

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Untersuchungen des humanen Sec62-Proteins beim Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum

Dissertation zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Melanie Theis

geb. am: 27.09.1983 in Rüsselsheim

Meinem Rückhalt gewidmet: Carsten & meiner Familie



I.	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	13
II.	EINLEITUNG	15
II.1.	DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM: BEGINN DES SEKRETORISCHEN WEGES.....	15
II.2.	DAS SIGNALERKENNUNGSPARTIKEL UND SEIN REZEPTOR: GRUNDLEGENDE KOMponentEN DES COTRANSLATIONALEN TRANSPORTS.....	17
II.3.	DIE TRANSLOKASE: EINTRITTS-PUNKT DER SEKRETORISCHEN, LUMINALEN UND MEMBRANPROTEINE IN DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM	19
II.3.1.	Der Sec61-Komplex	19
II.3.2.	Das luminale ER-Chaperon BiP und seine Nukleotidaustauschfaktoren.....	20
II.3.3.	Das Sec63-Protein	21
II.3.4.	Das Sec62-Protein des Säugers.....	23
II.3.5.	Das ERj1-Protein	24
II.4.	DER POSTTRANSLATIONALE TRANSPORT	26
II.4.1.	Das Sec62p-Protein der Hefe	26
II.4.2.	Posttranslati onaler Transport im Säuger	29
II.4.3.	Posttranslational e Transportmechanismen der <i>tail anchor</i> -Proteine	31
II.5.	ZIELSETZUNG.....	32
III.	MATERIAL& METHODEN	34
III.1.	MATERIAL.....	34
III.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	34
III.1.2.	Software.....	36
III.1.3.	Chemikalien.....	36
III.1.4.	Enzyme	40
III.1.5.	Antikörper.....	40
III.1.5.1.	Primäre Antikörper	40
III.1.5.2.	Sekundäre Antikörper.....	42
III.1.6.	Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> und Medien und Platten zu deren Anzucht	42
III.1.7.	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> und die Medien und Platten zu deren Anzucht	43
III.1.8.	Verwendete Zelllinien und Medien.....	45
III.1.9.	Verwendete DNA-Oligonukleotide (Primer)	46
III.1.10.	Verwendete Plasmide	46
III.1.10.1.	Plasmide zur Transfektion von <i>S. cerevisiae</i>	46
III.1.10.2.	Plasmide zur Transfektion von humanen Zellen.....	47
III.1.10.3.	Plasmide zur <i>in vitro</i> -Synthese von Proteinen	49

III.1.11.	Verwendete RNA-Oligonukleotide (siRNAs).....	50
III.1.12.	Raue Mikrosomen.....	50
III.2.	METHODEN	51
III.2.1.	Methoden der Klonierung	51
III.2.1.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	51
III.2.1.2.	Restriktionsverdau von Plasmiden oder DNA-Amplifikaten	52
III.2.1.3.	Behandlung restriktionsverdauter Vektoren mit alkalischer Phosphatase.....	53
III.2.1.4.	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese	53
III.2.1.5.	Ligation	54
III.2.1.6.	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	55
III.2.1.7.	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	55
III.2.1.8.	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	56
III.2.1.9.	Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	56
III.2.1.10.	Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	57
III.2.1.11.	Quantifizierung und Reinheit von isolierter DNA	57
III.2.2.	Hefespezifische Methoden.....	58
III.2.2.1.	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	58
III.2.2.2.	Herstellung transformationskompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	58
III.2.2.3.	Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	59
III.2.3.	Methoden der Genexpressionsanalyse via quantitativer <i>real-time</i> PCR.....	59
III.2.3.1.	Isolation von RNA aus humanen Zellen	59
III.2.3.2.	Quantifizierung und Reinheit von isolierter RNA	60
III.2.3.3.	Reverse Transkription	60
III.2.3.4.	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion.....	61
III.2.4.	Methoden der Proteinbiochemie	62
III.2.4.1.	Zellaufschluss zur Westernblot-Analyse	62
III.2.4.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	62
III.2.4.3.	Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	63
III.2.4.4.	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Westernblot)	64
III.2.4.5.	Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	65
III.2.4.6.	Autoradiographie durch <i>Phosphorimaging</i>	66
III.2.4.7.	Densitometrie (quantitative Bestimmung der Signalstärke).....	67
III.2.5.	Methoden der Proteomanalyse via differentieller 2D-Gelelektrophorese.....	67
III.2.5.1.	Proteinextraktion	68
III.2.5.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	69
III.2.5.3.	Fluoreszenzmarkierung isolierter Proteine	69

III.2.5.4.	1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung	70
III.2.5.5.	2. Dimension: SDS-Gelelektrophorese	71
III.2.5.6.	Statistische Auswertung der 2D-DIGE und Vorbereitung der Proteine auf die Massenspektrometrie.....	72
III.2.6.	Methoden der <i>in vitro</i> -Proteintranslokation	73
III.2.6.1.	Präparation semipermeabilisierter Zellen	73
III.2.6.2.	<i>In vitro</i> -Transkription mit SP6/T7-RNA-Polymerase	75
III.2.6.3.	Synthese radioaktiv markierter Polypeptide <i>in vitro</i>	75
III.2.6.4.	Cotranslationale Translokation von Transportsubstraten in Membranvesikel	76
III.2.6.5.	Posttranslationale Translokation von Transportsubstraten in Membranvesikel	76
III.2.7.	Methoden der Zellkultur	77
III.2.7.1.	Kultivierung und Subkultivierung humaner Zelllinien	77
III.2.7.2.	Kryokonservierung und Auftauen von humanen Zelllinien	78
III.2.7.3.	Zellzählung und Viabilitätsmessung mittels <i>Countess[®] automated Cell Counter</i>	79
III.2.7.4.	Säugerzellmanipulation durch RNA-Interferenz.....	79
III.2.7.4.1	Säugerzellmanipulation durch RNAi mittels synthetischer siRNAs	80
III.2.7.5.	Plasmid-vermittelte Säugerzellmanipulation	84
III.2.7.5.1	Säugerzellmanipulation durch Expressionsvektor basierte RNAi.....	85
III.2.7.6.	Echtzeit-Zellanalyse (xCELLigence RTCA)	87
III.2.7.7.	Viabilitätsanalyse mittels Nuclear-ID TM -Reagenz	87
III.2.7.8.	Inhibition des Proteasoms mittels MG132.....	88
III.2.8.	Statistische Analyse	88
IV.	ERGEBNISSE	89
IV.1.	SEC62-KOMPLEMENTATIONSSTUDIE IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	89
IV.2.	UNTERSUCHUNGEN VON SEC62 IN PC3-ZELLEN	92
IV.2.1.	Kinetik nach RNAi-vermittelter Sec62-Depletion als Vorarbeit für die differentielle Proteomanalyse	92
IV.2.2.	Proteomanalyse mittels 2D-DIGE nach RNAi-vermittelter Sec62-Depletion.....	96
IV.3.	UNTERSUCHUNGEN VON SEC62 UND SRA IN HELA-ZELLEN	101
IV.3.1.	Kinetik nach siRNA-vermittelter Proteindepletion von Sec62 und/oder SR α	102
IV.3.1.1.	Zusätzliche Untersuchung der Viabilität nach RNAi-vermittelter Sec62-Depletion mit Nuclear-ID TM -Reagenz	109
IV.3.1.2.	Zusätzliche Untersuchung des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter SR α - Depletion mit dem xCELLigence RTCA System.....	110

IV.3.2. Proteomanalyse mittels Westernblot nach RNAi-vermittelter Sec62- und/oder SR α -Depletion	111
IV.3.2.1. Proteomanalyse nach Sec62-Depletion	111
IV.3.2.2. Proteomanalyse nach SR α -Depletion	115
IV.3.2.3. Proteomanalyse nach gleichzeitiger Depletion von Sec62 und SR α	118
IV.3.3. Analyse der RNAi-vermittelten mRNA-Regulation mittels qRT-PCR.....	120
IV.3.4. Auswirkungen der (gleichzeitigen) RNAi-vermittelten SEC62- und/oder SR α -Depletion auf den Proteintransport ins ER.....	122
IV.3.4.1. Proteintransport ins ER nach SR α -Depletion	124
IV.3.4.2. Proteintransport ins ER nach Sec62-Depletion.....	128
IV.3.4.3. Proteintransport ins ER nach (gleichzeitiger) Sec62- und/oder SR α -Depletion.....	130
IV.3.5. Zellkulturstudien zum Transport von ERj3 nach RNAi-vermittelter SEC62-Depletion	134
IV.4. UNTERSUCHUNGEN DER STABIL SEC63-SHRNA-TRANSFIZIERTEN ZELLINIEN	136
IV.4.1. Analyse des mRNA-Gehalts mittels qRT-PCR der drei stabil SEC63-shRNA-tranfizierten Zelllinien	137
IV.4.2. Proteomanalyse mittels Westernblot der drei stabil SEC63-shRNA-tranfizierten Zelllinien	138
 V. DISKUSSION	 143
 V.1. DEPLETION VON SRA MITTELS RNAI IN HELA-ZELLEN	 143
V.1.1. Etablierung einer effizienten RNAi-Strategie gegen SR α	143
V.1.2. Die Depletion von SR α reduziert das Zellwachstum, ist jedoch nicht letal	144
V.1.3. Die Depletion von SR α hat keinen Einfluss auf die Mengen anderer Proteine, die in der Proteinbiogenese beteiligt sind	147
V.1.4. Die Depletion von SR α reduziert den Transport cotranslationaler Modellsstrate	148
V.2. UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON SEC62	149
V.2.1. Das humane Sec62-Protein kann in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> die Funktion des Hefeorthologs Sec62p übernehmen.....	149
V.2.2. Die Depletion von Sec62 reduziert das Zellwachstum der HeLa-Zellen, ist jedoch nicht letal	149
V.2.3. Die Depletion von Sec62 führt zu einer vermehrten Synthese der Untereinheiten des SRP-Rezeptors	150
V.2.4. Die Depletion von Sec62 verbessert den Transport von ppl.....	153
V.2.5. Interpretation der Proteomanalyse nach Sec62-Depletion mittels 2D-DIGE	154
V.2.6. Die Biogenese von ERj3 ist abhängig von Sec62, bei dessen Mangel weicht die ERj3-Biogenese auf einen SR α -abhängigen Weg aus.....	158

