu *et al.*, 2009). Dies bestärkt die innerhalb dieser Arbeit erzielten Hinweise auf ER-Stress nach Verlust von BiP. Eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt dazu, dass diese aus dem ER über den ERAD-Pathway zurück ins Cytosol transloziert werden, wo sie anschließend proteasomal degradiert werden. Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt das wichtigste intrazelluläre Proteinabbausystem in Säugern dar, welches das Gleichgewicht von Proteinsynthese, -Qualitätskontrolle und -Abbau gewährleistet und die Verfügbarkeit von Regulatorproteinen für zelluläre Mechanismen kontrolliert (Hilt, 2005). Die nach SDS-Page BiP depletierter Zellen über Western-Blot Analyse durchgeführte immunologische Detektion mittels anti-Ubiquitin Antikörpers ließ keine verstärkte Ubiquitinierung gegenüber den Kontrollzellen erkennen (Daten nicht gezeigt). In Anlehnung an die von Lass *et al.* (2008) gemachte Beobachtung, dass eine Depletion von BiP Defekte im ERAD-Pathway aufwies, könnte der Verlust des Proteins dazu führen, dass die fehlgefalteten Proteine nicht mehr zurück ins Cytosol transportiert werden können. Diese Beobachtung wird von den Daten von Wang *et al.* (2010) bestätigt, die zeigten, dass ein kompletter Verlust von BiP zu einer Reduktion der cytosolischen Ubiquitinierung führte.

Übersteigt das Ausmaß an zellulärem Stress die Gegenmaßnahmen, leitet die Zelle die Apoptose, den programmierten Zelltod, ein (Bateman, 2006). Eine Induktion der Apoptose nach Verlust von BiP konnte mit Hilfe der FITC-konjugierten Annexin V-Färbung nachgewiesen werden. Neben der Aktivierung bestimmter Caspasen (Porter & Jänicke, 1999) ist die Umlagerung von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Plasmamembransicht eines der frühen Ereignisse in apoptotischen Zellen. Die Bindung von Annexin V, einem Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Phospholipid-Bindungsprotein, an Phosphatidylserin ermöglicht somit die Identifizierung von Zellen, welche sich in frühen Stadien der Apoptose befinden. Die Plasmamembran von nekrotischen sowie toten Zellen weist eine poröse Zellmembran auf, was über die zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid detektiert werden kann. Ein Verlust von BiP führte bereits nach 48 h zur Induktion der Apoptose, wodurch die in der Wachstumskurve beobachtete Reduktion der Zellzahl erklärt wurde (*Abb. 4.13*). Über den weiteren Untersuchungszeitraum nahm der Anteil an früh-apoptotischen Zellen bei gleichzeitigem Anstieg an nekrotischen und somit toten Zellen zu. Nach

96 h wies ein Großteil der Zellen bereits eine poröse Zellmembran auf und der Anteil an früh-apoptotischen Zellen sank. Über die parallel zum Nachweis nekrotischer Zellen durchgeführte Messung der LDH-Aktivität wurde der nach Depletion von BiP beobachtete Anstieg an nekrotischen Zellen bestätigt. Die nach Verlust des Hsp70 Chaperons im Kulturüberstand der Zellen zusätzlich beobachtete Zunahme an geschrumpften, abgerundeten, toten Zellen verdeutlicht die essentielle Eigenschaft des Hsp70 Chaperons. Eine Induktion der Apoptose wurde auch in den von Suzuki *et al.* (2007) durchgeführten Studien nach Verlust von BiP in HeLa S3-Zellen nachgewiesen. Hierbei wurde gezeigt, dass erst drei Tage nach Transfektion der Zellen mit einer siRNA zur Degradation der mRNA von BIP die Apoptose induziert wurde. Der Nachweis hierzu wurde über die Aktivität der Caspase-3 und -7 sowie der Detektion von Nukleosomen in cytoplasmatischen Fraktionen nach Färbung mit Propidiumiodid erbracht. Da es sich hierbei z.T. um Marker einer späteren Phase der Apoptose handelt erklärt dies die zeitlich versetzte Induktion des programmierten Zelltodes.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lieferten einen wichtigen Hinweis auf die essentielle Bedeutung von BiP. Hierbei konnte erstmals gezeigt werden, dass nach Depletion des Hsp70 Chaperons die Synthese von Grp170, eines UPR-induzierten Proteins, erhöht ist und dass die Zellen in ihrer Teilung arretiert sind. Trotz Anzeichen auf Aktivierung der UPR zeigt die Induktion der Apoptose und das damit bedingte zunehmende Zellsterben, dass die Funktion des Hsp70 Chaperons durch keine anderen zellulären Komponenten kompensiert werden kann. Ein Hinweis darauf, dass die Funktion von BiP wichtig für die Funktion der eukaryotischen Zelle ist, zeigt auch seine von der Hefe bis zum Menschen evolutionär stark konservierte Aminosäure-Sequenz (Ting *et al.*, 1988).

### 5.1.3 Der Einfluss des Verlustes von BiP auf die Zellmorphologie

Die Morphologie der Zellen wird durch das Cytoskelett aufrechterhalten, wobei die Zellgestalt durch die Aktinfilamente gebildet wird und die Stabilität sowie Elastizität durch die Intermediärfilamente gegeben ist. Die Überprüfung des Einflusses von BiP auf die Zellmorphologie mit Hilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie zeigte, dass sich die Zellen nach Verlust von BiP nicht wesentlich in ihrer Gestalt veränderten (Abb. 4.7 & 4.8). Verglichen mit den Kontrollzellen wiesen die HeLa-Zellen nach

Verlust von BiP eine eher langgezogene Form mit dentritenförmigen Ausläufern auf. Dies kann mitunter durch die fehlende Kontaktinhibition auf Grund der deutlich verminderten Zelldichte erklärt werden, da eine derartige Morphologie auch nach 24 h bei gleicher Zelldichte im Kontrollansatz erkennbar war.

Einen zusätzlichen Hinweis darauf, dass die beschriebene Morphologie der BiP depletierten HeLa-Zellen keine zelluläre Reaktion infolge des Funktionsverlustes des Proteins ist, lieferte der Vergleich der Stabilität der Aktin-bindenden Proteine der ERM-Familie in den depletierten Zellen versus Kontrollzellen. Die ERM-Proteinfamilie besteht aus den drei Eiweißen Ezrin, Radixin und Moesin, deren Aminosäuresequenzen zu etwa 75% übereinstimmen (Miller, 2003). Sie setzen sich aus drei Domänen zusammen: Einer hoch konservierten N-terminalen FERM-Domäne, einer zentralen  $\alpha$ -helicalen Domäne sowie einer C-terminalen Aktin-bindenden Domäne. Die ERM-Proteine agieren als „Linker“-Proteine zwischen der Plasmamembran und dem Aktin-Cytoskelett und sind an der Zelladhäsion sowie der Bildung der Microvilli involviert (Tsukita & Yonemura, 1999). Die Funktion der ERM-Proteine wird hierbei durch eine Änderung ihrer Konformation nach Phosphorylierung eines konservierten Threoninrestes (Koss, 2006) reguliert. Im nicht-phosphorylierten Zustand unterliegt Ezrin einer starken intramolekularen Selbstassoziation und befindet sich vorwiegend gelöst im Cytosol. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Umlagerung und somit zur Bildung von Oligomeren, Anlagerung an die Zellmembran (Bretscher, 1999) und letztlich zur Komplexbildung mit Aktin. Für Radixin konnten Interaktionen mit GNA13 (*Guanine nucleotide-binding subunit alpha 13*) (Vaiskunaite et al., 2000), für Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) unter anderem mit dem Transmembranprotein CD43 oder dem vasculären Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 (Serrador et al., 1998; Barreiro et al., 2002) nachgewiesen werden. Nach Verlust von BiP konnten keine Unterschiede im Proteinmuster der ERM-Proteine detektiert werden, was die Annahme, dass die beobachtete morphologische Veränderung auf Grund der fehlenden Kontaktinhibition zustande kam, erhärtet. Die nach Verlust von BiP in PC3-Zellen beobachtete, leicht längliche Form ist ebenfalls durch die geringere Zelldichte begründbar. Dass der Verlust des Hsp70 Chaperons keine morphologischen Auswirkungen aufweist, bestätigt ferner die von Suzuki et al. (2007) erhobenen Daten welche ebenfalls zeigten, dass nach siRNA-vermittelter Degradation von BiP keine morphologischen Veränderungen erkennbar waren. Die

zuvor nach Verlust des Hsp70 Chaperons beobachtete Induktion der Apoptose konnte zellmorphologisch somit nur durch Zunahme an abgerundeten, geschrumpften, toten Zellen im Kulturüberstand gezeigt werden. Morphologische Charakteristika des programmierten Zelltodes wie Kernfragmentierung oder Ausstülpungen der Plasmamembran wurden nicht detektiert.

Mit Hilfe der in *Abb. 4.10* aufgeführten ER-Färbung konnte zudem gezeigt werden, dass ein Verlust von BiP keinen Einfluss auf die ER-Morphologie ausübt. Auf Grund der beschriebenen Beteiligung von BiP bei der korrekten Faltung neu synthetisierter Proteine sowie der ER-assoziierten Degradation könnte ein Verlust dieser Funktionen eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER bewirken, in deren Folge es beispielsweise zu einer massiven Expansion des Kompartimentes hätte kommen können. Eine veränderte Synthese ER-strukturelevanter Proteine wäre ebenfalls denkbar gewesen.

#### 5.1.4 Der Einfluss des Verlustes von BiP auf den Proteintransport

Für BiP wurde bereits anhand von *in vitro* Studien eine Beteiligung während der co- und posttranslationalen Insertion von Vorläuferproteinen in das ER beschrieben (Dierks *et al.*, 1996). Studien in der Hefe und anhand von Proteoliposomen des Säugers verdeutlichten, dass das Chaperon an der Komplettierung der Proteintranslokation involviert ist (Lyman & Schekman, 1995; Tyedmers *et al.*, 2003). Die Doktorarbeit von M. Diaz de Escauriaza (2006) zeigte, dass die Anwesenheit von BiP den Netto-Transport sekretorischer Proteine in das Lumen von Proteoliposomen erhöht, indem das Chaperon sowohl den Transport in Richtung Lumen dirigiert (Ratchet Mechanismus) als auch den Export der bereits translozierten Proteine zum Cytosol verhindert (Trapping Mechanismus). Es wurde zudem eine direkte Interaktion von BiP mit dem Substrat gezeigt (Tyedmers, 2001; Tyedmers *et al.*, 2003). Mutationsstudien in Hefen haben eine für den co- und posttranslationalen Transport essentielle Funktion von Kar2p, dem Homolog zu BiP, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben (Vogel *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1991; Brodsky *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde eine Blockade der Translokation nach vollständiger Inaktivierung von BiP in nativen mikrosomalen Membranen beschrieben (Klappa *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.*, 1991). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten BiP depletierten Zelllinien sollten

erstmalig die Rolle des Chaperons für den Proteintransport in Säugerzellen aufzeigen. Die Transportstudien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (22 h, 46 h, 70 h) durchgeführt um einerseits zu überprüfen, ab welchem Zeitpunkt und andererseits ab welchem Restproteingehalt an BiP ein möglicher Effekt eintritt. In Anlehnung an die zuvor beschriebenen Wachstums- und Vitalitätsversuche, die zeigten, dass der Verlust von BiP ab drei Tagen und einem Restproteingehalt von < 20% letal war, wurden die Transportstudien nur bis 70 h nach siRNA-Transfektion und einer Proteinkonzentration von ca. 20% durchgeführt, womit der optimale Zeitpunkt der maximalen Proteinreduktion nicht erzielt werden konnte. Die Depletion von BiP zeigte hierbei keine negativen Auswirkungen auf den Proteinimport in das ER von Säugerzellen, wie anhand der Transportstudien mit den Substraten Präprolaktin und Aryl-Sulfatase A (Abb. 4.14 & 4.15) sowie der Messung der Lumineszenz der *Gaussia* Luziferase gezeigt wurde. Eine Beteiligung von BiP am Proteinimport in das ER von Säugerzellen konnte somit nicht belegt werden. Eine mögliche Erklärung könnte in dem verbliebenen endogenen Restproteingehalt an BiP liegen. Die Proteinkonzentration könnte demnach ausreichend sein, den Proteinimport in das ER aufrechtzuerhalten. *In vitro* Studien mit Proteoliposomen aus isolierten Komponenten und ohne BiP veranschaulichten, dass der Transport auch in Abwesenheit des Hsp70 Chaperons, wenn auch nicht mit der maximalen Effizienz, stattfinden kann (Görllich & Rapoport, 1993). In Kombination mit der zusätzlich gezeigten Eigenschaft des Proteins, den Netto-Transport ins Lumen der Vesikel zu fördern (Diaz de Escauriaza, 2006), könnte der Restproteingehalt an BiP für die Stimulation des Transportes ausreichend sein, sodass gegenüber den Kontrollzellen keine wesentlichen Unterschiede in der Effizienz erkennbar sind. Dieser Aspekt wird durch die von Dong *et al.* (2008) gemachte Beobachtung verstärkt, wonach eine Suppression des Levels an BiP um 50% in Mäusen keinen Effekt auf die Antikörpersekretion hatte. Darüber hinaus wäre auch vorstellbar, dass ein zusätzlicher, alternativer BiP-unabhängiger Importmechanismus in den Zellen existiert, welcher den Transport bestimmter Substrate vermittelt. In der Hefe gibt es beispielsweise mit Ssh1p ein Sec61p-Homolog, welches gemeinsam mit Sbh2p und Sss1p eine alternative trimere Translokationspore in der ER-Membran (Finke *et al.*, 1996) darstellt, dessen genaue Funktion allerdings noch ungeklärt ist. Eine Substratspezifität wäre ebenfalls vorstellbar. So wurde beispielsweise in der Arbeit von Hu *et al.* (2009) gezeigt, dass eine durch SubAB vermittelte Degradation von BiP

in B-Lymphozyten die Sekretion des Immunglobulins IgM blockiert, während die Translokation anderer sekretorischer Proteine wie IL-6 unbeeinflusst war. Obgleich auch die SubAB Behandlung von HepG2-Zellen eine Inaktivierung von BiP bewirkte, war hierbei beispielsweise die Proteinsekretion von Albumin unbeeinträchtigt (Hu *et al.*, 2009). Durch Transportstudien mit weiteren Substraten könnte diese Hypothese weiter untersucht werden.