V.3. INTERPRETATIONEN DER GLEICHZEITIGEN RNAI GEGEN SRA UND SEC62 IN HELA-ZELLEN	167
V.3.1. Die gleichzeitige Depletion von SR α und Sec62 führt zu keinen weiteren Phänotypen als die alleinige Depletion eines der beiden Proteine.....	167
V.3.2. SR α und Sec62 agieren parallel im Transport von ppcec.....	168
V.4. FAZIT.....	170
VI. LITERATURVERZEICHNIS.....	171
VII. DANKSAGUNG.....	198

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	mikro
2D	zweidimensional
2D-DIGE	Differentielle 2D-Gelelektrophorese
A	Ampere
Å	Ångström
AA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumperoxodisulfat
Aqua _{dest}	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BAC	Benzyltrimethyl-N-hexadecylammonium-chlorid
BiP	<i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bp	Basenpaare
Brl	<i>Brr2-like</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMV	Zytomegalie-Virus
CNR	Consiglio delle Ricerche
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CTP	Cytidintriphosphat
cyt b5	ER-ständige Variante des Cytochrom b5 (Transportsubstrat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation
ERAD	ER-assozierte Degradation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
Gal	Galaktose
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Gluk	Glukose
GSY	Hefe aus der Kollektion von G. Schlenstedt
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Merrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein
inv ch	invariante Kette (Transportsubstrat)
IQ-Motif	(Isoleucin-Glutamin-Calmodulin-binde-Motif)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogen broth</i>
LV	Leervektor
m	Meter
m	milli
M	Molarität
m ⁷ GpppG	5'-(7-Methyl)-guanosin-5'-guanosintriphosphat
MEM NEAA	Minimum essentiell medium Non-Essential Amino Acids Solution
min	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano
NBD	Nukleotidbindedomäne

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NE	Kernhülle (nuclear envelope)
NEF	Nukleotidaustauschfaktor
Neo	Neomycin
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OST	Oligosaccharyltransferase
P/S	Penicilin/Streptomycin
PBD	Peptidbindedomäne
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pER	peripheres endoplasmatisches Retikulum
pGS	Plasmid aus der Kollektion von G. Schlenstedt
ppcec	Präprocecropin (Transportsubstrat)
ppl	Präprolaktin (Transportsubstrat)
PTGS	posttranskriptionales Gen <i>silencing</i>
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid
Pwo-Polymerase	<i>Pyrococcus woesei</i> -Polymerase
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -Polymerasekettenreaktion
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RISC	RNA induzierter Stilllegungskomplex
RM _s	raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	Ribosom-naszierender Kette Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sabp	stromabwärts Primer
saufp	stromaufwärts Primer
SD	synthetic defined
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekretionsmutante
sER	glattes endoplasmatisches Retikulum (<i>smooth ER</i>)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SILAC	stabile Isotopenmarkierung durch Aminosäuren (<i>stable isotope labeling with amino acids</i>)
siRNA	small interfering RNA
SP	Singalpeptidase
SPC	semipermeabilisierte Zelle
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signalerkennungspartikel
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TA-Protein	<i>tail anchor</i> -Protein
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TM	theoretische Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
TRAM	<i>translocating chain-associating membrane protein</i>
TRAP	<i>translocon-associated protein complex</i>
TRiC	<i>TCPI-ring complex</i>
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	<i>Unit</i> ; Enzymeinheit
UC Berkeley	University of California at Berkeley
UCSF	University of California, San Francisco
UdS	Universität des Saarlandes
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPR	fehlgefaltete-Protein-Antwort (<i>unfolded protein response</i>)
Ura	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)
w/v	Gewichtprozent (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
z.B.	zum Beispiel

I. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

Diese Arbeit verfolgte das Ziel der Charakterisierung des humanen Sec62-Proteins auf zellulärer Ebene. Aus Studien an Hefe ist bekannt, dass Sec62p am posttranslationalen Transport von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum beteiligt ist (Deshaies und Schekman, 1989; Ng *et al.*, 1996; Sadler *et al.*, 1989). Einige Transportsubstrate, zum Beispiel Präprocecropin (ppcec), können neben dem posttranslationalen Weg alternativ auch einen SRP-abhängigen Transportweg nutzen (Lakkaraju *et al.*, 2012; Schlenstedt *et al.*, 1990; Zimmermann *et al.*, 1990a). Damit solche bimodalen Proteine bei Sec62-Mangel nicht auf den SR α -abhängigen Weg ausweichen können, wurde eine SR α -und Sec62-Einzel/Doppel-Depletionsstrategie entwickelt. Dadurch war es möglich Sec62-abhängige Einflüsse auf den Proteintransport und die Zellphysiologie zu demaskieren.

Unter Verwendung der RNAi-Technologie wurde in HeLa-Zellen über 192 Stunden eine Depletionseffizienz des endogenen SR α -Proteingehalts von ca. 80 % erreicht. In diesem Zeitfenster wurden keine Veränderungen der Zellviabilität, der Mengen ribosomaler Proteine, Proteine der fehlgefalteten-Protein-Antwort oder der Proteintranslokation beobachtet. Allerdings wiesen SR α -depletierte Zellen eine um 60 % verlangsamte Zellteilung auf. *In vitro*-Studien an semipermeabilisierten HeLa-Zellen zeigten, dass die Depletion von SR α zu einem reduzierten Transport diverser cotranslationaler Transportsubstrate führte. In zugehörigen Komplementationsexperimenten wurde unter Verwendung eines eigens kreierte SR α -Rettungsplasmids der Phänotyp des reduzierten Proteintransports der unterschiedlichen Transportsubstrate wieder aufgehoben.

Die Depletion von Sec62 über 192 Stunden führte in HeLa- und in PC3-Zellen ebenfalls zu keinem Viabilitätsverlust, aber erneut war die Zellteilung auf die Hälfte verlangsamt. *In vitro*-Transportstudien Sec62-depletierter HeLa-Zellen zeigten einen verbesserten Proteintransport des strikt cotranslationalen Modellsubstrats Präprolaktin. Dies ist auf die fast zweifach erhöhte Menge des SRP-Rezeptors zurückzuführen, der im cotranslationalen Transport den limitierenden Faktor stellt (Lakkaraju *et al.*, 2008). Unter cotranslationalen Bedingungen durchgeführte *in vitro*-Studien zeigten einen reduzierten Transport von ppcec nach der Depletion von SR α . Unter posttranslationalen Bedingungen hingegen wurde erstmals für ein Säugersystem eine Abhängigkeit des ppcec-Transports von Sec62 beobachtet. Durch quantitative Westernblot-Analyse und durch *in vitro*-Transportstudien wurde erstmals eine Rolle von Sec62 in der Proteinbiogenese eines mehr als 160 Aminosäuren langen Proteins (ERj3) nachgewiesen.

Komplementationsstudien in einem Hefestamm, der eine temperatursensitive Mutante des Sec62-Proteins besitzt, implizieren, dass das humane Sec62-Protein in *Saccharomyces cerevisiae* die Funktion des Hefeorthologs ausüben kann. Folglich hindern die im homologen Protein der Hefe nicht vorhandenen positiv geladenen Oligopeptide im N-Terminus des humanen Sec62 dieses nicht daran, auch die posttranslationalen Translokation zu vermitteln.

Role of the human Sec62 protein for protein translocation into the endoplasmic reticulum

This study was aimed to characterize the function of the human Sec62 protein at the cellular level. Studies in yeast revealed the Sec62-dependency of posttranslational transport into the endoplasmic reticulum (Deshaies und Schekman, 1989; Ng *et al.*, 1996; Sadler *et al.*, 1989). Some proteins, like preprocecropin (ppcec), can use both, posttranslational and SRP-dependent dependent pathway (Lakkaraju *et al.*, 2012; Schlenstedt *et al.*, 1990; Zimmermann *et al.*, 1990a). In order to prevent the switch of those bimodal proteins to a SR α -dependent pathway when Sec62 is missing, a single- and a double depletion method of the SR α protein and of the Sec62 protein was established.

Using siRNA interference for 192 h, the depletion efficiency of 80 % was achieved for SR α . During this time window depletion of SR α did not change the cell viability and did not lead to an alteration of the protein levels of ribosomal proteins, proteins of the unfolded protein response or proteins involved in protein translocation. Keeping in mind that the residual protein content was 20 %, SR α does not seem to be essential in HeLa cells. However, cell growth was reduced by 60 %. *In vitro*-studies in semipermeabilized HeLa cells showed a reduced transport of cotranslational substrates when the SR α level was reduced. Corresponding complementation assays with a generated SR α rescue plasmid restored the protein transport into the ER.

Depletion of Sec62 for 192 hours did not reduce the viability of HeLa or PC3 cells, respectively. However, cell division of both cell types was slowed in absence of Sec62. *In vitro*-studies in Sec62-depleted HeLa cells showed an ameliorated transport of the exclusively cotranslational transported substrate preprolactin. This might be explained by the almost twofold increased amount of the SRP receptor level, which is described as the limiting factor in cotranslational protein transport (Lakkaraju *et al.*, 2008). *In vitro* studies under cotranslational conditions showed a reduced transport of ppcec when SR α was depleted. However, under posttranslational conditions ppcec was less translocated when Sec62 was depleted. This is the first time that a posttranslational role of Sec62 was shown in a mammalian transport system. Western blot analysis and *in vitro* studies showed a dependency of the ERj3 protein biogenesis from Sec62. This is the first evidence that Sec62 is involved in protein transport of proteins with more than 160 amino acids.

Complementation studies of a temperature sensitive yeast mutant implicate, that in *Saccharomyces cerevisiae* the human Sec62 protein can fulfill the function of its yeast ortholog. This leads to the conclusion that the positively charged oligo-peptides of the Sec62 N-terminus, which are missing in the yeast homolog, do not interfere with the human Sec62 protein function to accomplish posttranslational translocation.

II. EINLEITUNG

Pro- und Eukaryoten sind zur Abgrenzung vom externen Milieu von Lipiddoppelmembranen umgeben. Während Prokaryoten zum Teil nur ein einziges Kompartiment besitzen, in denen alle chemischen Reaktionen stattfinden müssen (Higgins und Schockman, 1971), wird in Eukaryoten durch zusätzliche Membranen eine Subkompartimentierung erreicht. So werden für unterschiedliche chemische Reaktionen Räume mit spezifischen und optimalen Bedingungen geschaffen. Diese Kompartimente werden als Organellen bezeichnet. Um die spezifischen Funktionen ausüben zu können, unterscheiden sich die Organellen in ihrer Proteinzusammensetzung. So sind für Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* die 20 Untereinheiten der ATPase typisch (Velours *et al.*, 2009), dagegen besitzt der Zellkern ungefähr 30 für ihn spezifische Nucleoporine (D'Angelo und Hetzer, 2008; Raices und D'Angelo, 2012; Taddei *et al.*, 2012). Das endoplasmatische Retikulum (ER) hingegen ist in die Synthese von Steroiden und Phospholipiden (Balasubramaniam *et al.*, 1981; Black *et al.*, 2005; Ishimura und Fujita, 1997) und in die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase involviert (Lang *et al.*, 2011a; Ong *et al.*, 2007; Pinton *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 2005; Soboloff *et al.*, 2012). Ferner ist es für die korrekte Faltung, Assemblierung und posttranslationalen Modifikation von sekretorischen und Transmembranproteinen, deren Qualitätskontrolle und die Integration von Membranproteinen in die Lipiddoppelschicht verantwortlich. Demensprechend besitzt es zum Beispiel spezielle Chaperone, Translokasen und modifizierende Proteine, um diese Funktionen zu gewährleisten (Buchberger *et al.*, 2010; Dempski und Imperiali, 2002; Otero *et al.*, 2010; Zimmermann, 1998). Da sich diese Arbeit mit Proteinen des ERs und deren Funktion in der Proteinbiogenese beschäftigt hat, werden in den folgenden Kapiteln das ER, seine Komponenten und die verschiedenen Proteintranlokationsmechanismen über oder in die ER-Membran beschrieben.

II.1. Das Endoplasmatische Retikulum: Beginn des sekretorischen Weges

Wie auch das Mitochondrium (Bereiter-Hahn und Voth, 1994; Okamoto und Shaw, 2005; Westermann, 2002), stellt das ER kein starres Netzwerk dar. Es bildet ein hochdynamisches System (Friedman und Voeltz, 2011; Hu *et al.*, 2011), das bis zu 10 % des Zellvolumens einnimmt (Baumann und Walz, 2001; English *et al.*, 2009). Es ist über Kontaktstellen mit dem Mitochondrium (Bononi *et al.*, 2012; Fujimoto und Hayashi, 2011; Rowland und Voeltz, 2012) verbunden, bildet die äußere Kernhülle (*nuclear envelope*; NE) (Anderson und Hetzer, 2007; Anderson und Hetzer, 2008; Collas und Poccia, 2000; Walters *et al.*, 2012) und steht durch Abschnüren von und Verschmelzen mit Mantelprotein-Komplex-Vesikeln (*coat protein complex*-Vesikeln) mit dem Golgi-Apparat in Kontakt (Gillon *et al.*, 2012; Micaroni, 2012; Palade, 1975; Szul und Sztul, 2011; Yu und Liang, 2012). Um

seine vielfältigen Funktionen erfüllen zu können, ist das ER in morphologisch distinkte Domänen unterteilt (English *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2012; Lynes und Simmen, 2011). Neben der Unterteilung in die NE und das periphere ER (pER), kann auch letzteres nochmals in raues (rER) und glattes ER unterschieden werden (*smooth* ER, sER)(Pendin *et al.*, 2011). Die Namensgebung rührt daher, dass das rER mit Ribosomen besetzt ist und somit im Gegensatz zum sER rau erscheint. Weiterhin kann morphologisch zwischen Röhren, sogenannten Tubuli, und großen Membranflächen, den *sheets*, differenziert werden. Die Menge an Tubuli und Membranflächen variiert innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen der Eukaryoten (Pendin *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2006; Staehelin, 1997). Da besonders die ausgedehnten Membranflächen mit Polysomen besetzt sind, scheinen sie mit rER gleichzusetzen (Hu *et al.*, 2011) und auf die Synthese von sekretorischen und Membranproteinen spezialisiert zu sein. In diesem Bereich passieren die neu synthetisierten Proteine also durch die Translokase die ER-Membran (Deshaies *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 2011b; Nicchitta *et al.*, 1995), um dort in ihrer Faltung unterstützt, posttranslational modifiziert und über den sekretorischen Weg an ihr Zielkompartiment transportiert zu werden. Das ER stellt somit den Eintrittspunkt in den sekretorischen Weg dar. Die Entdeckung, dass sekretorische und Membranproteine eine Signalsequenz besitzen, die sie für den sekretorischen Weg markieren, war eine der großen Durchbrüche der Zellbiologie in den 1970er Jahren (Blobel und Dobberstein, 1975a; Blobel und Dobberstein, 1975b). Die ursprüngliche Signalsequenz-Hypothese besagt, dass alle Signalsequenzen ein distinktes Sequenzmotif teilen. Jedoch konnte dies relativ schnell widerlegt werden, indem mehrere Vorläuferproteine sequenziert wurden (Hegde und Bernstein, 2006). Dennoch sind allgemeine Charakteristika erkennbar (von Heijne, 1985): die, meist N-terminale und abspaltbare, Signalsequenz umfasst 20 bis 30 Aminosäuren mit einer tripartiten Struktur. N-terminal beginnt die Signalsequenz mit einer positiv-geladenen polaren (n-) Domäne. Darauf folgend liegt die basische, hydrophobe h-Domäne, mit einer Länge von sieben bis dreizehn Aminosäuren (Kapp *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2011). Analysen von Signalsequenzmutanten zeigten, dass diese Region die Kompetenz eines Proteins, den sekretorischen Weg einzuschlagen, am meisten determiniert (von Heijne, 1985). C-terminal wird die h-Region von der ungeladenen, polaren C-Domäne flankiert, welche oft Helix-brechende Proline und Glycine und an den Stellen -3 und -1 kleine ungeladene Aminosäuren besitzt, die die Schnittstelle der Signalpeptidase festlegen (von Heijne, 1990). Auch die Transmembrandomänen (TMDs) der Membranproteine haben eine hydrophobe Kernregion, welche als Signalankersegment zur lateralen Integration der naszierenden Kette in den Lipidbilayer dient (Martoglio und Dobberstein, 1998). Dabei geben der Aufbau der N-terminal gelegenen n-Region und der h-Region die Topologie der TMD bezogen zum Cytosol und zum ER-Lumen an (Sakaguchi *et al.*, 1992; Sipos und von Heijne, 1993; von Heijne, 1986; Wahlberg und Spiess, 1997). Auf Grund der Hydrophobizität der Signalsequenz und der Signalankersegmente, tendieren diese dazu im Cytosol zu aggregieren. Dementsprechend werden diese Regionen von Chaperonen abgeschirmt, sobald sie den ribosomalen Tunnel verlassen (Keenan *et*

al., 1998; Lakkaraju *et al.*, 2008; Walter und Blobel, 1981; Wiech *et al.*, 1987; Wild *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 1988). Gleichzeitig dient eines dieser Chaperone, das Signalerkennungspartikel (SRP), als Komponente eines gerichteten Transports von Ribosom und der naszierenden Kette als Ribosom-naszierender Kette Komplex (RNC) zur ER-Membran (Grudnik *et al.*, 2009; Saraogi *et al.*, 2011). Über die Bindung an den in der Membran lokalisierten SRP-Rezeptor (SR), bestehend aus seinen Untereinheiten SR α und SR β , wird der RNC zur Membran dirigiert (*targeting*) und an den Sec61-Komplex, der Porenkomplex des Translokons, übergeben (Beckmann *et al.*, 1997; Grudnik *et al.*, 2009; Keenan *et al.*, 2001; Prinz *et al.*, 2000; Zopf *et al.*, 1993). Somit wird die Synthese eines Proteins mit hydrophoben Regionen direkt an die Translokation in das ER-Lumen oder die Integration an die ER-Membran gekoppelt. Diese Art des Proteintransports in das ER, ob Membran oder Lumen, wird als cotranslationaler oder auch SRP-abhängiger Transport bezeichnet (siehe Kapitel II.2 und Abbildung 3). Im Gegensatz dazu steht der posttranslationale Proteintransport (siehe Kapitel III.4 und Abbildung 4). Im ER-Lumen wird die korrekte Faltung des Proteins unterstützt (Hellman *et al.*, 1999; Kleizen und Braakman, 2004), die Signalsequenz durch die Signalpeptidase abgespalten (Sato *et al.*, 2006; Weihofen *et al.*, 2002) und das Protein gegebenenfalls durch den Oligosaccharyltransferase (OST)-Komplex glykosyliert (Struck *et al.*, 1978). Das SR α -Protein, als Bestandteil der Direktion des RNCs zur ER-Membran, das Sec62-Protein, als assoziiertes Protein der Translokase, und der posttranslationale Proteintransport standen im Mittelpunkt dieser Doktorarbeit. In den nächsten Kapiteln wird daher auf SR α , Sec62 und die beiden Translokationsmodi näher eingegangen, um dann die Fragestellungen zu definieren.

II.2. Das Signalerkennungspartikel und sein Rezeptor: Grundlegende Komponenten des cotranslationalen Transports

Das in allen drei Domänen des Lebens konservierte SRP besteht aus einer ca. 300 Nukleotiden langen 7SL RNA und sechs assoziierten Proteinen: SRP72, SRP68, SRP54, SRP14 und SRP9 (siehe Abbildung 1) (Keenan *et al.*, 2001; Pool, 2005). Funktionell ist das SRP in die Alu-Domäne und die S-Domäne organisiert (Gundelfinger *et al.*, 1983). Abbildung 1 veranschaulicht die Gliederung des SRPs.

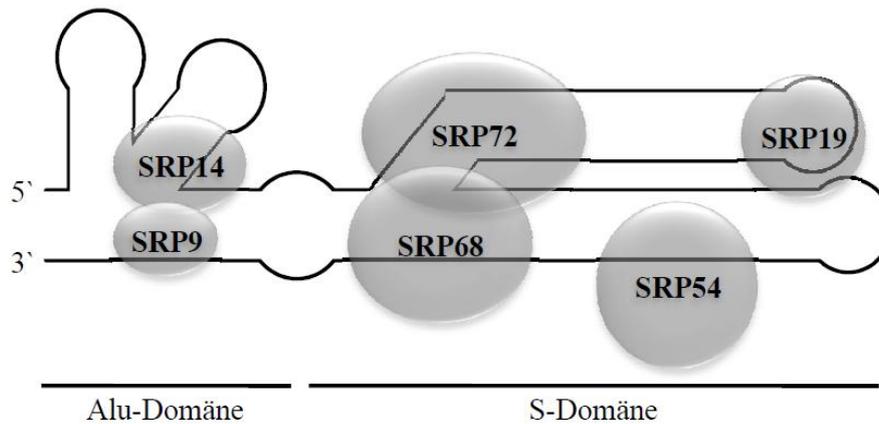


Abbildung 1: Aufbau des Signalerkennungspartikels (SRP)

Das SRP des Säugers besteht aus einer 7SL RNA und sechs Proteinen mit den Molekulargewichten 9, 14, 19, 54, 68 und 72 kDa (Kilodalton). Sie kann in die Alu-Domäne und die S-Domäne gegliedert werden.