Die bereits bei einem Restproteingehalt an BiP von 20% beschriebene Letalität scheint demnach nicht die Folge einer Blockade des Proteinimportes zu sein. Vielmehr könnte eine Kombination mehrerer Funktionsverluste, zu denen auch Defekte in der ER-assoziierten Degradation, wie von Lass *et al.* (2008) beschrieben, zählen könnten, zum Zelltod führen.

Innerhalb dieser Arbeit ist es überdies gelungen, BiP über Plasmidtransfektion erfolgreich in Säugierzellen überzuproduzieren. Eine Überexpression zeigte hierbei keine Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen. Hinweise auf ER-Stress ergaben sich ebenfalls nicht. Dieses Plasmid eignet sich somit für weiterführende Studien wie beispielsweise zum Nachweis, ob der nach Verlust von BiP beobachtete Wachstumsarrest durch exogene Zugabe des Proteins komplementiert werden kann. Mit solchen Komplementationsstudien wurde im Rahmen dieser Arbeit begonnen, allerdings konnten hierzu die optimalen Versuchsbedingungen noch nicht erzielt werden.

## 5.2 Charakterisierung der Rolle von Kar2p in Säugerzellen

Kar2p, das Hefeortholog zu BiP, wurde ursprünglich durch eine Mutation, *kar2-1*, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche unter allen Temperaturen einen ausgeprägten Defekt bei der Fusion der Kerne bewirkte, beschrieben (Polaina & Conde; 1982; Rose *et al.*, 1989). Diese Mutanten wuchsen bei erhöhten Temperaturen nur langsam, wodurch eine Rolle von *KAR2* für einige grundsätzliche zelluläre Prozesse nahegelegt wurde. Geninaktivierungsstudien bewiesen, dass *KAR2* essentiell für mitotische Zellteilung ist (Rose *et al.*, 1989; Normington *et al.*, 1989). Eine essentielle Bedeutung während des Proteintransportes wurde ebenso beschrieben (Vogel *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1991; Brodsky *et al.*, 1995; Young *et al.*, 2001).

Untersuchungen von Alder *et al.* (2005) haben gezeigt, dass Kar2p in Säugermikrosomen BiP beim Schließen der Translokationspore nicht ersetzen kann und zudem in Anwesenheit von BiP einen dominant-negativen Effekt hinsichtlich des Verschließens des Kanals bewirkt. Dieser Effekt wurde dadurch erklärt, dass Kar2p möglicherweise irreversibel an putative Bindungspartner am Translokon bindet und somit eine Interaktion mit BiP verhindert. Alternativ dazu könnte, sofern eine Dimerisierung von BiP für das Verschließen nötig wäre, eine Interaktion von Kar2p mit BiP unwirksame Dimere bilden.

Für das Verschließen des Translokons muss BiP in der ADP-gebundenen Form vorliegen, während das Öffnen die ATP-gebundene Form benötigt. Zudem wurde während des Verschließens auch eine Interaktion von BiP mit einem membrangebundenen Protein mit einer J-Domäne nachgewiesen (Alder *et al.*, 2005). Anhand der in der Arbeit von Weitzmann (2006) durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass Kar2p sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ATP mit den Säuger-Hsp40-Proteinen Erj1p und ERj2p interagieren kann. Eine auf Grund der fehlenden ATP-Regulation mögliche dauerhafte Bindung an die J-Proteine und einer dadurch bedingten Verdrängung von BiP an dessen Interaktionspartner konnte durch einen Bindungsversuch ausgeschlossen werden. Durch gleichzeitige Inkubation von BiP und Kar2p mit einer immobilisierten J-Domäne von ERj1p bzw. ERj2p wurde gezeigt, dass BiP offenbar eine stärkere Affinität als Kar2p zu den J-Proteinen aufweist. Eine Interaktion mit Sec63 und Grp170 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Wie dieser dominant-negative Effekt beim Verschließen der Translokationspore zustande kommt, konnte bislang nicht geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich in Säugerzellen ebenfalls ein dominant-negativer Effekt von Kar2p hinsichtlich der Funktion von BiP nachweisen lässt. Der Nachweis wurde anhand der Transfektion von PC3-Zellen mit einem Plasmid, welches *KAR2* codiert, über *in vitro* Synthese von Modellsubstraten und anschließender Sequestrierung in permeabilisierte PC3-Zellen erbracht. Ein derartiger Effekt würde unter dem Aspekt, dass BiP für den Proteinimport nötig ist, dazu führen, dass dieser gestört ist.

Die DNA von *KAR2* wurde hierfür in das Säugerexpressionsplasmid pAcGFP1-N1 unter die Kontrolle eines konstitutiven Promotors kloniert. Der Nachweis der Transfektionseffizienz konnte mit Hilfe eines anti-Kar2-Antikörpers erzielt werden. Parallel hierzu wurde *KAR2* zusätzlich in den pAcGGSM2-IRES/GFP-Vektor eingesetzt, was eine Bestimmung der Transfektionseffizienz über die Expression von *GFP* ermöglicht. Vorteil dieses *GFP*-exprimierenden Plasmids ist, dass *GFP* nach einer IRES-Sequenz synthetisiert wird, wodurch kein Kar2/GFP-Fusionsprodukt entsteht, welches die eigentliche Funktion von *KAR2* beeinträchtigen könnte. Kar2p wurde, wie anhand der Western-Blot Analyse gezeigt, erfolgreich sowohl in HeLa- als auch in PC3-Zellen synthetisiert (*Abb. 4.20*). Die Importfähigkeit in das Säuger-ER konnte über *in vitro* Transport in Säuger-RMs gezeigt werden (*Abb. 4.19*).

Eingangs wurde untersucht, inwiefern sich die Synthese von Kar2p auf die Vitalität der Zellen auswirkt. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass das Protein in Säugerzellen keine Auswirkungen auf die Zellvitalität hatte. Über eine Bestimmung der Lebendzellzahl *KAR2* exprimierender Zellen konnte während des Untersuchungszeitraumes von 72 h im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Wachstumsänderungen festgestellt werden. Die Bestimmung der Vitalität mittels WST-1 Assays zeigte nach 72 h eine geringfügige Reduktion des WST-1 Signals. Diese konnte jedoch durch die Zellzahlbestimmung nicht bestätigt werden, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um einen vernachlässigbaren Effekt handelt. Überdies konnte kein Anstieg der intrazellulären Konzentration an Grp170 detektiert werden, was einen möglichen Hinweis auf ER-Stress durch die Expression von *KAR2* gegeben hätte.

Die Expression von *KAR2* zeigte keine negativen Auswirkungen auf den Proteinimport in das ER von Säugerzellen, wie anhand der Transportstudien mit den Substraten Präprolaktin und pGluc sowie der Messung der Lumineszenz der *Gaussia* Luziferase gezeigt wurde (*Abb. 4.23 - 4.25*). Die Sequestrierungsstudien zeigten,

dass trotz Expression von *KAR2* das Substrat Präprolaktin zu Prolaktin mit gleicher Effizienz wie in den Leervektor-transfizierten Zellen prozessiert und somit importiert wurde. Der gleiche Effekt wurde zudem in den Studien mit pGluc erzielt. Die aus den Quantifizierungsdaten erhobenen geringfügigen Unterschiede in der Prozessierungs- und Transportrate sind auf methodische Fehlertoleranzen zurückzuführen. In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Transporteffizienz über die Bestimmung der Lumineszenz der *Gussia* Luziferase bestimmt. Luziferasen sind Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen reagieren. Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz, welche im Luminometer gemessen werden kann. Die Luziferase pGluc kann nur nach vollständigem Import und korrekter Faltung ihre lumineszierenden Eigenschaften entfalten, was somit neben dem Nachweis des Importes auch eine Überprüfung der Proteinfaltung ermöglicht. Diese Versuchsreihe zeigte ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede in der gemessenen Lumineszenz zwischen den *KAR2* exprimierenden Zellen und den Kontrollzellen. Mit Hilfe dieser Transportstudien konnte demnach ein dominant-negativer Effekt hinsichtlich des Proteinimportes nicht belegt werden. Dies erlaubt folgende Hypothesen: I. Der *in vitro* beschriebene dominant-negative Effekt wirkt sich nur auf die Funktion von BiP hinsichtlich des Verschließens des Translokons aus. Somit würde die Pore geöffnet und der Proteinimport unbeeinflusst bleiben. II. Das Hefehomolog unterstützt durch alternierende Bindung die Funktion von BiP beim Proteintransport. Anhand von Bindungsversuche konnte bereits eine Interaktion von Kar2 mit Hsp40-Proteinen des Säugers sowie mit Grp170 gezeigt werden (Weitzmann, 2006). III. In den Zellen existiert zudem ein BiP-unabhängiger Importmechanismus. In der Hefe wurde beispielsweise mit Ssh1p ein Struktur- und Sequenzhomolog zu Sec61p beschrieben, welches einen alternativen Kanal in der ER-Membran darstellt (Finke *et al.*, 1996). Dieser Kanal könnte Sec61-unabhängig agieren, um somit die Insertion von Proteinen in Abwesenheit von BiP zu gewährleisten. In Peroxisomen wurde so beispielsweise ein Sec61-unabhängiges Translokons beschrieben, wonach die Bindung von gefalteten und oligomerisierten Proteinen an einen löslichen Rezeptor in der Membran die Assemblierung eines Translokons induziert (Schnell & Hebert, 2003). IV. Das in dieser Arbeit in den Zellen synthetisierte Kar2p ist nicht funktionsfähig. Letzteres könnte mittels ATPase-Assays überprüft werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente hinsichtlich des Einflusses von Kar2p auf die Funktion von BiP konnten somit keinen dominant-negativen Effekt in Säugorzellen belegen. Der *in vitro* beobachtete Effekt lässt sich demnach nicht auf alle Funktionen von BiP in Säugorzellen übertragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *KAR2* über Plasmidtransfektion erfolgreich in Säugorzellen exprimiert. Die hierbei erzielte Transfektionseffizienz belief sich auf über 80%. Der Import in das ER konnte über *in vitro* Transportstudien in Säugermikrosomen belegt werden. Proliferations- bzw. Vitalitätsstudien haben ferner gezeigt, dass Kar2p keine negativen Einflüsse auf das Wachstumsverhalten sowie die Vitalität der Zellen hatte. Infolgedessen konnte ein Zellkultursystem etabliert werden, welches für weiterführende Studien eingesetzt werden kann. Insbesondere die Fragestellung, ob möglicherweise der durch Verlust von BiP gezeigte letale Effekt durch Kar2p kompensiert werden kann, kann hiermit untersucht werden.