Die S-Domäne vermittelt über SRP54 die Bindung des SRPs zur naszierenden Kette, sobald diese aus dem ribosomalen Tunnel herausragt (High und Dobberstein, 1991; Kurzchalia *et al.*, 1986). Die Signalsequenz erhöht die Bindungsaffinität des SRPs zum Ribosom um ein 6000-faches (Walter *et al.*, 1981). Die Alu-Domäne kann daraufhin an das Ribosom binden. Kryoelektronenmikroskopie-Daten lokalisierten die Assoziation der Alu-Domäne an der Elongationsfaktor-Bindestelle des Ribosoms (Halic *et al.*, 2004). Dies verhindert die Translokation der tRNA von der A-Stelle zur P-Stelle. (Terzi *et al.*, 2004). Die Alu-Domäne birgt folglich eine Elongationsarrest-Funktion (Mason *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1997). Der so entstandene Verbund aus Ribosom, naszierender Kette und SRP wird als RNC-SRP-Komplex bezeichnet. Dieser wird über eine durch GTP-Affinitäten vermittelte Kaskade zum SRP-Rezeptor (SR) dirigiert. Der SR besteht aus einem 70 kDa schweren peripheren Membranprotein (SR α) und einem 30 kDa integralen Membranprotein (SR β) (Connolly *et al.*, 1991).

Das SRP54 besitzt eine GTPase-Aktivität. Freies SRP hat nur eine geringe Affinität für Nukleotide. Die Bindung des RNC erhöht die Affinität von SRP54 für GTP (Bacher *et al.*, 1996). Dadurch wird ebenfalls die Affinität von SRP für SR α erhöht. Auch SR α und SR β sind GTPasen (Bacher *et al.*, 1999). Sobald SRP mit SR α in Kontakt tritt, wird auch dieses in einen erhöhten Affinitätszustand für GTP versetzt (Saraogi *et al.*, 2011). Sofern sich das Translokon in relativer Nähe befindet, wird die Signalsequenz an den Sec61-Komplex übergeben (Connolly *et al.*, 1991; Song *et al.*, 2000). Die Bindung des RNC-SRP-Komplex an die ER-Membran führt zu einer Konformationsänderung von SRP54 (Pool *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2004), wodurch das ribosomale Protein L23 freigelegt wird und die Übergabe des Ribosoms an den Sec61-Komplex ermöglicht wird (Halic *et al.*, 2004). Die reziproke stimulierende GTPase-Aktivität zwischen SRP54 und SR α führt zu einer Dissoziation beider. Da das SRP die Signalsequenz freigegeben hat, kann die naszierende Kette durch den aufgehobenen Elongationsarrest nun cotranslational durch die Pore des Translokons in das ER-Lumen synthetisiert oder in die ER-Membran inseriert werden. Die Komponenten des zielgerichteten

Transportsystems, Ribosom, SRP, SR α , SR β und das Translokon, können anschließend einen neuen Syntheszyklus beginnen (Connolly *et al.*, 1991; Keenan *et al.*, 2001). Dies kann bedeuten, dass sich das Ribosom nach Beenden der Proteinsynthese vom Sec61-Komplex löst und ein kompletter neuer SRP-Zyklus beginnt. Alternativ wurde von Nicchitta das Modell geprägt, dass das Ribosom oder zumindest die große Untereinheit des Ribosoms an der ER-Membran assoziiert bleibt und entweder durch einen lokalen mRNA-Pool die Assemblierung eines aktiven Ribosoms initiiert oder im Falle des assemblierten Ribosoms eine neue Synthese startet (Nicchitta, 2002; Potter und Nicchitta, 2000; Potter *et al.*, 2001). Codiert die mRNA für ein cytosolisches Protein, nimmt der RNC eine dynamische Konformation ein, die Bindungsaffinität zum Translokon verringert sich und das Ribosom löst sich von der ER-Membran.

II.3. Die Translokase: Eintrittspunkt der sekretorischen, luminalen und Membranproteine in das Endoplasmatische Retikulum

Der Eintrittspunkt des neu synthetisierten Vorläuferproteins stellt die Translokase dar. Dabei ist unerheblich, ob die Proteine über den cotranslationalen oder posttranslationalen Transportweg die ER-Membran erreichen. Lediglich die Gruppe der *tail anchor*-Proteine (TA-Proteine) bildet eine Ausnahme, da deren Insertion und Integration in das ER unabhängig von der zentralen Komponente der Translokase abläuft (Lang *et al.*, 2012).

II.3.1. Der Sec61-Komplex

Im Eukaryoten wird der zentrale proteinleitende Kanal der Translokase durch den trimeren Sec61-Komplex gebildet, der hochkonserviert ist (Görlich *et al.*, 1992). Er besteht im Säuger aus den Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ . Während Sec61 α und Sec61 γ für das Überleben der Zelle essentiell sind, ist die β -Untereinheit nicht essentiell und besitzt in Bakterien kein direktes Analogon (Matlack *et al.*, 1998; Nishiyama *et al.*, 1994; Park und Rapoport, 2012; Rapoport, 2007). Sowohl bei Sec61 β als auch bei Sec61 γ handelt es sich um TA-Proteine mit je nur einer TMD, Sec61 α hingegen umfasst zehn TMDs mit cytosolisch lokalisiertem N- und C-Terminus (Rapoport, 2007). Der Sec61-Komplex ist in zwei Hälften gegliedert (TMD1-5 und TMD6-10) und bildet eine sanduhrförmige Struktur aus (Hanein *et al.*, 1996; Van den Berg *et al.*, 2004). Im Inneren befindet sich ein proteinleitende Kanal, in den sechs hydrophobe Reste hineinragen und so eine Dichtung, den sogenannten Porenring, um die durch den Kanal gleitende Polypeptidkette bildet (Gumbart und Schulten, 2006). Desweiteren bildet die TMD2 eine Art Stöpsel (*plug*), die den Sec61-Komplex vom Lumen aus abdichtet. Der Porenring und der Stöpsel dienen somit der Aufrechterhaltung der

Permeabilitätsbarriere (Dalal und Duong, 2011; Van den Berg *et al.*, 2004). Wenn ein Polypeptid den Kanal passiert, weitet sich der Porenring und der Stöpsel verschiebt sich seitlich (Flower, 2007). Zwischen den TMD2 und 7 bindet die Signalsequenz und öffnet, sofern es sich bei dem Polypeptid um ein Membranprotein handelt, seitlich zwischen diesen beiden TMDs das laterale Tor (*lateral gate*) (Martoglio *et al.*, 1995; Mothes *et al.*, 1997; Singer *et al.*, 1987; Van den Berg *et al.*, 2004). Durch letzteres können dann die TMDs des passierenden Polypeptids seitlich in die Lipidmembran entlassen werden. Sofern es sich bei dem Transportmodus um den cotranslationalen Transport handelt, bindet das Ribosom auf luminaler Seite an die Schleifen 6 und 8 (Beckmann *et al.*, 1997). Dadurch bleibt der Sec61-Komplex ein passiver Partner in der Proteintranslokation, da der Antrieb für die Passage des Vorläuferproteins durch die Translokationsaktivität des Ribosoms gestellt wird.

II.3.2. Das luminaire ER-Chaperon BiP und seine Nukleotidaustauschfaktoren

Von luminaler Seite bindet das Chaperon BiP an ein J-Domäne-haltiges Protein (Hitzeschockprotein 40, Hsp40) in der Nähe des Sec61 α -Proteins. So unterstützt es vektoriell durch repetitives Binden und Entlassen der translozierenden Proteinkette ähnlich einer molekularen Ratsche von luminaler Seite aus den Transport in das ER (Matlack *et al.*, 1999). Mit einer Konzentration von 5 μ M in rauen Hundemikrosomen (RMs) (Bies *et al.*, 1999; Guth *et al.*, 2004; Weitzmann *et al.*, 2007) stellt BiP das zentrale Hsp70-Chaperon des ER-Lumens. Es ist klassisch in zwei distinkte Domänen gegliedert: eine hochkonservierte N-terminalen Nukleotidbindedomäne (NBD), die C-terminal mit einer Peptidbindedomäne (PBD) verbunden ist (Hendershot, 2004; Ni und Lee, 2007). Die PBD kann kurze, lineare Peptidmotife erkennen, welche in bereits gefalteten Proteinen nicht mehr an der Oberfläche exponiert werden, und bindet sie in einer Peptidbindetasche (Fourie *et al.*, 1994). Diese wird vom äußersten C-Terminus von BiP verschlossen, welcher ebenfalls der Substraterkennung dient. In Kooperation mit einer J-Domäne und eines Nukleotidaustauschfaktors (NEF) kann BiP so die Hsp70-Zyklen durchlaufen (Mayer *et al.*, 2001; Mayer und Bukau, 2005), mit dessen Hilfe es hydrophobe Bereiche abschirmt und die linearen Proteine faltet (Otero *et al.*, 2010). Ist ATP in der NBD gebunden, hat die PBD eine offene Konformation mit einer niedrigen Substrataffinität. Durch die Bindung von BiP an die J-Domäne des in der Nähe befindlichen Proteins wird die ATPase-Aktivität der NBD stimuliert, wodurch ATP zu ADP hydrolysiert. Dadurch schließt sich die PBD und ihre Substrataffinität wird erhöht. Ein NEF, im Säuger Sil oder GRP170, vermittelt den Austausch von ADP zu ATP, wodurch das Substrat letztendlich gefaltet entlassen wird und der Hsp70-Zyklus von neuem beginnen kann. Depletionsstudien ergaben, dass BiP in PC3- und HeLa-Zellen, ähnlich wie sein Homolog Kar2p in Hefe, ein essentielles Protein ist (Cappel, 2011; Schäuble *et al.*, 2012).