## 5.3 Charakterisierung der Rolle von Sil1

Sil1 stimuliert als Nukleotidaustauschfaktor von BiP dessen ATPase-Aktivität, indem es die Freisetzung von ADP begünstigt (Tyson & Stirling, 2000; Kabani *et al.*, 2000, Chung *et al.*, 2002). Klinische Studien haben gezeigt, dass Mutationen im *SIL1*-Gen mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. So wurde für das Marinesco-Sjögren-Syndrom (MSS) Mutationen im *SIL1*-Gen, welche vermutlich zu einem Verlust von funktionalem Sil1 führen, als Ursache ausgemacht. Die Mutationen weisen hierbei eine starke Heterogenität auf, wie beispielsweise eine 331C nach T Substitution (Anttonen *et al.*, 2005; Senderek *et al.*, 2005), eine 4-Nukleotidduplikation (506\_509dupAAGA) im Exon 6 (Anttonen *et al.*, 2005) oder eine Insertion von G an der Position 936\_937 im Exon 9 (Eriguchi *et al.*, 2008). Die „woozy“-Mäuse wiesen nach Mutation von *SIL1* durch ER-Stress eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen sowohl im ER als auch im Zellkern und als Folge eine Degeneration der Purkinje-Zellen in den Lobuli I-VIII des Cerebellums auf. Auffällig hierbei ist, dass nur Mutationen von *SIL1* in den Lobuli I-VIII zu einer Degeneration führen, während die Lobuli IX und X davon unbeeinflusst bleiben. Da angenommen wird, dass die durch Funktionsverlust von Sil1 beobachteten Folgen auf eine gestörte Funktion des Hsp70 Chaperons BiP zurückzuführen sind, wäre möglich, dass in diesen Bereichen ein alternativer Nukleotidaustauschfaktor wie Grp170 den Funktionsverlust von Sil1 kompensieren kann (Weitzmann *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Anwendung verschiedener zellbasierter Assays erstmals die Funktion von Sil1 in Säugerzellen insbesondere im Hinblick auf das Zellwachstum und den Proteinimport näher untersucht. Ziel war es, weitere Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen einer gestörten Funktion von *SIL1* und den klinischen Auffälligkeiten der MSS-Patienten sowie den „woozy“-Mäusen zu erlangen.

### 5.3.1 Sil1-depletierte Zelllinien

Um die Funktion des Nukleotidaustauschfaktors auf zellulärer Ebene erstmals charakterisieren zu können, wurde auf Basis der RNA-Interferenztechnologie eine Zelllinie geschaffen, in der Sil1 depletiert ist. In Anlehnung an die bereits im Labor etablierten Depletionsstudien wurden hierzu HeLa-Zellen eingesetzt. Der zelluläre Gehalt des Proteins konnte hierbei unter Verwendung von verschiedenen siRNAs

effektiv minimiert werden. Die optimale Proteinreduktion wurde nach 72 h mit weniger als 10% an endogenem Sil1 erreicht (*Abb. 4.26*). Die auf Proteinebene gezeigte Depletion des Nukleotid austauschfaktors konnte zudem über RT-PCR auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie gelang zudem der Nachweis der Proteinreduktion nach siRNA-Transfektion unter Verwendung eines anti-Sil1-Antikörpers. Während die Kontrollzellen eine intensive Färbung mit sichtbarer Aussparung des Zellkerns zeigten, war die Intensität der Fluoreszenzfärbung in den Sil1 depletierten Zellen deutlich reduziert (*Abb. 4.27*). Somit konnte ein Zellkultursystem etabliert werden, welches für weitere Studien zur Identifizierung solcher Faktoren, die die nach Verlust von Sil1 beschriebenen Phänotypen bedingen, eingesetzt werden kann.

### 5.3.2 Auswirkungen des Verlustes von Sil1 auf das Zellwachstum und die zelluläre Stressreaktion

Mit Hilfe von Wachstums- und Vitalitäts-Assays konnte für Sil1 eine essentielle Bedeutung für die Zellvitalität in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Über die Lebendzellzahl-Bestimmung Sil1 depletierter Zellen versus Kontrollzellen zeigte sich, dass die Depletion des Nukleotid austauschfaktors zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Zellwachstums führte. 72 h nach siRNA-Transfektion und einer endogenen Proteinkonzentration von weniger als 10% war das Zellwachstum im Vergleich zu dem der Kontrollzellen deutlich reduziert, während es im weiteren Verlauf nahezu stagnierte. Erst ab 168 h bei gleichzeitigem Anstieg der endogenen Proteinkonzentration von Sil1 wurde ein leichter Anstieg der Zellzahlen gemessen. Die gleiche Beobachtung wurde durch Bestimmung der Zellvitalität anhand des Real-Time Cell Analyzer Systems xCELLigence (Roche Applied Science) erzielt. Diese Daten konnten zudem durch Nachweis einer möglichen Induktion der Apoptose oder Nekrose nach Verlust des Nukleotid austauschfaktors in HeLa-Zellen bestätigt werden. Mit Hilfe der FITC-konjugierten Annexin-V Färbung wurde keine Induktion der Apoptose gemessen. Der Anteil an nekrotischen bzw. toten Zellen war dagegen nach 72 h im Vergleich zu dem der Kontrollzellen leicht erhöht, wie anhand der Propidiumiodid-Färbung bzw. des LDH-Assays gezeigt wurde. Diese minimale Erhöhung an nekrotischen Zellen wirkt sich auf die Gesamtzellzahl betrachtet nur unwesentlich aus und deckt sich insofern mit dem zuvor gezeigten

Wachstumsverhalten, wonach ab 72 h nach siRNA Transfektion bei einer Proteinkonzentration von < 10% kein wesentlicher Anstieg in der Zellzahl gemessen wurde. Durch Einsatz verschiedener siRNAs mit Spezifität für dieselbe mRNA wurden „off-target“-Effekte ausgeschlossen. Eine deutliche Reduktion der Vitalität nach Verlust von Sil1 bei einem Restproteingehalt von weniger als 10% wurde zudem mit Hilfe des WST-1 Assays gezeigt (*Abb. 4.28*). Verglichen mit den Kontrollzellen wiesen die Sil1 depletierten Zellen eine um 40% verminderte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, und somit eine deutlich reduzierte Anzahl vitaler Zellen, auf. Über die parallel durchgeführte CFSE-Färbung wurde die Bedeutung des Nukleotidaustauschfaktors hinsichtlich des Zellwachstums erhärtet. Ab 72 h nach siRNA-Transfektion und einer endogenen Proteinkonzentration von < 10% waren die Zellen in ihrer Teilung inhibiert. Nach 144 h bei Zunahme der endogenen Proteinkonzentration begannen sich die Zellen wieder zu teilen (*Abb. 4.28*). Im Gegensatz zu den BiP depletierten Zellen führt der Verlust des Nukleotidaustauschfaktors zu keiner irreversiblen Zellschädigung. Es ist anzunehmen, dass der gezeigte Wachstumsarrest in unmittelbarem Zusammenhang mit der gestörten Funktion des Hsp70 Chaperons BiP steht. Als Nukleotidaustauschfaktor reguliert Sil1 die Aktivität von BiP, indem es durch Stimulation der ATPase-Aktivität die Freisetzung von gebundenem ADP begünstigt und somit die Substratfreisetzung ermöglicht (*Chung et al., 2002*). Defekte innerhalb dieses ATP/ADP-Austauschzyklus resultieren in einer veränderten Substratbindung und -Freisetzung, was eine Akkumulation ungefalteter Proteine und letztlich ER-Stress bewirkt (*Gething, 1999; Zhao & Ackerman, 2006*). Die zelluläre Antwort auf ER-Stress besteht in der Aktivierung der UPR. Durch Dissoziation von BiP von den ER-Transmembranrezeptoren IRE1, ATF6 und PERK werden diese aktiviert und nachgeschaltete Signalkaskaden induziert. *SIL1* selbst steht nicht unter der Kontrolle der UPR. Dies konnte anhand von Studien in HepG2-Zellen von *Chung et al. (2002)* gezeigt werden, wobei die intrazelluläre Proteinkonzentration von Sil1 nach Behandlung mit Tunicamycin sank. Eine veränderte Stressantwort nach Depletion von Sil1 wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nicht beobachtet.

Nach Verlust von Sil1 konnte in HeLa-Zellen nur eine mäßige Induktion der UPR nachgewiesen werden (*Abb. 4.31*). Während die Syntheserate der UPR-induzierten Proteine Grp170, Calnexin sowie Calretikulin keine wesentlichen Unterschiede zwischen den depletierten Zellen und den Kontrollzellen erkennen ließ, war die

Proteinkonzentration von BiP minimal erhöht. Eine konstitutive Aktivierung einer „low-level“ UPR wurde auch in Hefen nach Verlust von Sil1 über einen *UPRE-lacZ* Reporter-gen-Assay beschrieben (Tyson & Stirling, 2000). Zhao *et al.* (2005) beobachteten zudem in *sill1* Hefen sehr geringe Level an konstitutivem „splicing“ von *HAC1* mRNA.

Die nur mäßig nachweisbare Induktion der UPR könnte darauf zurückzuführen sein, dass BiP auf Grund der unterbundenen Hydrolyse von ATP in der ADP-gebundenen Form an die Regulatoren des UPR-Signalweges gebunden bleibt, wodurch deren Rekrutierung und somit die Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden unterblieb. Diese Hypothese konnte jedoch widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass in Sil1 depletierten Zellen nach Induktion von ER-Stress durch Zugabe von Tunicamycin, einem Inhibitor der Proteinglykosylierung, die Synthese an BiP verglichen mit der ungestressten Zellen deutlich anstieg (Daten nicht gezeigt). Somit wurde bewiesen, dass nach Depletion von Sil1 die UPR induziert werden kann. Dies bestätigt sich zudem durch die in den Purkinje-Zellen der Lobuli I-VIII der „woozy“-Mäuse nachweislich erhöhte Expression der UPR-induzierten Gene *BIP* und *CHOP* (Zhao *et al.*, 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Funktion von BiP hinsichtlich der Aktivierung der UPR unabhängig vom ADP-ATP-Bindungszustand ist. Darüber hinaus könnte in diesen Zellen ein alternativer Nukleotidaustauschfaktor wie beispielsweise Grp170 einen funktionalen Komplex mit BiP bilden und somit dessen Nukleotidaustausch sicherstellen.

Analog zu den Daten von Zhao *et al.* (2005), die zeigten, dass der Verlust von Sil1 eine Akkumulation ubiquitinerter Proteine in Purkinje-Zellen des Cerebellums der Lobuli I-VIII der „woozy“-Mäuse bewirkte, konnte auch in dieser Arbeit eine verstärkte Ubiquitinierung nach Verlust des Proteins in HeLa-Zellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass mitunter infolge einer gestörten Funktion der Substratbindung und -Freisetzung von BiP die Proteinfaltungskapazität im ER vermindert ist, in deren Folge es nach Anhäufung ungefalteter sowie fehlgefalteter Proteine zur verstärkten Retrotranslokation ins Cytosol kommt, wo deren Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung erfolgen. Die Retrotranslokation ungefalteter sowie fehlgefalteter Proteine wäre demzufolge BiP-unabhängig. Eine geringe Last an ungefalteten bzw. fehlgefalteten Proteine im ER könnte für die mäßige Induktion der UPR verantwortlich sein. Das derzeitige Modell des ERAD schlägt verschiedene Wege des Abbaus der ungefalteten bzw. fehlgefalteten Proteine

in Abhängigkeit von der Lokalisierung der Fehlfaltung im Substrat vor. Hierbei gibt es neben dem ERAD-M („membrane“) noch das ERAD-C („cytosol“) sowie das ERAD-L („lumen“) Modell (Carvalho *et al.*, 2006; Denic *et al.*, 2006; Vashist & Ng, 2004). Demnach wäre vorstellbar, dass einer dieser Wege auch BiP-unabhängig verläuft. Für das „tail-anchored“ ER-Membranprotein Ubc6p wurde bereits eine Sec61p-unabhängige Retrotranslokation beschrieben, welche mitunter auch BiP/Kar2p-unabhängig verläuft (Walter *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals in humanen Zellen die Funktion von Sil1 näher beschrieben werden. Der gezeigte Wachstumsarrest nach Depletion des Proteins verdeutlicht, dass der Nukleotidaustauschfaktor essentiell für die Proliferation von HeLa-Zellen ist und dass der Verlust des Proteins nicht kompensiert werden kann. Die von Weitzmann *et al.* (2007) beschriebene Funktion von Grp170 als alternativen Nukleotidaustauschfaktor zu Sil1 zu agieren und somit den Funktionsverlust zu kompensieren, konnte demnach in HeLa-Zellen nicht gezeigt werden. Dass Grp170 die Funktion von Sil1 in HeLa-Zellen nicht ausgleicht, konnte zudem durch Bestimmung der Lebendzellzahl von Zellen, in denen Sil1 und Grp170 gleichzeitig depletiert wurden, bestätigt werden. Unter diesem Gesichtspunkt wäre zu erwarten gewesen, dass ein Verlust beider Proteine den Phänotyp verstärkt. Gegenüber den Sil1 depletierten Zellen zeigten die Zellen nach Verlust beider Nukleotidaustauschfaktoren jedoch kein verändertes Wachstumsverhalten (Daten nicht gezeigt). Zudem wäre auch denkbar gewesen, dass durch Verlust von Sil1 die Synthese von Grp170 hochreguliert werden würde, was ebenfalls nicht der Fall war. Dies impliziert, dass Sil1 der Haupt-Nukleotidaustauschfaktor von BiP in HeLa-Zellen ist.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, gibt es Zellen, in denen der Verlust von Sil1 zu einem Wachstumsarrest führt. Dies könnte trotz der angenommenen zellspezifischen Wirkung des Proteins mitunter auch eine Rolle bei der bei MSS-Patienten angeborenen Kleinhirnatrophie spielen (Anttonen *et al.*, 2005; Senderek *et al.*, 2005).