Im ER des Säugers konnten bisher sieben Hsp40-Chaperone mit J-Domäne im Lumen nachgewiesen werden (ERjd1-ERjd7) (Otero *et al.*, 2010). Die Konzentrationen der einzelnen ERjd-Proteine variiert stark, so hat ERj1 in RMs eine Konzentration von 0,36 μM , ERj5 hingegen eine Konzentration von 2,0 μM (Weitzmann *et al.*, 2007). Im Falle des ERj3-Proteins interagiert dieses mit den Substraten von BiP, rekrutiert selbiges durch dessen Bindung an die J-Domäne des ERj3-Proteins und vermittelt so die Interaktion des Hsp70-Chaperons mit dem Substrat (Bies *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2009; Vembar *et al.*, 2010). Noch bevor die Faltung des Substrats abgeschlossen ist, dissoziiert das ERj3-Protein vom BiP-Substrat-Komplex (Jin *et al.*, 2008). Zwei weitere der ERdj-Proteine, Sec63 und ERj1, werden später näher erläutert (siehe Kapitel II.3.3 und II.3.5).

BiP ist neben seiner Funktion im Proteinimport oder der Faltungsunterstützung seiner Substrate auch in der Aufrechterhaltung der ER-Homöostase involviert. Unter „normalen“ Bedingungen, bei denen das ER mit der Faltung neu importierter Polypeptide nicht ausgelastet ist, ist BiP an die Stresssensoren ATF6, Ire1 und PERK gebunden (Hetz, 2012; Liu *et al.*, 2003; Pavitt und Ron, 2012; Walter und Ron, 2011). Sollte ein Protein durch die Qualitätskontrolle im ER als fehlgefaltet identifiziert werden, wird es ins Cytosol retrotransloziert und dort vom Proteasom degradiert (Bonifacino und Weissman, 1998; Johnson und Haigh, 2000; Meusser *et al.*, 2005). Diesen Prozess nennt man ER-assoziierte Degradation (ERAD) (Bernasconi und Molinari, 2011). Wenn dieser Mechanismus jedoch überlastet wird, führt es zu ER-Stress und die fehlgefaltete-Protein-Antwort (*unfolded protein response*, UPR) wird initiiert. BiP ist ein Regulator dieser Stress-Antwort, da es von den Stresssensoren dissoziiert, wenn die Last der fehlgefalteten Proteine im ER zu groß wird, und daraufhin die Stresssensoren die UPR aktivieren können. Dadurch kommt es zu zwei generellen Reaktionen der Zelle (Bernaes *et al.*, 2006): erstens wird die Synthese neuer Proteine reduziert, um die Überlastung des ERs zu mindern und zweitens wird die Transkription spezifischer Gene, wie z.B. für Chaperone, erhöht (Hampton, 2000; Liu und Kaufman, 2003; Shamu, 1997; Shamu, 1998; Sidrauski *et al.*, 1998). Reicht dies letztendlich nicht aus, um die ER-Homöostase wieder herzustellen, wird über eine Kaskade die Apoptose eingeleitet (Szegezdi *et al.*, 2006).

II.3.3. Das Sec63-Protein

Eines der J-Domäne-Proteine des ERs ist Sec63, das auch ERjd2 bezeichnet wird. Es durchspannt die ER-Membran drei Mal (siehe Abbildung 2) und liegt mit einer Konzentration von 1,98 μM in RMs aus Pankreas in einem äquimolaren Verhältnis zu Sec61a vor (Weitzmann *et al.*, 2007). Wie auch sein Hefeortholog Sec63p, ist das Säuger-Sec63 mit dem Sec61-Komplex assoziiert (Meyer *et al.*, 2000). Seine Funktion ist in der Hefe schon gut untersucht. Dort stellt es sowohl eine Komponente des heptameren SEC-Komplexes als auch einen Teil des hexameren SEC'-Komplexes dar (Wilkinson und

Stirling, 2009). Demnach wird es als essentielles Protein für den co- und den posttranslationalen Transport benötigt (Brodsky *et al.*, 1995; Panzner *et al.*, 1995; Tyedmers *et al.*, 2000). In Hefe interagiert der negative geladene C-Terminus von Sec63p mit einer im N-Terminus lokalisierten positive Domäne von Sec62p (Wittke *et al.*, 2000). Müller *et al.* konnten 2009 die gleiche Interaktion auch im Säuger nachweisen (Müller *et al.*, 2009). Unterstützt wird diese Beobachtung durch Studien an *Trypanosoma brucei* (Goldshmidt *et al.*, 2008). Das trypanosomale Sec63-Protein hat keinen negative geladen C-Terminus und gleichzeitig fehlt in diesem Organismus auch das Sec62-Protein. Ein schematischer Vergleich der Interaktion von Sec62 und Sec63 in der Hefe und im Säuger ist in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst konnte erneut in Hefe gezeigt werden, dass Sec63p von der CK2 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung wird für eine Rekrutierung des Sec62p zu dem SEC'-Komplex benötigt, um einen kompletten SEC-Komplex stellen und Proteine effizient in das ER translozieren zu können (Wang und Johnsson, 2005). Im Jahre 2012 konnte die Phosphorylierung von Sec63 des Säugers ebenfalls demonstriert werden. Wie sich zeigte, verstärkte die Phosphorylierung von Sec63 seine Bindung an Sec62 (Ampofo *et al.*, 2012).

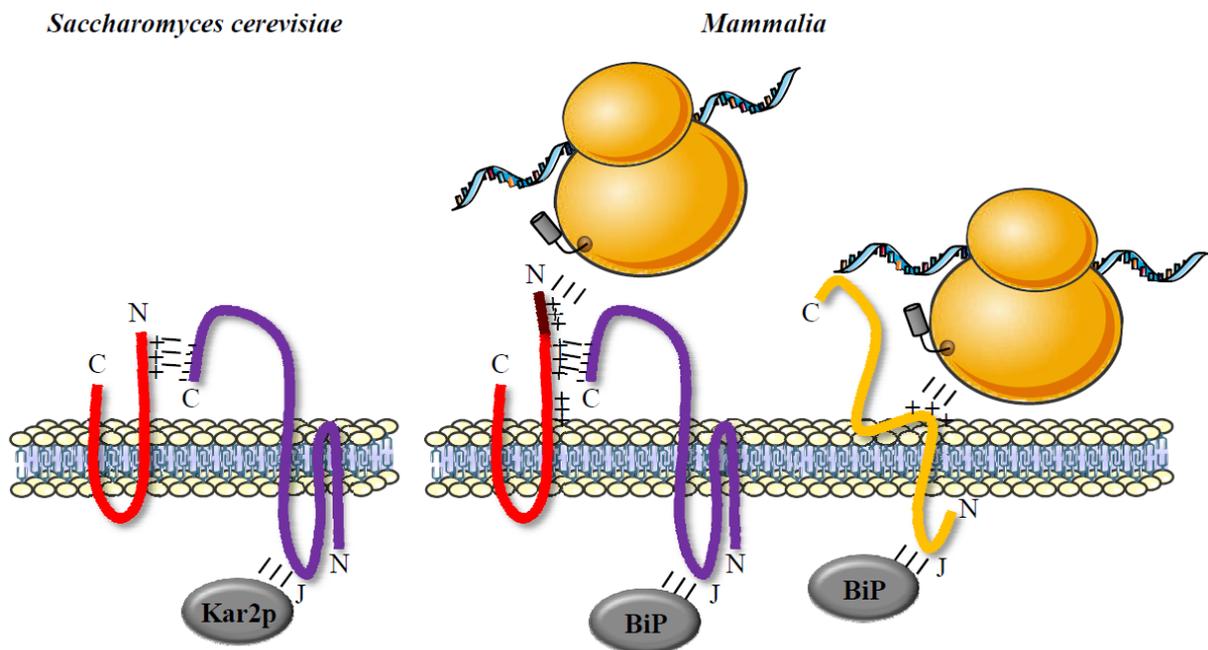


Abbildung 2: Strukturelle und funktionale Charakteristika von Sec62, Sec63 und ERj1 des Säugers im Vergleich zu deren Homologen in der Hefe

Das membranständige Sec62/Sec62p ist in rot dargestellt. Für das Säugerprotein ist das in der Evolution gewonnene basische Oligopeptid, über das es die Bindung mit dem Ribosom eingeht, in dunkelrot dargestellt. In violett ist das membranständige Sec63/Sec63p abgebildet. Zu erkennen sind dessen Interaktionen mit Sec62/Sec62p und mit BiP/Kar2p. Ferner ist ERj1 in orange dargestellt. Es vereint Charakteristika von Sec62 und Sec63, da es sowohl an BiP als auch an das Ribosom binden kann.

II.3.4. Das Sec62-Protein des Säugers

Während Sec62p und seine Funktion in der Hefe gut charakterisiert werden konnten (siehe Kapitel III.4.1), ist über sein Säuger-Ortholog erst wenig bekannt. Es liegt in stöchiometrischen Mengen wie Sec63 und Sec61 α vor (Guth *et al.*, 2004; Tyedmers *et al.*, 2000). Das Sec62-Protein besitzt zwei TMDs und beide Termini sind im Cytosol lokalisiert (siehe Abbildung 2). Zudem konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls mit Sec63 und dem Sec61-Komplex assoziiert vorliegt und dass die Bindung an Sec63 durch dessen Phosphorylierung durch die CK2 gestärkt wird (Ampofo *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2009). Im Laufe der Evolution hat Sec62 zusätzlich eine Ribosomenbindestelle gewonnen (Müller *et al.*, 2009). In Bindungsversuchen konnte so für das humane Sec62 gezeigt werden, dass es über zwei basische Oligopeptid-Motive in seinem N-Terminus hochaffin ($K_D = 100$ pM) an nichttranslatierende 80S-Ribosomen binden kann. Dies ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Eine ähnliche Bindung eines Proteins an Ribosomen über N-terminale basische Oligopeptide ist auch vom naszierenden Polypeptid assoziierten-Komplex (Grallath *et al.*, 2006; Wegrzyn *et al.*, 2006), von SRP14 (Mary *et al.*, 2010) und von ERj1 (Dudek *et al.*, 2002) bekannt. Diese Fakten legen auch im Säuger eine Funktion von Sec62 im Proteintransport nahe.

In der Hefe spielt Sec62 eine zentrale Rolle im posttranslationalen Transport. Da sich diese Arbeit in großem Maße mit der Untersuchung des Sec62-Proteins im Säuger beschäftigt, welches eine große Homologie zum Hefe-Sec62p aufweist, wird auf das Sec62p und die Grundlagen der posttranslationalen Translokation in Kapitel III.4 näher eingegangen.