Die Purkinje-Zellen des Cerebellums der Lobuli I-VIII der „woozy“-Mäuse entwickelten eine Neurodegeneration mit Merkmalen der Apoptose und Autophagie (Zhao *et al.*, 2005), während der Verlust von Sil1 in HeLa-Zellen zur Inhibition des Zellwachstums führte. Die durch den Restproteingehalt verbleibende

Nukleotidaustausch-Aktivität von Sil1 könnte demnach ausreichend sein, die Funktion von BiP nicht vollends zu unterbinden. Eine Depletion des Nukleotidaustauschfaktors in den Purkinje-Zellen der Lobuli IX & X hatte dagegen keine derartigen Folgen. Eine mögliche Erklärung für diese selektive Betroffenheit wäre zum einen eine zellspezifische Expression von *SIL1* und zum anderen die Existenz zusätzlicher Komponenten mit funktioneller Redundanz. Diese Eigenschaft könnte beispielsweise Grp170 aufweisen. Dass Grp170 und Sil1 teilweise redundante Funktionen in den Neuronen aufwiesen, konnte durch eine Überexpression von Grp170 in Sil1-defizienten Purkinje-Zellen nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2010). Diese Arbeiten hatten gezeigt, dass die Überexpression von Grp170 die Degeneration der Purkinje-Zellen unterband.

Um ein zellspezifisches Vorkommen von Sil1 zu überprüfen, wurde der Gehalt des Nukleotidaustauschfaktors auf mRNA-Ebene in verschiedenen Zelllinien untersucht und auf den Gehalt in HeLa-Zellen normiert. Die Quantifizierungsdaten ließen erkennen, dass LnCaP-Zellen ca. 2,5-mal soviel *SIL1* spezifische mRNA wie HeLa-Zellen aufweisen, wohingegen PC3-Zellen nur etwa ein Fünftel enthalten (Abb. 4.37). Auf Proteinebene konnte in PC3-Zellen kein Sil1 nachgewiesen werden (Abb. 4.38). Der Gehalt in den übrigen Zelllinien (DU145, TX3868, H1299, MVF7, HT29, HT1080) war ähnlich zu dem in HeLa-Zellen. Um zu überprüfen, inwiefern sich Unterschiede in der Menge an Grp170 in PC3-Zellen gegenüber den Zellen, welche viel *SIL1* exprimieren, ergeben, was Hinweise auf eine funktionelle Redundanz liefern würde, wurde die Menge an Grp170 auf Proteinebene in HeLa-, PC3-, DU145- und LnCap-Zellen miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Proteinkonzentration von Grp170 in PC3-, DU145- und LnCaP-Zellen gegenüber den HeLa-Zellen gleichermaßen um das ca. 1,5 - 1,6-Fache erhöht war.

Diese Ergebnisse lieferten somit einen wesentlichen Hinweis auf ein zell-/gewebespezifisches Vorkommen der beiden Nukleotidaustauschfaktoren. Während *GRP170* in allen untersuchten Zelllinien exprimiert wurde, konnte für *SIL1* eine zellspezifische Expression aufgezeigt werden. Die Beobachtung, dass auch innerhalb verschiedener Zelllinien eines Gewebes große Unterschiede im Gehalt an *SIL1* mRNA erkennbar waren, erklärt mitunter die in den „woozy“-Mäusen gezeigte zellspezifische Betroffenheit. Dass trotz fehlendem Sil1 in PC3-Zellen gegenüber den LnCaP-Zellen keine veränderte Synthese von Grp170 beobachtet wurde, deutet darauf hin, dass dieses Protein Sil1-unabhängig agiert.

Durch Klonierung von *SIL1* in den Vektor pAcGGSM2-IRES/GFP ist es überdies gelungen, *SIL1* erfolgreich in Säugerzellen überzuexprimieren (*Abb. 4.34*). Verglichen mit den Kontrollzellen wurde auf Proteinebene nach 72 h etwa zehnmal mehr an Sil1 detektiert. Die erzielte Transfektionseffizienz lag bei über 85%. Proliferations- sowie Vitalitätsstudien durch Bestimmung der Lebendzellzahl bzw. anhand des WST-1 Assay ließen keine negativen Auswirkungen der Überexpression von *SIL1* erkennen. Hinweise auf Induktion der UPR durch ER-Stress ergaben sich ebenfalls nicht (*Abb. 4.36*). Eine erhöhte Proteinkonzentration der UPR-induzierten Marker BiP und Grp170 konnte nicht gemessen werden. Das Plasmid kann somit für weiterführende Studien wie beispielsweise zum Nachweis, ob der nach Verlust von Sil1 beobachtete Wachstumsarrest durch exogene Zugabe des Proteins komplementiert werden kann, eingesetzt werden. Anhand des „Large Envelope“ Proteins des Hepatitis B Virus konnte zudem gezeigt werden, dass eine Überexpression von *SIL1* eine inhibitorische Funktion zu BiP aufweist, indem nachweislich der Komplex aus BiP und post-translational importierten Proteinen destabilisiert ist (*Awe et al., 2008*). Ob sich dieser Effekt auch auf den co-translationalen Proteinimport in HeLa-Zellen übertragen lässt, könnte mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmids über *in vitro* Synthese von Substratproteinen wie ppL oder pGluc und Transportstudien in das ER permeabilisierter Zellen untersucht werden.

### 5.3.3 Der Einfluss des Verlustes von Sil1 auf die Zellmorphologie

Mit Hilfe der Sil1-depletierten Zellen sollte zudem untersucht werden, inwiefern sich die Depletion des Nukleotidaustauschfaktors auf die Morphologie der Zellen auswirkt. Für BiP konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verlust zu keiner veränderten Morphologie der Zellen führt. In Anlehnung an die Vermutung, dass die Depletion von Sil1 mit einer gestörten Funktion des Hsp70 Chaperons einhergeht, wären nach Depletion des Nukleotidaustauschfaktors keine morphologischen Veränderungen zu erwarten. Die Untersuchungen zum Einfluss von Sil1 auf die Zellmorphologie zeigten, dass ein Verlust des Proteins zu keiner morphologischen Veränderung der Zellen führte (*Abb. 4.29*). Verglichen mit den Kontrollzellen wiesen die HeLa-Zellen nach Depletion von Sil1 zwar eine eher langgezogene Form mit dentritenförmigen Ausläufern auf, was jedoch analog zu den Daten der BiP-

depletierten Zellen durch die fehlende Kontaktinhibition auf Grund der deutlich verminderten Zelldichte zu erklären ist. Morphologische Charakteristika des programmierten Zelltodes wie Kernfragmentierung oder Ausstülpungen der Plasmamembran wurden nicht detektiert. Ein Vergleich der Stabilität der Aktinbindenden Proteine der ERM-Familie wies ebenfalls keine Unterschiede auf. Das Gleiche konnte nach ER-Färbung gezeigt werden. Zwischen den Sil1 depletierten und den Kontrollzellen waren keine auffälligen morphologischen Unterschiede in der Struktur des ER erkennbar. Eine mögliche Expansion des Kompartimentes durch Akkumulation ungefalteter oder ubiquitiniertes Proteine oder eine Veränderung auf Grund einer gestörten Synthese ER-strukturelevanter Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Änderungen in der Struktur des ER konnten auch nach Färbung mit dem Lektin Concanavalin A in Purkinje-Zellen der „woozy“-Mäuse nicht detektiert werden (Zhao *et al.*, 2005). Anhand dieser morphologischen Untersuchungen konnten folglich keine offensichtlichen BiP-unabhängigen Funktionen von Sil1 nachgewiesen werden.

#### 5.3.4 Der Einfluss des Verlustes von Sil1 auf den Proteintransport

Ein weiterer Gesichtspunkt dieser Arbeit bestand darin, erstmals die Rolle des Nukleotidaustauschfaktors hinsichtlich des Proteintransportes in Säugerzellen zu untersuchen. Unter der Annahme, dass der Verlust von Sil1 zu einer gestörten Funktion des Hsp70 Chaperons BiP führt, wäre denkbar, dass infolge einer gestörten Translokation der Import von Proteinen unterbunden ist. Im ADP-gebundenen Zustand verschließt BiP den Sec61-Kanal. Für das Öffnen des Translokons muss BiP eine durch ATP-Bindung bewirkte Konformationsänderung erfahren, welche durch die Aktivität des Nukleotidaustauschfaktors gefördert wird (Alder *et al.*, 2005). Der Verlust von Sil1 könnte dazu führen, dass BiP in der ADP-gebundenen Form verbleibt, wodurch ein Öffnen der Pore und somit eine Insertion von Proteinen unterbunden bliebe. Der Verlust von Sil1 um mehr als 90% zeigte keine negativen Auswirkungen hinsichtlich des Proteinimportes in das ER von HeLa-Zellen, wie anhand der Transportstudien mit Präprolaktin (*Abb. 4.33*) gezeigt wurde. Dies könnte mitunter daran liegen, dass der Restproteingehalt an Sil1 noch ausreichend ist, die Funktion von BiP aufrechtzuerhalten. Ferner könnte Grp170 durch seine mögliche Wirkungsweise als alternativen Nukleotidaustauschfaktor zu Sil1 die Funktion von

BiP in Abwesenheit von Sil1 aufrechterhalten. Diese funktionelle Redundanz könnte durch Transportstudien mit Zellen, in denen Sil1 und Grp170 depletiert sind, überprüft werden. Solch ein Zellkultursystem konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits etabliert werden. Eine weitere Erklärung bestünde darin, dass, wie bereits nach Depletion von BiP beschrieben, der Transport auch ohne funktionales BiP oder über einen alternativen Kanal stattfinden kann. Die bereits beschriebene Substratspezifität könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung sein. Letzteres könnte durch zusätzliche Studien mit weiteren Substraten untersucht werden.

---

## 5.4 Charakterisierung der Funktion von Grp170 in Säugerzellen

Grp170 wurde 1993 erstmals von Lin *et al.* als Glykoprotein des ER beschrieben. Anhand von Koimmunopräzipitationsversuchen wurde gezeigt, dass Grp170 mit BiP interagiert (Easton *et al.*, 2000). Das Protein stimuliert zudem den Nukleotidaustausch von BiP (Weitzmann *et al.*, 2006), wie es auch für sein Hefe-Ortholog Lhs1p für Kar2p beschrieben wurde (Steel *et al.*, 2004). Hinsichtlich dieser Nukleotidaustauschaktivität wurde in Hefen bereits eine teilweise Redundanz von *SIL1* und *GRP170* beschrieben. Ein Verlust von *LHS1* und *SIL1* ist letal und führt zu einer vollständigen Blockade des Proteintransportes in das ER. Darüber hinaus unterdrückt die Überexpression von *SIL1* zum Teil die nach Verlust von *LHS1* und *IRE1* beobachteten Wachstumsdefekte (Tyson & Stirling, 2000). Dass Grp170 und Sil1 teilweise redundante Funktionen auch in Neuronen aufwiesen, konnte zudem durch eine Überexpression von Grp170 in Sil1-defizienten Purkinje-Zellen nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2010). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Überexpression von *GRP170* die Degeneration der Purkinje-Zellen unterband. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wäre somit erst bei Verlust beider Proteine in Säugerzellen ein Effekt zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass ein Verlust von Sil1 in HeLa-Zellen zu einem Wachstumsarrest führte, während in PC3-Zellen kein Sil1 nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung dieser zellspezifischen Funktion könnte darin liegen, dass möglicherweise Grp170 in diesen Zellen die Funktion als Nukleotidaustauschfaktor zu BiP übernimmt. Vor diesem Hintergrund wurden die Auswirkungen eines Funktionsverlustes von Grp170 hinsichtlich des Zellwachstums und der Vitalität in diesen Zelllinien untersucht.

### 5.4.1 Grp170-depletierte Zelllinien

Um die Funktion des Nukleotidaustauschfaktors hinsichtlich der Redundanz zu Sil1 weiter untersuchen zu können, wurde erstmals die Funktion von Grp170 in Säugerzellen (HeLa- und PC3-Zellen) hinsichtlich der Vitalität untersucht. Auf Basis der RNA-Interferenztechnologie wurde die Proteinkonzentration in den Zellen minimiert. Die optimale Proteinreduktion wurde 96 h nach siRNA Transfektion mit < 20% erreicht (*Abb. 4.39*). Die Detektion erfolgte hierzu über Western-Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-

Mikroskopie konnte zudem die Proteinreduktion bestätigt werden. Während die Kontrollzellen eine intensive Färbung mit sichtbarer Aussparung des Zellkerns zeigten, war die Intensität der Fluoreszenzfärbung in den Grp170 depletierten Zellen deutlich reduziert. Somit konnte ein Zellkultursystem etabliert werden, welches für weitere Studien zur Klärung der Funktion von Grp170 eingesetzt werden kann.

#### 5.4.2 Auswirkungen des Verlustes von Grp170 auf das Zellwachstum und die zelluläre Stressreaktion

Die Untersuchungen zum Nachweis der Rolle von Grp170 auf die Vitalität der HeLa-Zellen zeigten, dass das Protein nicht essentiell für das Wachstum der HeLa-Zellen ist. Der Verlust von Grp170 führte zu einem leicht verminderten Zellwachstum, wie mit Hilfe der Lebendzellzahlbestimmung sowie der CFSE-Färbung belegt wurde (*Abb. 4.40 & 4.41*). Für das Hefehomolog Lhs1p wurde bereits eine nicht essentielle Funktion gezeigt (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996). Obgleich Lhs1p nicht essentiell ist, wies eine Nullmutation Defekte in der post-translationalen Translokation (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996) sowie bei der Reparatur fehlgefalteter Proteine im ER hervor (Saris *et al.*, 1997), was letztlich zur Induktion der UPR führte (Baxter *et al.*, 1996; Craven *et al.*, 1996). Wegen seiner bereits beschriebenen möglichen Rolle bei der Assemblierung sowie Faltung von sekretorischen Proteinen (Kuznetsov *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003) sowie als Nukleotidaustauschfaktor von BiP zu agieren (Weitzmann, 2006), könnte ein Verlust des Proteins eine Aggregation ungefalteter, missgefalteter sowie ubiquitinerter Proteine bewirken, in deren Folge die UPR induziert wird. Um zu überprüfen, ob das leicht verminderte Proliferationsverhalten in HeLa-Zellen nach Depletion von Grp170 möglicherweise durch zellulären Stress verursacht wurde, wurde die Konzentration der UPR-induzierten Proteine BiP und Calnexin im Vergleich zu der in den Kontrollzellen untersucht. Hierbei konnte eine deutlich erhöhte Synthese von BiP und Calnexin beobachtet werden (*Abb. 4.45*), was auf ER-Stress und eine Induktion der UPR hinweist. Dies könnte mitunter die Folge einer gestörten Assemblierung und Faltung von sekretorischen Proteinen sein. Für Grp170 wurde bereits auf Grund seiner Interaktion mit BiP und nichtassemblierten Immunglobulinen Rolle bei der Assemblierung und Faltung von sekretorischen Proteinen nahelegt (Lin *et al.*, 1993; Kuznetsov *et al.*, 1997). Studien von Park *et al.* (2003) haben zudem gezeigt, dass das

Protein durch Bindung an denaturierte Proteine eine Hitze-induzierte Protein-Aggregation verhindert. Auf Grund der gezeigten nicht letalen Auswirkungen einer Depletion von Grp170 auf HeLa-Zellen kann angenommen werden, dass die induzierte Stressreaktion die zellulären Folgen beheben kann. Die Funktion von BiP scheint in diesen Zellen nicht gestört zu sein, was darauf hinweisen könnte, dass der Nukleotidaustausch von S111 reguliert wird und dass Grp170 hierbei eine untergeordnete Funktion einnimmt. Dies würde die Annahme, dass S111 der Haupt-Nukleotidaustauschfaktor in HeLa-Zellen ist, erhärten.

Die Wachstums- sowie Vitalitätsstudien Grp170 depletierter PC3-Zellen zeigten dagegen, dass der Verlust des Chaperons zu einer Reduktion des Zellwachstums führte. Die gleiche Beobachtung wurde durch Bestimmung des Zellwachstums anhand des Real-Time Cell Analyzer Systems xCELLigence (Roche Applied Science) erzielt (*Abb. 4.42*). Durch Einsatz verschiedener siRNAs mit Spezifität für dieselbe mRNA konnten auch hier „off-target“-Effekte ausgeschlossen werden. Eine deutliche Reduktion der Vitalität nach Verlust von Grp170 wurde zudem mit Hilfe des WST-1 Assays gezeigt (*Abb. 4.42*). Verglichen mit den Kontrollzellen wiesen die depletierten PC3-Zellen eine verminderte Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, und somit eine deutlich reduzierte Anzahl vitaler Zellen, auf. Über die parallel durchgeführte CFSE-Färbung wurde die Bedeutung des Chaperons hinsichtlich des Zellwachstums erhärtet. Bereits 72 h nach siRNA-Transfektion und einer endogenen Proteinkonzentration von ca. 30% waren die Zellen in ihrer Teilung inhibiert (*Abb. 4.41*). Eine erneute Zellteilung konnte über den Untersuchungszeitraum nicht beobachtet werden. Die Untersuchung auf ER-Stress und Induktion der UPR ließen eine erhöhte Ubiquitinierung sowie ein Anstieg der Menge an BiP in den Grp170 depletierten PC3-Zellen erkennen (*Abb. 4.45*). Bezüglich der zuvor beschriebenen Rolle von Grp170 in HeLa-Zellen ist anzunehmen, dass die nach Verlust des Chaperons in PC3-Zellen beobachtete Letalität auf eine zusätzlich gestörte Funktion des Hsp70 Chaperons BiP zurückzuführen ist. Anhand der bereits gezeigten Eigenschaft, dass in PC3-Zellen kein S111 nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass in diesen Zellen die Nukleotidaustausch-Aktivität von BiP durch Grp170 reguliert wird. Das Fehlen kompensatorischer Mechanismen hätte demnach ein Funktionsausfall von BiP zur Folge und würde die Letalität erklären.

### 5.4.3 Der Einfluss des Verlustes von Grp170 auf die Zellmorphologie

In Analogie zu den bereits erhobenen Daten nach Depletion von BiP und S11 ließen die Untersuchungen zum Einfluss von Grp170 auf die Zellmorphologie weder in HeLa- noch in PC3-Zellen morphologischen Veränderungen erkennen (*Abb. 4.43*). Lediglich Unterschiede in der Zelldichte zwischen den depletierten PC3-Zellen und den Kontrollzellen waren erkennbar. Die ER-Färbung der depletierten PC3-Zellen wies zudem ebenfalls keine Unterschiede zu den Kontrollzellen auf. Anhand dieser morphologischen Untersuchungen konnte folglich keine Änderung im Cytoskelett welche zu einer Umformung der Zellgestalt führt, nachgewiesen werden.

## 5.5 Modell des Wirkmechanismus von BiP-Sil1-Grp170

Das Hsp70 Chaperon BiP ist ein wichtiger Regulator des Endoplasmatischen Retikulums. Studien in der Hefe haben gezeigt, dass das Hsp70 Chaperon neben der Translokation von Proteinen in das ER auch an der Erhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, der Proteinfaltung sowie der Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine beteiligt ist (Hiller *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Lee, 2001). Da die Funktion von BiP unter anderem von der Nukleotidaustauschaktivität innerhalb der ATPase-Domäne abhängt, welche durch Nukleotidaustauschfaktoren reguliert werden, führt der Ausfall solcher Faktoren vermutlich zu einer verminderten Synthese von Proteinen, die für die Entwicklung und Funktion der betroffenen Zellen verantwortlich sind. Andererseits könnten auch fehlgefaltete Proteine im ER akkumulieren und im Rahmen der Stressantwort der Zelle schließlich zum Zelltod führen. Die Existenz von zwei Nukleotidaustauschfaktoren im ER könnte auf Grund funktioneller Redundanz den Verlust eines Nukleotidaustauschfaktors ersetzen. Diese Annahme wird durch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtung unterstützt, wonach der Verlust von Grp170 in HeLa-Zellen nicht letal ist, jedoch der in PC3-Zellen, in denen kein Sil1 nachgewiesen wurde. Eine zell-/gewebsspezifische Funktion konnte anhand der erhobenen Daten für Sil1 in HeLa-Zellen beobachtet werden. Der Verlust des Nukleotidaustauschfaktors ist trotz der Anwesenheit von Grp170 für die Proliferation der Zellen essentiell. Weswegen Grp170 in diesen Zellen den Verlust nicht kompensieren kann bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung basierend auf eine unterschiedliche Expression von *GRP170* zwischen den beiden Zelllinien konnte anhand der Quantifizierungsdaten welche zeigten, dass die Proteinkonzentration an Grp170 in den HeLa-Zellen gegenüber den PC3-Zellen nahezu identisch ist, ausgeschlossen werden. Möglicherweise besitzt Sil1 noch eine zusätzliche, bislang unbekannte BiP-unabhängige Funktion, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Alder NN, Johnson AE (2004):** Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**:22787-22790
2. **Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE (2005):** The molecular mechanism underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **168**:389-399
3. **Anttonen AK, Mahjneh I, Hamalainen 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, Lehesjoki AE (2005):** The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nature Genetics* **37**:1309-1311
4. **Awe K, Lambert C, Prange R (2008):** Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett.* **582**:3179-3184
5. **Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F (2002):** Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell. Biol.* **157**:1233-1245
6. **Bateman DA (2006):** Unfolded Protein Response (UPR): Cellular control for our errors in life. *Hypothesis* **4**:33-37
7. **Baxter BK, James P, Evans T, Craig EA (1996):** *SSII* encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6444-6456
8. **Becker J, Walter W, Yan W, Craig EA (1996):** Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **16**:4378-4386
9. **Bernstein HD, Poritz MA, Strub K, Hoben PJ, Brenner S, Walter P (1989):** Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54k subunit of signal recognition particle. *Nature* **340**:482-486
10. **Beckmann R, Bubeck D, Grassucci R, Penczek P, Verschoor A, Blobel G, Frank J (1997):** Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science.* **278**:2123-2126
11. **Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Helmers J, Penczek PA, Sali A, Frank, J (2001):** Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell.* **107**:361-372
12. **Beggah A, Mathews P, Beguin P, Geering K (1996):** Degradation and Endoplasmic Reticulum retention of unassembled alpha- and beta -subunits of Na,K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J Biol Chem* **271**:20895-20902
13. **Benedix J, Lajoie P, Jaiswal H, Burgard C, Greiner M, Zimmermann R, Rospert S, Snapp EL, Dudek J (2010):** BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERJ1 to ribosomes. *JBC Papers* (in Press)

14. **Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP and Ron D (2000):** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**:326-332
15. **Birnboim HC, Doly J (1979):** Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**:1513-1523
16. **Blobel G, Dobberstein B (1975a):** Transfer of proteins across membranes. *J Cell Biol* **67**:845-885
17. **Blobel G, Dobberstein B (1975b):** Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**:835-851
18. **Blobel G, Dobberstein B (1975c):** Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**:852-862
19. **Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower W J, Lipschutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, Gething M-JH (1993a):** Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* **75**:717-728
20. **Blond-Elguindi S, Fourie AM, Sambrook JF, Gething M-JH (1993):** Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *Biol. Chem.* **268**:12730-12735
21. **Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA (1994):** Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol.* **38**:1-17
22. **Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, Tsagris M, Tabler M (2001):** Short 5'-phosphorylated double-stranded RNAs induce RNA interference in *Drosophila*. *Curr Biol* **11**:1776-1780
23. **Bretscher A (1999):** Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* **11**:109-116
24. **Brightman SE, Blatch GL, Zette BR (1995):** Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins. *Gene* **153**:249-254
25. **Brodsky JL, Goekeler J, Schekman R (1995):** BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:9643-9646
26. **Brodsky JL, Schekman R (1993):** A Sec63-BiP complex is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J. Cell Biol.* **123**:1355-1263
27. **Brodsky JL, Schekman R (1994):** The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, Eds. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (*Cold Spring Laboratory Press*, Plainview, NY) 85-109

28. **Brodsky JL, Werner ED, Dubas ME, Goeckeler JL, Kruse KB, McCracken AA (1999):** The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.* **274**:3453-3460
29. **Bukau B, Horwich AL (1998):** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**:351-366
30. **Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJM, Wickner W (1990):** The purified *E.coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**:649-657
31. **Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002):** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**:92-96
32. **Carvalho P, Goder V, Rapoport TA (2006):** Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**:361-373
33. **Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG (1992):** Ydj1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**:1143-1455
34. **Chapman RE, Walter P (1997):** Translational attenuation mediated by an mRNA intron. *Curr. Biol.* **7**:850-859
35. **Cheetham ME, Caplan AJ (1998):** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress & Chaperones* **3**:28-36
36. **Chen X, Easton D, Oh HJ, Lee-Yoon DS, Liu X, 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
37. **Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC, Blond SY (2000):** Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem.* **275**:19620-19627
38. **Chillarón J, Haas IG (2000):** Dissociation from BiP and Retrotranslocation of Unassembled Immunoglobulin Light Chains Are Tightly Coupled to Proteasome Activity. *Mol Biol Cell* **11**:217-226
39. **Chirico WJ, Waters MG, Blobel G (1988):** 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**:805-810
40. **Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR (2008):** OS-9 and GRP94 deliver mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* **10**:272-282
41. **Chung KT, Shen Y, Hendershot LM (2002):** BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* **277**:47557-47563