Neben seiner postulierten Rolle in der Proteinbiogenese scheint Sec62 auch eine pathologische Wirkung in der Entwicklung von Tumoren zu haben. Ein erster Zusammenhang zwischen Sec62 und Tumorerkrankungen wurde 2006 hergestellt (Jung *et al.*, 2006). Genetische Vergleichsstudien von Prostatakarzinompatienten detektierten eine vorher nicht bekannte Amplifikation des SEC62-Gens. Studien wiesen neuerdings auch erhöhte SEC62-mRNA- und Sec62-Protein-Mengen in tumorösen Lungengewebe nach (Linxweiler *et al.*, 2012). Im Falle des Prostatakarzinoms ist die erhöhte Sec62-Proteinmenge besonders bei erhöhtem Gleason-Score evident und proportional zur Tumoraggressivität (Greiner *et al.*, 2011a). Der Zusammenhang der Invasions- und Migrationskompetenz von Zellen und ihrem Sec62-Proteingehalt konnte folgend an PC3-Zellen nachgewiesen werden. Nach Reduktion des Sec62-Gehalts war die Fähigkeit ein Matrigel oder einen Fluoroblock zu passieren drastisch (Greiner *et al.*, 2011a) reduziert und konnte nach anschließender Erhöhung des Sec62-Levels wieder gesteigert werden (Linxweiler *et al.*, 2012).

II.3.5. Das ERj1-Protein

Das monotope Membranprotein ERj1 exponiert seine N-terminale J-Domäne in das ER-Lumen (Dudek *et al.*, 2002). Gleichzeitig besitzt es C-terminal ein zu Sec62 analoges basisches Oligopeptid, über das es eine hochaffine Bindung mit translatierenden Ribosomen eingeht (Benedix *et al.*, 2010; Blau *et al.*, 2005). Die Assoziation des Ribosoms hemmt die Proteinsynthese, was durch die Bindung von BiP wieder aufgehoben wird (Benedix *et al.*, 2010). Somit verbindet es die Eigenschaften des Sec62/Sec63-Komplexes im Säuger, indem es auf cytosolischer Seite Ribosomen und auf luminaler Seite BiP binden kann. Dadurch wird sichergestellt, dass BiP bei Eintritt einer naszierenden Kette sich in der Nähe des Translokons befindet und direkt das elongierende Polypeptid binden kann. In Abbildung 2 sind die Topologie und die Interaktionen des ERj1-Proteins mit Ribosom und BiP dargestellt. Wie auch Sec63 wird ERj1 von der CK2 phosphoryliert (Götz *et al.*, 2009). Im Hefegenom ist kein ERj1-Ortholog codiert.

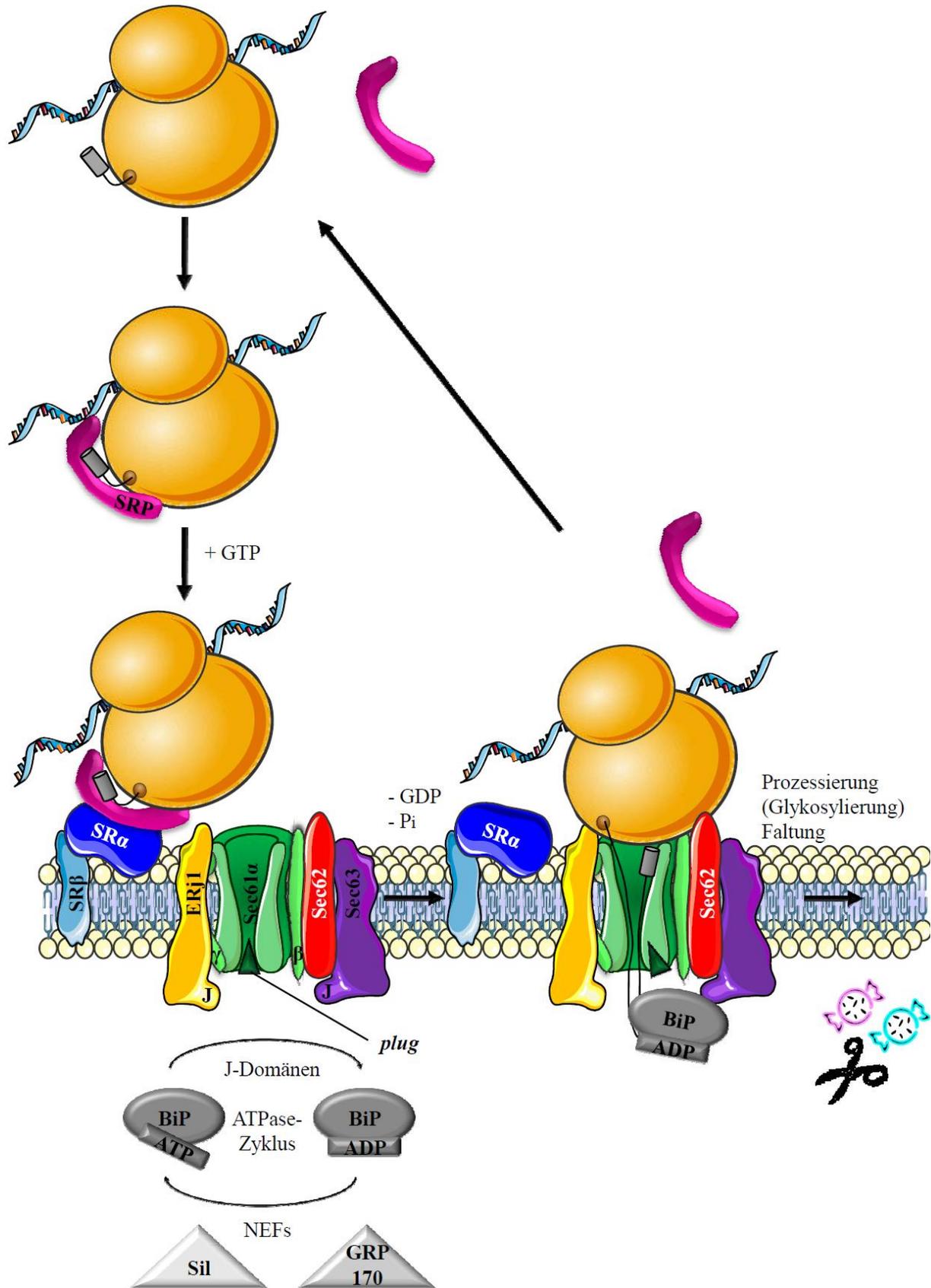


Abbildung 3: Cotranslationaler Proteintransport in das ER des Säugers

Die N-terminale Signalsequenz der naszierenden Kette (grau) wird vom Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt und der Translationsarrest initiiert. Unter GTP-Bindung assoziiert das SRP mit seinem in der ER-Membran lokalisierten Rezeptor, bestehend aus SRα und SRβ. Durch GTP-Hydrolyse wird der Komplex aus Ribosom und

naszierender Kette an das Translokon übergeben und der Translationsarrest aufgehoben. Das Translokon ist in seiner Zusammensetzung aus ERj1, dem Sec61-Komplex (Sec61 α , Sec61 β (β) und Sec61 γ (γ)), Sec62 und Sec63 dargestellt. Das Protein gleitet während dem Fortschritt seiner Synthese durch die Pore der Translokase. Auf luminaler Seite kann das Hsp70 BiP unter ATP-Verbrauch die naszierende Kette binden. Die ATPase-Aktivität des Hsp70 wird durch die J-Domänen (J) von z.B. ERj1 und Sec63 stimuliert. Der Austausch von ADP zu ATP erfolgt durch die Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) Sil und GRP170. Nach Abschluss der Synthese wird das Protein durch die Signalpeptidase prozessiert, gegebenenfalls durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex glykosyliert und kann seine reife Konformation einnehmen. Integrale Membranproteine werden schon während der Synthese lateral aus dem Sec61-Komplex in die ER-Membran entlassen.

II.4. Der posttranslationale Transport

II.4.1. Das Sec62p-Protein der Hefe

In der Hefe werden sekretorische Proteine auch über den posttranslationalen Transport über oder in die ER-Membran transportiert (Abbildung 4). Die posttranslationale Translokation findet nach Abschluss der Proteinsynthese statt. Dies bedeutet, dass das Vorläuferprotein nach seiner Synthese in das Cytosol entlassen wird und, um Fehlfaltungen und Aggregationen zu vermeiden, von Chaperonen gebunden werden muss. Bei diesen Chaperonen kann es sich zum Beispiel um die Hsp70s Ssa1p und Ssa2p oder um TRiC (*TCP1-ring complex*) handeln (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Plath und Rapoport, 2000). Zusätzlich halten die Chaperone das Polypeptid in einem translokationskompetenten Zustand. Strukturelle Analysen des Sec61 α -Proteins enthüllten, dass der Porendurchmesser zehn bis 20 Å nicht überschreitet (Van den Berg *et al.*, 2004). Somit kann maximal eine α -Helix den Tunnel passieren, eine tertiäre Struktur wäre für die Translokation ungeeignet. Wie genau der Komplex aus Transportsubstrat und Chaperonen zur ER-Membran dirigiert wird, ist nicht bekannt. Jedoch läuft es unter Ausschluss des SRPs und dem SR ab und wird daher auch SRP-unabhängige Translokation bezeichnet. Ein essentielles Protein im posttranslationalen Transport ist in der Hefe Sec62p (Deshaies und Schekman, 1989; Deshaies und Schekman, 1990). Es bildet dafür mit dem heterotrimeren Sec61-Komplex (Lyman und Schekman, 1997), Sec63p, Sec71p und Sec72p den SEC-Komplex (Wilkinson und Stirling, 2009). Quervernetzungsstudien zeigten eine Interaktion von Sec61p, Sec62p und Sec71p mit der Signalsequenz des prepro- α -Faktors. Im Komplex scheinen diese folglich den Signalsequenzrezeptor des Translokons zu stellen (Dünnwald *et al.*, 1999; Plath *et al.*, 1998; Plath *et al.*, 2004; Wittke *et al.*, 2000). Kryoelektronenmikroskopie-Daten von Harada *et al.* verdeutlichten, wie die einzelnen Proteine der Translokase die Assoziation eingehen (Harada *et al.*, 2011). Sec61p interagiert über seine cytosolische Schleife 6 mit der Brl-Domäne des Sec63p (Jermy *et al.*, 2006). Letzteres wechselwirkt durch seinen negativ geladenen C-Terminus mit den positiven Ladungen im N-Terminus von Sec62p (Wittke *et al.*, 2000). Dies ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Wie zuvor in II.3.2 für den cotranslationalen Transport im Säuger beschrieben, stellt auch das Hefe-Homolog von BiP (Rose *et al.*, 1989), Kar2p, die Kraft für eine vektorielle Translokation über die ER-

Membran dar (Brodsky *et al.*, 1993; Matlack *et al.*, 1997; Vogel *et al.*, 1990). Zum einen unterbindet die Assoziation des Transportsubstrats mit Kar2p ein Zurückgleiten des Polypeptids in das Cytosol, zum anderen fungiert Kar2p als eine molekulare Ratsche und befördert das Transportsubstrat in das ER. Analog zum Säuger benötigt Kar2p für die repetitive Bindung des Vorläuferproteins ATP und seine Rekrutierung zum Translokon und die Aktivierung seiner ATPase-Aktivität geschehen durch die J-Domäne des Sec63p (Brodsky und Schekman, 1993; Sadler *et al.*, 1989). Letztendlich wird das Vorläuferprotein durch die Signalpeptidase prozessiert und gegebenenfalls durch den OST-Komplex glykosyliert.