42. **Connolly T, Gilmore R (1989):** The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* **57**:599-610.
43. **Corsi AK, 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**:1483-93
44. **Cox JS, Shamu CE, Walter P (1993):** Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic Reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**:1197-206
45. **Cox JS, Walter P (1996):** A novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor that controls the Unfolded Protein Response. *Cell* **87**:391-404
46. **Craven RA, Egerton M, Stirling CJ (1996):** A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J.* **15**:2640-2650
47. **Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE (1994):** Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**:461-471
48. **Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J (2003):** Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**:2705-2716
49. **David V, Hochstenbach F, Rajagopalan S, Brenner MB (1993):** Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin). *J Biol Chem.* **268**:9585-9592
50. **Davila S, Furu L, Gharavi AG, Tian X, Onoe T, Qian Q, Li A, Cai Y, Kamath PS, King BF, Azurmendi PJ, Tahvanainen P, Kaariainen H, Hockerstedt K, Devuyst O, Pirson Y, Martin RS, Lifton RP, Tahvanainen E, Torres VE, Somlo S (2004):** Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet* **36**:575-577
51. **de Virgilio M, Kitzmuller C, Schwaiger E, Klein M, Kreibich G, Ivessa NE (1999):** Degradation of a Short-lived Glycoprotein from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: The Role of N-linked Glycans and the Unfolded Protein Response. *Mol. Biol. Cell* **10**:4059-4073
52. **Degen E, Williams DB (1991):** Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J. Cell Biol.* **112**:1099-1115
53. **Denic V, Quan EM, Weissman JS (2006):** A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell.* **126**:349-359
54. **Deshaies RJ, Schekman R (1987):** A yeast mutant defective at an early stage of import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **105**:633-645

55. **Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R (1988):** A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**:800-805
56. **Deshaies RJ, Schekman R (1989):** SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **109**:2653-2664
57. **Diaz de Escauriaza M (2006):** Zur Rolle von luminalen Proteinen und Membranproteinen des Endoplasmatischen Retikulums bei der Biogenese sekretorischer Proteine. *Dissertation an der Universität des Saarlandes*
58. **Dierks T, Volkmer J, Schlenstedt G, Jung C, Sandholzer U, Zachmann K, Schlotterhose P, Neifer K, Schmidt B, Zimmermann R (1996):** A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15**:6931-6942
59. **Dong D, Ko B, Baumeister P, Swenson S, Costa F, Markland F, Stiles C, Patterson JB, Bates SE, Lee AS (2005):** Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Res.* **65**:5785-5791
60. **Dong D, Ni M, Li J, Xiong S, Ye W, Virrey JJ, Mao C, Ye R, Wang M, Pen L, Dubeau L, Groshen S, Hofman FM, Lee AS (2008):** Critical Role of the Stress Chaperone GRP78/BiP in Tumor Proliferation, Survival, and Tumor Angiogenesis in Transgene-induced Mammary Tumor Development. *Cancer Res.* **68**:498-505
61. **Dudek J, Volkmer J, Bies C, Guth S, Müller A, Lerner M, Feick P, Schafer K.-H., Morgenstern E, Hennessy F, Blatch G.L., Janoscheck K, Heim N, Scholtes P, Frien M, Nastainczyk W. and Zimmermann R. (2002):** A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. *EMBO J.* **21**:2958-2967
62. **Dudek J, Greiner M, Müller A, Hendershot LM, Kopsch K, Nastainczyk W, Zimmermann R (2005):** ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:1008-1014
63. **Easton DP, Kaneko Y, Subject JR (2000):** The hsp110 and Grp170 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* **5**:276-290
64. **Eisfeld K, Riffer F, Mentges J, Schmitt MJ (2000):** Endocytic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol* **37**:926-940
65. **Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a):** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498
66. **Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b):** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188-200

67. **Esnault, Y., Blondel, M.-O., Deshaies, R., Schekman, R. and Kepes, F. (1993):** The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **12**:4083-4093
68. **Eriguchi M, Mizuta H, Kurohara K, Fujitake J, Kuroda Y (2008):** Identification of a new homozygous frameshift insertion mutation in the SIL1 gene in 3 Japanese patients with Marinesco-Sjögren syndrome. *Journal of Neurological Sciences* **270**:197-200
69. **Favaloro V, Vilardi F, Schlecht R, Mayer MP, Dobberstein B (2010):** Asna1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science* **123**:1522-1530
70. **Feldheim D, Rothblatt J, Schekman R (1992):** Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3288-3296
71. **Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL (2001):** The Action of Molecular Chaperones in the Early Secretory Pathway. *Annu Rev Genet* **35**:149-191
72. **Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB (1990):** Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**:623-628
73. **Finke K, Plath K, Prehn S, Rapoport TA, Hartmann E, Sommer T (1996):** A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **15**:1482-1494
74. **Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE (1991):** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Science* **353**:726-730
75. **Fons RD, Bogert BA, Hegde RS (2003):** Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* **160**:529-539
76. **Francoeur A, Assalian A, Microcat (1996):** A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. *Biochemica* **3**:19-25
77. **Freiden PJ, Gaut JR, Hendershot LM (1992):** Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *EMBO J.* **11**:63-70
78. **Gething MJ (1999):** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* **10**:465-472
79. **Gillece P, Luz JM, Lennarz WJ, de la Cruz FJ, Römisch K (1999):** Export of a cystein-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *EMBO J* **147**:1443-1456
80. **Gilmore R, Blobel G, Walter P (1982a):** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J. Cell Biol.* **95**:463-469

81. **Gilmore R, Walter P, Blobel G (1982b):** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J. Cell Biol.* **95**:470-477
82. **Görlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies K-U, Rapoport TA (1992a):** A mammalian homolog of Sec61p and SecYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**:489-503
83. **Görlich D, Rapoport TA (1993):** Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**:615-630
84. **Gould KL, Bretscher A, Esch FS, Hunter T (1989):** cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *EMBO J.* **8**:4133-4142
85. **Greene LE, Zinner R, Naficy S, Eisenberg E (1995):** Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* **270**:2967-2973
86. **Green N, Fang H, Walter P (1992):** Mutations in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **126**:597-604
87. **Guth S, Völzing C, Müller A, Lerner M, Jung M, Zimmermann R (2004):** Protein transport into canine pancreatic microsomes: a quantitative approach. *Eur. J. Biochem.* **271**:3200-3207
88. **Haas IG, Wabl M (1983):** Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**:387-389
89. **Haddock SHD, McDougall CM, Case JF:** The Bioluminescence Web Page, <http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/> (created 1997; updated 2005)
90. **Haigh N, Johnson A (2002):** A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol* **156**:261-270
91. **Halic M, Gartmann M, Schlenker O, Mielke T, Pool MR, Sinning I, Beckmann R (2006):** Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* **312**:745-747
92. **Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999):** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**:950-952
93. **Hamman BD, Chen J-C, Johnson EE, Johnson AE (1997):** The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**:535-544
94. **Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998):** BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**:747-758
95. **Hammond C, Braakman I, Helenius A (1994):** Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose-trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:913-917

96. **Hanein D, Matlack KE, Jungnickel B, Plath K, Kalies KU, Miller KR, Rapoport TA, Akey CW (1996):** Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87**:721-732
97. **Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999):** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**:271-274
98. **Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000):** Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**:1099-1108
99. **Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl F, Kuriyan J (1997):** Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* **276**:431-435
100. **Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Görlich D, Jentsch S, Rapoport TA (1994):** Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**:654-657
101. **Haze K, Yoshida H, Yanagi H, et al. (1999):** Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* **10**:3787-3799
102. **Haze K, Okada T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K (2001):** Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **355**:19-28
103. **Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1995):** Glucose-trimming and reglycosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**:425-433
104. **Hegde RS, Voigt S, Rapoport TA, Lingappa VR (1998):** TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* **92**:621-631
105. **Hegde RS, Bernstein HD (2006):** The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.* **31**:563-571
106. **Helenius A, Aebi M (2001):** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**:2364-2369
107. **Hellman R, Vanhove M, Lejeune A, Stevens FJ, Hendershot LM (1999):** The *In Vivo* Association of BiP with Newly Synthesized Proteins Is Dependent on the Rate and Stability of Folding and Not Simply on the Presence of Sequences That Can Bind to BiP. *J Cell Biol* **144**:21-30
108. **Hendershot LM, Ting J, Lee A (1988):** Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol Cell Biol* **8**:4250-4256
109. **Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME, Blatch GL (2005):** Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Science* **14**:1697-1709

110. **Herendeen SL, VanBogelen RA, Neidhardt FC (1979):** Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**:185-194
111. **High S, Lecomte FJL, Russell SJ, Abell BM, Oliver JD (2000):** Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Letters* **476**:38-41
112. **Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH (1996):** ER Degradation of a Misfolded Luminal Protein by the Cytosolic Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Science* **273**:1725-1728
113. **Hilt W (2005):** Das Ubiquitin-Proteasom-System in Proteinqualitätskontrolle und Regulation. *BIOspektrum* **11**:446-449
114. **Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H (2002):** Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nu-cleic Acids Res* **30**:1757-1766
115. **Hoshino T, Nakaya T, Araki W, Suzuki K, Suzuki T, Mizushima T (2007):** Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid- $\beta$  peptides *Biochem. J.* **402**:581-589
116. **Hu CC, Dougan SK, Winter SV, Paton AW, Paton JC, Ploegh HL (2009):** Subtilase cytotoxin cleaves newly synthesized BiP and blocks antibody secretion in B lymphocytes. *J Exp Med* **206**:2429-2440
117. **Jalal C (2005):** Funktion der menschlichen p68-Subfamilie der DEAD-Box-Proteine bei der Ribosomen-Biogenese. *Dissertation*, Universität des Saarlandes
118. **Jiang J, Prasad K, Lafer EM, Sousa R (2005):** Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 Chaperone. *Mol. Cell* **20**:513-524
119. **Jin T, Gu Y, Zanusso G, Sy M, Kumar A, Cohen M, Gambetti P, Singh N (2000):** The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **275**:38699-38704
120. **Jolly C, Morimoto RI (2000):** Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**:1564-1572
121. **Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Stockle M, Zimmermann R, Wullich B (2006):** Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **4**:169-176
122. **Jungnickel B, Rapoport TA (1995):** A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **82**:261-270
123. **Kabani M, Beckerich JM, Gaillardin C (2000):** Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* **18**:6923-6934
124. **Kabani M, McLellan C, Raynes DA, Guerriero V, Brodsky JL (2002):** HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Lett.* **531**:339-342

125. **Kabani M, Kelley SS, Morrow MW, Montgomery DL, Sivendran R, Rose MD, Gierasch LM, Brodsky JL (2003):** Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* **4**:3437-3448
126. **Kalies KU, Görlich D, Rapoport TA (1994):** Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J. Cell Biol.* **126**:925-934
127. **Kanzaki H, Saitoh H, Ito A, Fujisawa S, Kamoun S, Katou S, Yoshioka H, Terauchi R (2003):** Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **5**:383-391
128. **Karzai AW, McMacken R (1996):** A bipartite signalling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK protein. *J. Biol. Chem.* **271**:11236-11246
129. **Kaufman RJ (1999):** Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**:1211-1233
130. **Keyzer J, Steel GJ, Hale SJ, Humphries D, Stirling CJ (2009):** Nucleotide Binding by Lhs1p Is Essential for Its Nucleotide Exchange Activity and for Function *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **284**:31564-31571
131. **Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S (2006):** Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* **11**:5-13
132. **Klappa P, Freedman RB, Zimmermann R (1995):** Protein disulphide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *Eur. J. Biochem* **232**:755-764
133. **Klappa P, Mayinger P, Pipkorn R, Zimmermann M, Zimmermann R (1991):** A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *EMBO J.* **10**:2795-2803
134. **Kleizen B, Braakman I (2004):** Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:343-349
135. **Koss M, Pfeiffer GR, Wang Y, Thomas ST, Yerukhimovich M, Gaarde WA, Doerschuk CM, Wang Q (2006):** Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol* **176**:1218-1227
136. **Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1988):** The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**:462-464
137. **Krieg UC, Walter P, Johnson AE (1986):** Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54 kDa polypeptide of the signal recognition particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8604-8608