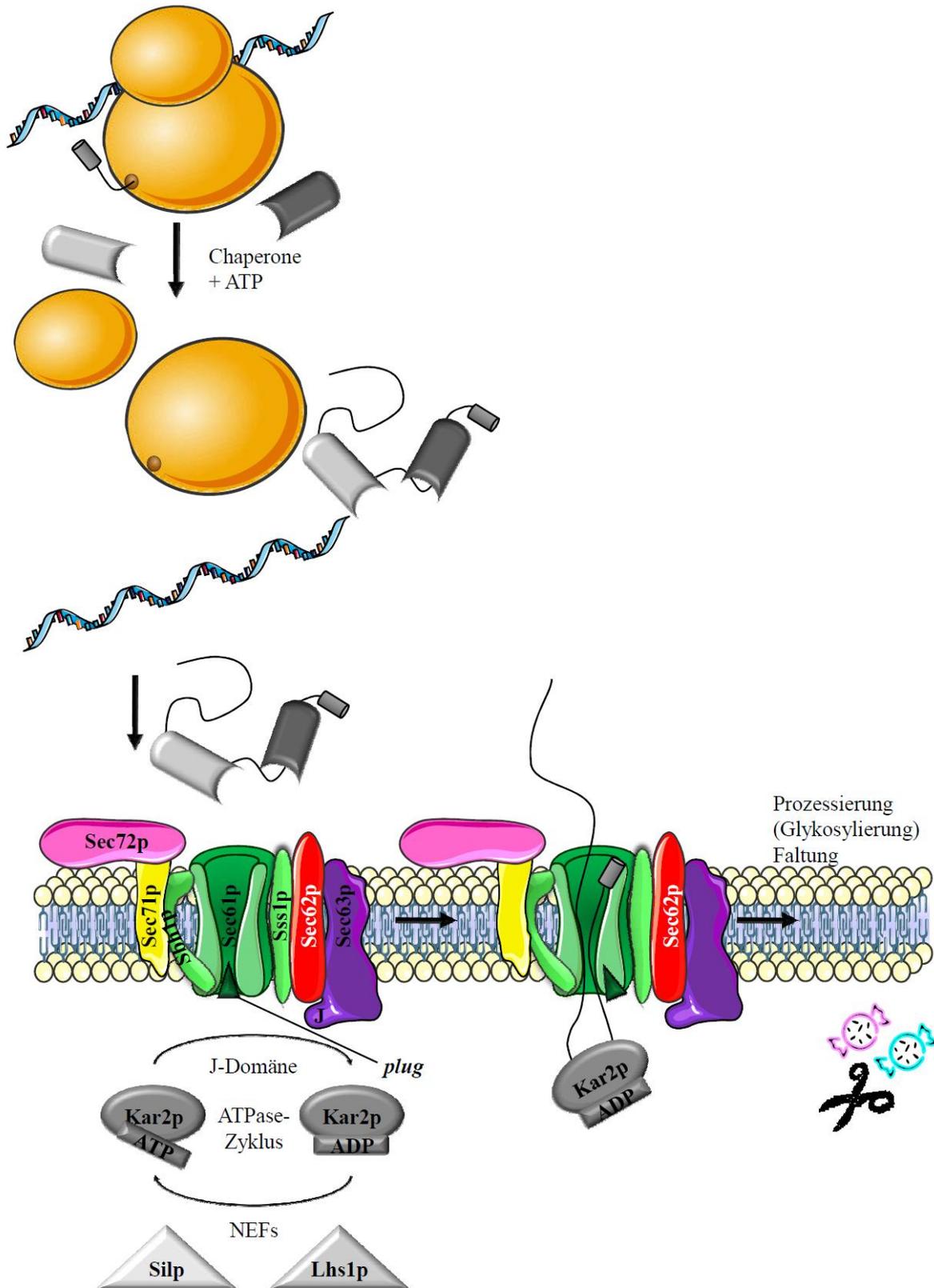


Abbildung 4: Posttranslationaler Proteintransport in das ER der Hefe

Nach Beendigung der Synthese zerfällt das Ribosom in seine Untereinheiten. Das entlassene Vorläuferprotein wird von cytosolischen Chaperonen in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. Nach dem Transport zur ER-Membran bindet die Signalsequenz (grau) an den Signalsequenzrezeptor, der aus Sec61p, Sec62p und Sec71p gebildet wird (hier ist beispielhaft nur die Bindung an Sec61p dargestellt). Auf Grund der Brown'schen

Molekularbewegung gleitet das Transportsubstrat durch die Pore. Nach Erreichen des Lumens kann das durch die J-Domäne (J) von Sec63p zur luminalen ER-Membranseite rekrutierte Kar2p unter ATP-Verbrauch ein Zurückgleiten in das Cytosol verhindern. Zudem fungiert Kar2p als molekulare Ratsche und unterstützt dadurch die Translokation des Vorläuferproteins. Der Austausch von ADP zu ATP erfolgt durch die Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) Silp und Lhs1p. Nach Abschluss der Synthese wird das Protein durch die Signalpeptidase prozessiert, gegebenenfalls durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex glykosyliert und kann seine reife Konformation einnehmen. Integrale Membranproteine werden schon während der Synthese lateral aus dem Sec61-Komplex in die ER-Membran entlassen.

Das ausschlaggebende Kriterium, nach welchem Transportweg das Vorläufersubstrat transportiert wird, ist die Hydrophobizität der Signalsequenz (Ng *et al.*, 1996). Besonders Proteine mit nur relativ leicht hydrophoben Signalsequenzen werden posttranslational in das ER transloziert (Zimmermann *et al.*, 2006).

II.4.2. Posttranslationaler Transport im Säuger

Auch im Säuger wurden Hinweise auf einen möglichen posttranslationalen Proteintranslokationsmechanismus gefunden. *In vitro*-Transportstudien an Hundemikrosomen demonstrierten, dass kleine Proteine von ungefähr 70 Aminosäuren Länge ATP-abhängig, jedoch unabhängig vom SRP und seinem Rezeptor transloziert werden (Müller und Zimmermann, 1987; Müller und Zimmermann, 1988; Schlenstedt *et al.*, 1990; Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Watts *et al.*, 1983; Wiech *et al.*, 1987; Zimmermann und Mollay, 1986). Grund ist, dass die Signalsequenz 20 bis 30 Aminosäuren umfasst (Perlman und Halvorson, 1983; von Heijne, 1981; von Heijne, 1984) und ungefähr 40 Aminosäuren der naszierenden Kette im ribosomalen Tunnel verborgen sind (Bernabeu und Lake, 1982; Blobel und Sabatini, 1970; Malkin und Rich, 1967). Daher wird davon ausgegangen, dass die Synthese der kleinen Proteine schon abgeschlossen ist, bevor das SRP die Signalsequenz der naszierenden Kette erkennen kann und der Transport folglich posttranslational von statten gehen muss. Diese *in vitro*-Studien waren jedoch auf ein limitiertes Set von heterologen Transportsubstraten aus Insekten und Amphibien beschränkt.

Aber auch im Säuger sind kleine Proteine vorhanden. Eine computerbasierte Analyse der Maus-cDNA-Datenbank FANTOM durch das Programm CRITICA führte zu dem Ergebnis, dass ungefähr 10 % der murinen Proteine kürzer als 100 Aminosäuren sind (Frith *et al.*, 2006). Unter Verwendung einer Datenbank für humane sezernierte Proteine (*Secreted ProteinDatabase*, (Chen *et al.*, 2005)), konnten ca. 360 sekretorische Proteine gefunden werden, die weniger als 160 Aminosäuren lang sind (Lakkaraju *et al.*, 2012).

2012 wurden von Johnson *et al.* mit Statherin und Apelin erstmals humane Substrate beschrieben, die posttranslational in Hundepankreas-RMs transportiert werden (Johnson *et al.*, 2012). Statherin ist ein 62 Aminosäuren großes Protein, das in den Speichel sezerniert wird, um dort Calcium zu binden und

somit dessen Präzipitation auf Grund einer zu hohen Calciumkonzentration zu verhindern. Bei Apelin handelt es sich um ein 77 Aminosäuren großes Hormon, das sowohl in unterschiedlichen Geweben synthetisiert als auch mit einer Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen Funktionen beschrieben wird (Castan-Laurell *et al.*, 2011; Falcao-Pires und Leite-Moreira, 2005). Beide Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz. Des Weiteren konnten durch *in vitro*-Synthese von Statherin/Apelin und anschließender Immunoprecipitation eine Interaktion der Vorläuferproteine und TRC40 (*TMD recognition complex of 40 kDa*) demonstriert werden. Dazu wurden unter Anwesenheit von rekombinantem HA-markiertem TRC40 Statherin/Apelin in Retikulozytenlysat radioaktiv-markiert synthetisiert und danach eine Immunoprecipitation mit Nickel-Agarose durchgeführt. Die Vorläuferproteine wurden in dem Eluat der Nickel-Agarose nachgewiesen. Als Rezeptor für den Komplex aus Transportsubstrat und TRC40 wurde WRB identifiziert. Sowohl TRC40 als auch WRB sind ebenfalls im posttranslationalen Transport von TA-Proteinen beschrieben worden (siehe II.4.3). Da ein weiteres Substrat dieser Studien, ppcec, auch nach Depletion von TRC40 effizient in RMs transportiert werden konnten, wird eine alternative posttranslationale Transportroute zum TRC40-Weg vermutet.