138. **Kurzchalia TV, Wiedmann M, Girshovich AS, Bochkareva ES, Bielka H, Rapoport TA (1986):** The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature* **320**:634-636
139. **Kutay U, Hartmann E, Rapoport TA (1993):** A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* **3**:72-75
140. **Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, Hori O, Ogawa S, Maeda Y, Kitagawa K, Imuta N, Kinoshita T, Stern DM, Yanagi H, Kamada T (1996):** Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J Biol Chem* **271**:5025-5032.
141. **Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK (1997):** Multiple molecular chaperone complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **272**:3057-3063
142. **Lagier-Tourenne C, Tranebaerg L, Chaigne D, Gribaa M, Dollfus H, Silvestri G, Bétard C, Warter JM, Koenig M (2003):** Homozygosity mapping of Marinesco-Sjögren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet.* **11**:770-778
143. **Lass A, Kujawa M, McConnell E, Paton AW, Paton JC, Wójcik C (2008):** Decreased ER-associated degradation of alpha-TCR induced by Grp78 depletion with the SubAB cytotoxin. *Int J Biochem. Cell Biol.***40**:2865-2879
144. **Latterich M, Schekman R (1994):** The karyogamy gene KAR2 and novel proteins are required for ER-membrane fusion. *Cell* **78**:87-98
145. **Lee AS (1992):** Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr Opin Cell Biol* **4**:267-273
146. **Lee AS (2001):** The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* **26**:504-510
147. **Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ (2002):** IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* **16**:452-466.
148. **Legate KR, Falcone D, Andrews DW (2000):** Nucleotide-dependent binding of the GTPase domain of the signal recognition particle receptor beta-subunit to the alpha-subunit. *J. Biol. Chem* **275**:27439-27446
149. **Levy R, Wiedmann M, Kreibich G (2001):** *In vitro* Binding of Ribosomes to the  $\beta$ - Subunit of the Sec61p Protein Translocation Complex. *J. Biol. Chem* **276**:2340-2346
150. **Liao S, Lin J, Do H, Johnson AE (1997):** Both luminal and cytosolic gating of aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* **90**:31-41
151. **Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M (1991):** *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2874-2878

152. **Lin HY, Masso-Welch P, Di YP, Cai JW, Shen JW, Subject JR (1993):** The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol. Biol. Cell.* **4**:1109-1119
153. **Linke K, Wolfram T, Bussemer J, Jakob U (2003):** The roles of the two zinc binding sites in DnaJ. *J Biol Chem.* **278**:44457-44466.
154. **Linnik KM, Herscovitz H (1998):** Multiple molecular chaperones interact with apolipoprotein B during its maturation. *J. Biol. Chem.* **273**:21368-21373
155. **Liu H, Bowes RC, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL (1997):** Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**:21751-21759
156. **Liu F, Inageda K, Nishitai G, Matsuoka M (2006):** Cadmium induces the expression of Grp78, an endoplasmic reticulum molecular chaperone, in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Environ Health Perspect.* **114**:859-864
157. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000):** Molecular Cell Biology, 4<sup>th</sup> edition. *New York* W. H. Freeman and Company.
158. **Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS (2006):** GRP78/BiP Is Required for Cell Proliferation and Protecting the Inner Cell Mass from Apoptosis during Early Mouse Embryonic Development. *Molecular & Cellular Biology* **26**:5688-5697
159. **Lyman S, Schekman R. (1995):** Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **131**: 1163-1171
160. **Lyons AB, Parish CR (1994):** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **171**:131-137
161. **Ma Y, Hendershot LM (2001):** The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* **107**:827-830
162. **Machamer CE, Doms RW, Bole DG, Helenius A, Rose JK (1990):** Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Biol. Chem.* **265**:6879-6883
163. **Manjili MH, Park JE, Facciponte JG, Wang XY, Subject JR (2006):** Immunoadjuvant chaperone, GRP170, induces 'danger signals' upon interaction with dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **84**:203-208
164. **Matlack KES, Plath K, Misselwitz B, Rapoport TA (1997):** Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* **277**:938-941
165. **Matlack KES, Misselwitz B, Plath K, Rapoport TA (1999):** BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- $\alpha$  factor across the ER membrane. *Cell* **97**:553-564
166. **McCarty JS, Buchberger A, Reinstein J, Bukau B (1995):** The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **249**:126-137

167. **McMillan DR, Gething MJ, Sambrook J (1994):** The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**:540-545
168. **Melnick J, Aviel S, Argon Y (1992):** The endoplasmic reticulum stress protein, GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* **267**: 21303-21306
169. **Menetret JF, Neuhof A, Morgan DG, Plath K, Radermacher M, Rapoport TA, Akey CW (2000):** The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol. Cell.* **6**:1219-1232
170. **Menetret JF, Hedge RS, Heinrich SU, Chandramouli P, Ludtke SJ, Rapoport TA (2005):** Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J. Mol. Biol.* **348**:445-457
171. **Menetret JF, Schaletzky J, Clemons WM Jr, Osborne AR, Skanland SS, Denison C, Gygi SP, Kirkpatrick DS, Park E, Ludtke SJ, Rapoport TA, Akey CW (2007):** Ribosome binding of a single copy of the SecY complex: implications for protein translocation. *Mol Cell* **28**:1083-1092
172. **Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM (2002):** A subset of chaperons and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* **13**:4456-4469
173. **Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005):** ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**:766-772
174. **Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999):** Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* **344**:281-292
175. **Miller JD, Tajima S, Lauffer L, Walter P (1995):** The  $\beta$  subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the  $\alpha$  subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **128**:273-282
176. **Miller KG (2003):** A role for moesin in polarity. *Trends Cell Biol* **13**:165-168
177. **Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Wang F, Pizzo SV (2004):** A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates  $\alpha$ 2M\*-induced signalling. *Cell Signal.* **16**:929-938
178. **Misselwitz B, Staack O, Matlack KE, Rapoport TA (1999):** Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* **274**:20110-20115
179. **Mitra K, Schaffitzel C, Shaikh T, Tama F, Jenni S, Brooks CL, Ban N, Frank J (2005):** Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature* **438**:318-324
180. **Montecucco C, Molinari M (2006):** Death of a chaperon. *Nature* **443**:511-512

181. **Mori Y, Sato F, Selaru FM, Olaru A, Perry K, Kimos MC, Tamura G, Matsubara N, Wang S, Xu Y, Yin J, Zou T-T, Leggett B, Young J, Nukiwa T, Stine OC, Abraham JM, Shibata D, Meltzer SJ (2002):** Instabilotyping Reveals Unique Mutational Spectra in Microsatellite-Unstable Gastric Cancers. *Cancer Research* **62**:3641-3645
182. **Morinaga K, Yahiro K, Matsuura G, Moss J, Noda M (2008):** Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell Microbiol.* **10**:921-929
183. **Mothes, W., Prehn, S. and Rapoport, T. A. (1994):** Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* **13**:3973-3982
184. **Mothes W, Jungnickel B, Brunner J, Rapoport TA (1998):** Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **142**:355-364
185. **Müller G, Zimmermann R (1987):** Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO J.* **6**:2099-2107
186. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986):** Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**:263-273
187. **Müsich A, Wiedmann M, Rapoport TA (1992):** Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **69**:343-352
188. **Munro S, Pelham HR (1986):** An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**:291-300
189. **Muresan Z, Arvan P (1997):** Thyroglobulin Transport along the Secretory Pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, Grp94, in protein export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **272**:26095-26102
190. **Murphy EJ, Roberts E, Horrocks LA (1993):** Aluminium silicate toxicity in cell cultures. *Neuroscience* **55**:597-605
191. **Nathan DF, Vos MH, Lindquist S (1997):** *In vivo* functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:12949-12956
192. **Naved AF, Ozawa M, Yu S, Miyauchi T, Muramatsu H, Muramatsu T (1995):** CBP-140, a novel endoplasmic reticulum resident Ca(2+)-binding protein with a carboxy-terminal NDEL sequence showed partial homology with 70-kDa heat shock protein (Hsp70). *Cell struct Funct.* **20**:133-141
193. **Ng DTW, Brown JD, Walter P (1996):** Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134**:269-278
194. **Nguyen TH, Law DTS, Williams DB (1991):** Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1565-1569

195. **Nicchitta CV, Murphy ECI, Haynes R, Shelness GS (1995):** Stage- and ribosome-specific alterations in nascent chain-Sec61p interactions accompany translocation across the ER membrane. *J. Cell Biol.* **129**:957-970
196. **Nishikawa SI, Fewell SW, Kato Y, Brodsky JL, Endo T (2001):** Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J. Cell Biol.* **153**:1061–1070
197. **Normington K, Kohno K, Kozutsumi Y, Gething MJ, Sambrook J (1989):** *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell.* **57**:1223-1236
198. **Obermann WM, Sonderrmann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU (1998):** *In vivo* function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* **143**:901-910
199. **Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005):** Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:529-550
200. **Osborne AR, Rapoport TA (2007):** Protein Translocation Is Mediated by Oligomers of the SecY Complex with One SecY Copy Forming the Channel. *Cell* **129**:97-110
201. **Ostwald TJ, MacLennan DH (1974):** Isolation of a high-affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **249**:974-979
202. **Oyadomari S, Mori M (2004):** Roles of CHOP/GADD 153 in Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Death and Differentiation* **11**:381-389
203. **Packschies L, Theysen H, Buchberger A, Bukau B, Goody RS, Reinstein J (1997):** GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**:3417-3422
204. **Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA (1995):** Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of sec proteins and kar2p. *Cell* **81**:561-570
205. **Park J, Easton DP, Chen X, MacDonald IJ, Wang X-Y, Subject JR (2003):** The chaperoning properties of mouse Grp170, a member of the third family of Hsp70 related proteins. *Biochemistry* **42**:14893-14902
206. **Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA (1979):** Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **76**:1962-1966
207. **Parish CR (1999):** Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and Cell Biology* **77**:499-508
208. **Paton AW, Beddoe BA, Hegde RS (2006):** AB<sub>5</sub> subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature.* **443**:548-552
209. **Perlman D, Halvorson HO (1983):** A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167**:391-409
210. **Pfaffl MW, Hageleit M (2001):** Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RTPCR. *Biotechnology Letters* **23**:275-282

211. **Pilon M, Romisch K, Quach D, Schekman R (1998):** Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **9**:3455-3473
212. **Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (1998):** Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**:795-807
213. **Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997):** Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **338**:891-895
214. **Porter AG, Jänicke RU (1999):** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**:99-104
215. **Potter MD, Nicchitta CV (2000):** Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **275**:33828-33835
216. **Potter MD, Nicchitta CV (2002):** Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J Biol Chem* **277**:23314-23320
217. **Polaina J, Conde J (1982):** Genes involved in the control of nuclear fusion during the sexual cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. & Gen. Genet.* **186**:253-258
218. **Pouyssegur J, Shiu RPC, 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
219. **Prinz A, Behrens C, Rapoport TA, Hartmann E, Kalies K-U (2000):** Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J* **19**:1900-1906
220. **Pujuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M (2003):** Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac 1 activation. *Mol Biol Cell.* **14**:2181-2191
221. **Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L (2006):** The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and molecular life sciences* **63**:2560-2570
222. **Rabu C, Schmid V, Schwappach B, High S (2009):** Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *Journal of Cell Science* **122**:3605-3612
223. **Raden D, Song W, Gilmore R (2000):** Role of the Cytoplasmic Segments of Sec61{alpha} in the Ribosome-binding and Translocation-promoting Activities of the Sec61 Complex. *J Cell Biol* **150**:53-64
224. **Randow F, Seed B (2001):** Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* **3**:891-906
225. **Rapiejko PJ, Gilmore R (1997):** Empty site forms of the SRP54 and SRa GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**:703-713

- 
226. **Raynes DA, Guerriero V Jr (1998):** Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J Biol Chem.* **49:**32883-32888
227. **Richter K, Muschler P, Hainzl O, Reinstein J, Buchner J (2003):** Sti1 is a noncompetitive inhibitor of the Hsp90 ATPase. Binding prevents the N-terminal dimerization reaction during the atpase cycle. *J Biol Chem.* **278:**10328-10333
228. **Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, Dobberstein B (1989):** Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two *E. coli* proteins with putative GTP-binding domains. *Nature* **340:**478-482
229. **Rose MD, Misra LM, Vogel JP (1989):** KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homologue of the mammalian BiP/Grp78 gene. *Cell* **57:**1211-1221
230. **Sadler I, Chiang A, Kurihara T, Rothblatt J, Silver P (1989):** A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *E. coli* heat shock protein. *J. Cell Biol.* **109:**2665-2675
231. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988):** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase. *Science* **239:**487-491
232. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):** Molecular cloning-a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
233. **Sanders SL, Whitfield KM, Vogel JP, Rose MD, Schekman R (1992):** Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* **69:**353-365
234. **Saris N, Holkeri H, Craven RA, Stirling CJ, Makarow M (1997):** The Hsp70 homologue Lhs1p is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat denatured protein aggregates. *J. Cell Biol.* **137:**813-824
235. **Schlenstedt G, Zimmermann R (1987):** Import of prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO J.* **6:**699-703
236. **Schmid D, Baici A, Gehring H, Christen P (1994):** Kinetics of molecular chaperone action. *Science* **263:**971-973
237. **Schmitz A, Herrgen H, Winkeler A, Herzog V (2000):** Cholera Toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* **148:**1203-1212
238. **Schnell DJ, Hebert DN (2003):** Protein Translocons: Multifunctional Mediators of Protein Translocation across Membranes. *Cell* **112:**491-505
239. **Schrag JD, Procopio DO, Cygler M, Thomas DY, Bergeron JJM (2003):** Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends in Biochemical Sciences* **28:**49-57

240. **Schwartz T, Blobel G (2003):** Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell* **112**:793-803
241. **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, Zerres K (2005):** Mutations in *SIL1* cause Marinesco-Sjögren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nature Genetics* **37**:1312-1314
242. **Serrador JM, Nieto M, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Calvo J, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Lozano F, González-Amaro R, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F (1998):** CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* **91**:4632-4644
243. **Shamu CE, Cox JS, Walter P (1994):** The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol.* **4**:56-60
244. **Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon AH, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ (2001):** Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *Caenorhabditis elegans* development. *Cell* **107**:893-903
245. **Shen J, Chen X, Hendershot LM, 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
246. **Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, 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
247. **Simon SM, Blobel G (1991):** A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**: 371-380
248. **Simons JF, Ferro-Novick S, Rose MD, Helenius A (1995):** BiP/Kar2p functions as a molecular chaperone during folding of carboxypeptidase Y in yeast. *J. Cell. Biol.* **130**:41-49
249. **Simpson JC, Roberts LM, Römisch K, Davey J, Wolf DH, Lord JM (1999):** Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Letters* **459**:80-84
250. **Sousa M, Parodi AJ (1995):** The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J* **14**:4196-4203
251. **Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP (1997):** Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**:239-250
252. **Steel GJ, Fullerton DM, Tyson JR, Stirling CJ (2004):** Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science* **303**: 98-101

- 
253. **Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R, Schekman R (1992):** Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol Cell* **3**:129-142
254. **Struck DK, Lennarz WJ, Brew K (1978):** Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with alpha-lactalbumin. *J. Biol. Chem.* **253**:5786-5794
255. **Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981):** Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6613-6617
256. **Suzuki T, Lu J, Zahed M, Kita K, Suzuki N. (2007):** Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys.* **468**:1-14
257. **Szabo A, Korszun R, Hartl F U, Flanagan J (1996):** A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J* **15**:408-417
258. **Szekeres J, Pacsá AS, Pejtsik B (1981):** Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of target cells. *J. Immunol. Methods* **40**:151-154
259. **Ting J, Lee AS (1988):** Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA* **7**:275-286
260. **Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM (1974):** Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **85**:389-398
261. **Toikkanen J, Gatti E, Takei K, Saloheimo M, Olkkonen V, Söderlund H, de Camilli P, and Keränen S (1996):** Yeast protein translocation complex: isolation of two genes *SEB1* and *SEB2* encoding proteins homologous to the Sec61B subunit. *Yeast* **12**:425-438
262. **Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, Rapoport TA (2001):** Protein Disulfide Isomerase acts as a Redox-Dependent Chaperone to Unfold Cholera Toxin. *Cell* **104**:937-948
263. **Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002):** Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**:246-255
264. **Tsukita S, Yonemura S (1999):** Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* **274**:34507-34510
265. **Tu BP, Ho-Schleyer SC, Travers KJ, Weissman JS (2000):** Biochemical basis of oxidativ protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* **290**:1571-1574
266. **Tyedmers JD (2001):** Zur Rolle von Hsp40- und Hsp70-Chaperonen beim Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum des Säugers. *Dissertation, Universität des Saarlandes.*

- 
267. **Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, Haas IG, Heim N, Nastainczyk W, Volkmer J, 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**:7214-7721
268. **Tyedmers J, Lerner M, Wiedmann M, Volkmer J, Zimmermann R (2003):** Polypeptide chain binding proteins mediate completion of cotranslational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO rep.* **4**:505-510
269. **Tyson JR, Stirling CJ (2000):** *LHS1* and *SIL1* provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* **19**:6440-64552
270. **Vaiskunaite R, Adarichev V, Furthmayr H, Kozasa T, Gudkov A, Voyno-Yasenetskaya TA (2000):** Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **275**:26206–262012
271. **Van den Berg B, Clemons J Jr, Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004):** X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**:36-44
272. **Vashist S, Ng DT (2004):** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* **165**:41-52
273. **Vogel JP, Misra LM, Rose MD (1990):** Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol.* **110**:1885-1895
274. **Volkmer J, Guth S, Nastainczyk W, Knippel P, Klappa P, Gnau V and Zimmermann R (1997):** Pancreas specific protein disulfide isomerase, PDIp, is in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *FEBS Lett* **406**:291-295
275. **Von Heijne G (1985):** Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**:99-105
276. **Von Heijne, G. (1986):** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic. Acids. Res.* **14**:4683-4690
277. **Walter P, Blobel G (1981):** Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* **91**:557-561
278. **Walsh P, Bursac D, Law YC, Cyr D, Lithgow T (2004):** The J-Protein Family: Modulating Protein Assembly, Disassembly and Translocation. *EMBO Rep* **5**:567-571
279. **Walter P, Ibrahimi I, Blobel G (1981):** Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* **91**:545-550
280. **Walter P, Blobel G (1982):** Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* **299**:691-698

- 
281. **Walter P, Johnson AE (1994):** Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**:87-119
282. **Walter J, Urban J, Volkwein C, Sommer T (2001):** Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO Journal* **20**:3124-3131
283. **Wang TF, Chang JH, Wang C (1993):** Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J. Biol. Chem.* **268**:26049-26051
284. **Wang XY, Kazim L, Repasky EA, Subject JR (2001):** Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J. Immunol.* **66**:490-497
285. **Wang XY, Kazim L, Repasky EA, Subject JR (2003):** Immunization with tumor-derived ER chaperone *grp170* elicits tumor-specific CD8+ T-cell responses and reduces pulmonary metastatic disease. *Int. J. Cancer* **105**:226-231
286. **Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L, Hinton DR, Lee AS (2010):** Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis *Cell Death Differ.* **17**:488-508
287. **Watts C, Wickner W, Zimmermann R (1983):** M13 procoat and a preimmunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:2809-2813
288. **Wegele H, Haslbeck M, Reinstein J, Buchner J (2003):** Stil is a novel activator of the Ssa proteins. *J Biol Chem.* **278**:25970-25976
289. **Wegele H, Muller L, Buchner J (2004):** Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151**:1-44
290. **Weitzmann A, Volkmer J, Zimmermann R (2006):** The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sill function in man and mouse. *FEBS Lett.* **580**:5237-5240
291. **Weitzmann A (2006):** Untersuchungen zur Rolle der Komponenten der Hsp70/Hsp40-Chaperonsysteme im Cytosol und Endoplasmatischen Retikulum der Pankreaszelle. *Dissertation, Universität des Saarlandes*
292. **Weitzmann A, Baldes C, Dudek J, Zimmermann R (2007):** The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum – a quantitative approach. *FEBS J.* **19**:5175-5178
293. **Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA (1996):** Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc natl. Acad. Sci USA.* **93**:13797-13801
294. **Weston SA, Parish CR (1990):** New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Methods* **133**:87-97

295. **Wiech H, Sagstetter M, Müller G, Zimmermann R (1987):** The ATP requiring step in assembly of M13 procoat protein into microsomes is related to preservation of transport competence of the precursor protein. *EMBO J.* **6**:1011-1016
296. **Wilkinson BM, Critchley AJ, Stirling CJ (1996):** Determination of the Transmembrane Topology of Yeast Sec61p, an Essential Component of the Endoplasmic Reticulum Translocation Complex. *J Biol Chem* **271**:25590-25597
297. **Wilkinson BM, Brownsword JK, Mousley CJ, Stirling CJ (2010):** Sss1p Is Required to Complete Protein Translocon Activation. *Journal of Biol. Chem.* **285**:32671-32677
298. **Wilson CM, Farmery MR, Bulleid NJ (2000):** Pivotal role of calnexin and mannose trimming in regulating the endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain. *J Biol Chem* **275**:21224-21232
299. **Winkeler A, Godderz D, Herzog V, Schmitz A (2003):** BiP-dependent export of cholera toxin from endoplasmic reticulum-derived microsomes. *FEBS Lett* **554**:439-442
300. **Wirth A, Jung M, Bies C, Frien M, Tyedmers J, Zimmermann R, Wagner R (2003):** The Sec61 complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol. Cell.* **12**:261-268
301. **Woolhead C, McCormick PJ, Johnson AE (2004):** Nascent membrane and secretory proteins differ in their FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell.* **116**:725-736
302. **Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000):** ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**:1355-1364
303. **Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S (1998):** Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* **140**:885-895
304. **Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, 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
305. **Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K (2003):** A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response. *Developmental Cell* **4**: 265-271
306. **Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, 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
307. **Young BP, Craven RA, Reid PJ, Willer M, 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**:262-271

308. **Zahedi RP, Völzing C, Schmitt A, Frien M, Jung M, Dudek J, Wortelkamp S, Sickmann A, Zimmermann R (2009):** Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp 40, termed ERj7. *Proteomics*. **9**:3463-3473
309. **Zapun A, Darby NJ, Tessier DC, Michalak M, Bergeron JJM, Thomas DY (1998):** Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.* **273**:6009-6012
310. **Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003):** MicroRNAs and small interfering RNAs can in-hibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:9779-9784
311. **Zhai L, Kita K, Wano C, Wu Y, Sugaya S, Suzuki N (2005):** Decreased cell survival and DNA repair capacity after UVC irradiation in association with down-regulation of GRP78/BiP in human RSa cells. *Exp Cell Res.* **305**:244-252
312. **Zhang K, Kaufman RJ (2004):** Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**:25935-25938
313. **Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, Lee JW, Ackerman SL (2005):** Protein accumulation and neurodegeneration in the woolly mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nature Genetics* **37**:974-979
314. **Zhao L, Ackerman SL (2006):** Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18**:444-452
315. **Zhao L, Rosales C, Seburn K, Ron D, Ackerman SL (2010):** Alterations of the unfolded protein response modifies neurodegeneration in a mouse model of Marinesco-Sjögren syndrome. *Human Molecular Genetics* **19**:25-35
316. **Zhao R, Houry WA (2000):** Molecular Interaction Network of the Hsp90 Chaperone System *Bookshelf ID: NBK6390 Madame Curie Bioscience Database*
317. **Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996):** Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* **272**:1606-1614
318. **Zhu C, Johansen FE, Prywes R (1997):** Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* **17**:4957-4966
319. **Zimmermann R, Zimmermann M, Mayinger P, Klappa P (1991):** Photoaffinity labeling of dog pancreas microsomes with 8-azido-ATP inhibits association of nascent preprolactin with the signal sequence receptor complex. *FEBS Lett* **286**:95-99
320. **Zimmermann R, Müller L, Wullich B (2006):** Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends Mol Med.* **12**:567-573
321. **Zimmermann R, Meyer DI (1986):** 1986: a year of new insights into how proteins cross membranes. *Trends Biochem. Sci.* **11**:512-515

322. **Zu K, Bihani T, Lin A, Park Y-M, Mori K, Ip C (2006):** Enhanced selenium effect on growth arrest by BiP/GRP78 knockdown in p53-null human prostate cancer cells. *Oncogene* **25**:546-554
323. **Zupicich J, Brenner SE, Skarnes WC (2001):** Computational prediction of membrane-tethered transcription factors. *Genome Biol* **2**:research0050

## 7. Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Dissertation anfertigen zu dürfen. Für die Bereitstellung des interessanten Themas, die intensive Betreuung sowie für die stetige Bereitschaft zur Diskussion von Fragen und Problemen danke ich besonders. Danke auch dafür, dass ich die Dissertation parallel zu meiner Arbeit in der Rechtsmedizin fortsetzen konnte.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. M. J. Schmitt für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. J. Wilske sowie Prof. Dr. P. Schmidt danke ich dafür, dass sie mir den nötigen Freiraum zur Durchführung meiner Dissertation gewährt haben.

Jedem einzelnen der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Zimmermann danke ich für die liebenswerte Art, die mir entgegengebracht wurde, für die Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen und Problemen. Dr. Markus Greiner danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Tanja Breinig (Virologie, UdS), insbesondere Tim Schenkel, möchte ich für die Bereitstellung des FACS-Gerätes sowie für die technische Unterstützung danken. Birgit Klemmer (Urologie, UdS) danke ich für die Zusammenarbeit zur Erstellung der Daten mittels Quantitativer RT-PCR.

Dem Graduiertenkolleg 845 „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“ danke ich für die Aufnahme und die fachliche Förderung. Insbesondere Frau Dr. Gabriele Amoroso gilt ein Dankeschön für ihre freundliche Art und der guten Organisation des GRK 845. Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem SFB 530.

Ein besonderer Dank geht an alle meine Freunde, die für die nötige Abwechslung gesorgt und an mich geglaubt haben.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind, mich in jeder Lebenslage unterstützen und an mich glauben, DANKE. Meinem Freund Andreas H. danke ich einfach für alles...