Kurze Zeit später demonstrierten Shao und Hegde durch *in vivo*-Transport- und Quervernetzungsstudien, dass die hydrophobe Signalsequenz von ppcec unter physiologischen Calciumkonzentrationen von Calmodulin gebunden wird (Shao und Hegde, 2011a). Calmodulin schirmt die hydrophoben Signalsequenzen der Vorläuferproteine ab, schützt letztere vor Aggregationen und hält sie somit in einem translokationskompetenten Zustand. Ferner zeigten sie erneut, dass ppcec ebenfalls den posttranslationalen Transportweg einschlagen kann. Kriterien für die Assoziation mit Calmodulin waren die Länge des Vorläufersubstrats und die Hydrophobizität der Signalsequenz. Beide Routen, der TRC40-Weg und der Calmodulin-Weg, laufen am Sec61-Komplex zusammen. Das heißt, dass sie parallel zueinander existieren, aber ihre Substrate über den gleichen Weg in das ER translozieren.

Mittlerweile gibt es erste experimentelle Daten, die das Sec62 des Säugers mit dem posttranslationalen Transport in Verbindung bringen. (Lakkaraju *et al.*, 2012). Lakkaraju und seine Kollegen konnten die Hypothese bestätigen, dass kleine Proteine im Säuger in einem SRP-unabhängigen Weg in das ER transloziert werden. Zudem demonstrierten sie, dass dieser Transportmechanismus zum einen ATP-abhängig ist und zum anderen Sec62 benötigt. Größere Proteine hingegen wurden Sec62-unabhängig, dafür jedoch SR α -abhängig transloziert. So wurde z.B. die 100 Aminosäuren große Version des Lysozym C (mit einem His-Marker versehen) nur in Anwesenheit von Sec62 prozessiert. Dies konnte unter posttranslationalen Bedingungen nachgewiesen werden. Die 164 Aminosäuren lange Version (auch mit His-Marker versehen) hingegen benötigte die Anwesenheit von SR α für eine effiziente Prozessierung. Manche Proteine konnten beide Translokationswege nutzen. Chemokin CC2 (141

Aminosäuren inklusive 3-facher FLAG-Markierung) wurde erst dann ineffizient prozessiert, wenn sowohl Sec62 und SRP14 fehlten. Daraufhin wurden drei Kategorien an Proteinen definiert:

1. Proteine kürzer als 120 Aminosäuren: posttranslationaler, Sec62- und ATP-abhängiger Transport
2. Proteine länger als 160 Aminosäuren: SRP-abhängiger, cotranslationaler Transport
3. Proteine länger als 120 Aminosäuren und kürzer als 160 Aminosäuren: Sec62- und SR α -abhängig, da sie sowohl den co- als auch den posttranslationalen Transport nutzen können

Letztendlich gelang es in Immunpräzipitationsstudien eine Interaktion von Sec62 mit dem 100 Aminosäuren umfassenden Resistin nachzuweisen, während eine Interaktion von Sec62 und Präprolactin nicht beobachtet wurde.

II.4.3. Posttranslationale Transportmechanismen der tail anchor-Proteine

An dieser Stelle sollen nochmals kurz die TA-Proteine angeführt werden. Sie werden ebenfalls über einen posttranslationalen Transportmechanismus zur ER-Membran transportiert. Diese Subpopulation an integralen Membranproteinen besitzt ihre TMD innerhalb der letzten 30 Aminosäuren des C-Terminus (Borgese *et al.*, 2003; Borgese und Fasana, 2011). TA-Proteine kommen in allen drei Reichen des Lebens vor und erfüllen sehr heterogene Funktionen wie z.B. vesikulärer Transport (SNARE-Proteine), Apoptose (Proteine der Bcl2-Familie) oder Proteintranslokation (Sec61 β und Sec61 γ) (Borgese und Righi, 2010). Bioinformatische Studien indizieren, dass im Menschen drei bis fünf Prozent der integralen Membranproteine TA-Protein darstellen (Kalbfleisch *et al.*, 2007). Ihre TMD wird erst nach vollständiger Proteinsynthese exponiert, sodass SRP, wenn überhaupt, erst nach Abschluss der Translation binden kann. Folglich müssen diese Proteine während des posttranslationalen Transports ebenfalls von Chaperonen gebunden und zur ER-Membran dirigiert werden. Dort können sie unabhängig von Sec61 α in die ER-Membran inserieren und über vesikulären Transport ihrem Zielort zugeteilt werden (Borgese und Righi, 2010; Lang *et al.*, 2012). Bis jetzt sind drei Wege bekannt, über die die TA-Proteine zur ER-Membran gesteuert werden.

Quervernetzungsstudien von Abell *et al.* zeigten 2004, dass die etablierten TA-Substrate Sec61 β und Synaptobrevin posttranslational spezifische Interaktionen mit SRP eingehen (Abell *et al.*, 2004). Danach wird der Komplex aus Transportsubstrat und SRP, wie auch in der cotranslationalen Translokation, über eine Assoziation von SRP und SR zur ER-Membran dirigiert und an das Translokon übergeben. Für Cytochrom b5, welches auch zur Gruppe der TA-Proteine gehört, wurde eine SRP-unabhängige Translokation beobachtet.

2007 konnte eine Quervernetzung der TMD von Sec61 β mit einem 40 kDa großen Protein nachgewiesen werden. Dieses Protein wurde daraufhin TRC40 benannt (Stefanovic und Hegde, 2007). Jedoch benötigt die Interaktion von TRC40 und der TMD einen zusätzlichen Subkomplex aus den drei Proteinen Bag6, TRC35 und Ubl4a (Hegde und Keenan, 2011; Shao und Hegde, 2011b). Bag6 kann den Subkomplex zum Ribosom rekrutieren, noch während die TMD im ribosomalen Tunnel verborgen ist (Mariappan *et al.*, 2010) und vermittelt daraufhin die Bindung der TMD mit TRC40. Als TRC40-Rezeptor, über den die Direktion des Transportsubstrats und dem Komplex aus TRC40-TRC35-Ubl4a-Bag6 vermittelt wird, konnte 2011 WRB identifiziert werden (Vilardi *et al.*, 2011). Alle Komponenten des TRC40-Weges des Säugers besitzen orthologe Proteine in der Hefe (Shao und Hegde, 2011b). Dort wird diese Route jedoch aus historischen Gründen als Get-Weg bezeichnet.

Da die Integration der TA-Proteine in das ER durch ATP stimuliert werden kann, haben Abell *et al.* 2007 nach cytosolischen Faktoren gesucht, die diese ATP-Abhängigkeit erklären. Wiederum durch Quervernetzungsstudien konnte eine Interaktion von Sec61 β mit Hsc70 und Hsp40 demonstriert werden (Abell *et al.*, 2007). Für die Rekrutierung des Hsc70 scheint besonders die hydrophobe TA-Sequenz von Bedeutung zu sein. Ob die Bindung von Hsc70 und Hsp40 lediglich zu einer translokationskompetenten Form der TA-Proteine führen soll oder aber ein Rezeptor für einen solchen Komplex in der ER-Membran vorliegt, ist noch unklar (Abell *et al.*, 2007).

Rabu *et al.* konnten mittlerweile demonstrieren, dass TA-Proteine mit einem relativ geringen Hydrophobizitätsindex den Hsp40/Hsc70-vermittelten Modus einschlagen, während TA-Proteine mit einem hydrophoberen Signalankersegment den TRC40/WRB-vermittelten Weg favorisieren (Rabu *et al.*, 2008).

II.5. Zielsetzung

Auf Grund der Ähnlichkeit zu seinem Hefeortholog, wurde auch für das humane Sec62-Protein eine Funktion im Proteintransport in das ER postuliert. 2012 wurde letztendlich an semipermeabilisierten HeLa-Zellen und durch Zellkulturexperimente bestätigt, dass Sec62 im posttranslationalen Transport kleiner Proteine beteiligt ist (Lakkaraju *et al.*, 2012). Jedoch könnte sich die Funktion von Sec62 nicht ausschließlich auf den posttranslationalen Transport beschränken. Denn durch die zwei basischen Oligopeptid-Motife im N-Terminus und deren Bindung an Ribosomen (Müller *et al.*, 2009) ist nicht auszuschließen, dass Sec62 im Säuger, im Gegensatz zur Situation in der Hefe, auch an der cotranslationalen Translokation beteiligt sein könnte. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand folglich darin, das humane Sec62 zu charakterisieren und seine Beteiligung im Proteintransport zu klären. Dazu galt es Substratproteine, die in ihrer Biogenese auf Sec62 angewiesen sind, zu identifizieren.

Um zu klären, ob das Sec62 des Säugers in Hefe die gleiche Funktion ausüben kann wie Sec62p der Hefe, wurden Komplementationsstudien des Hefe-Sec62 mit humanem Sec62 in einem temperatursensitiven Hefestamm (SEC62ts) (Deshaies und Schekman, 1989) durchgeführt. Es galt zu analysieren, ob die Hefezellen nach der Synthese des humanen Sec62 auch bei nicht-permissiver Temperatur wachsen können.

Zur Beantwortung der Frage, ob Sec62 im Säuger, wie auch in der Hefe, ein essentielles Protein ist, wurden zellbiologische Methoden herangezogen. Nach siRNA (*small interfering* Ribonukleinsäuren)-vermittelter Sec62-Depletion in humanen HeLa-Zellen wurden das Proliferationsverhalten und die Viabilität der Zellen analysiert. Anhand einer differentiellen 2D-Gelelektrophorese sollten Proteine identifiziert werden, die nach siRNA-vermittelter Sec62-Depletion von PC3-Zellen in reduzierten Mengen vorliegen. Diese galt es als mögliche Substrate von Sec62 in *in vitro*-Transportstudien zu testen.

In *in vitro*-Transportstudien war beobachtet worden, dass das Modellsupstrat Preprocecropin A sowohl co- als auch posttranslational in Hundepankreas-RMs translozieren kann (Schlenstedt *et al.*, 1990). Um in Zellkulturversuchen ein Ausweichen von posttranslationalen Substraten auf den cotranslationalen Transport zu verhindern, sollte eine Zellkulturmethode etabliert werden, mit der der cotranslationalen Transport ausgeschaltet werden kann. Dazu sollte ein System entwickelt werden, in dem der cotranslationale Transport mittels RNAi-vermittelter SR α -Depletion unterbrochen wird. Zudem sollte eine siRNA-Strategie etabliert werden, durch die sowohl SR α als auch Sec62 gleichzeitig depletiert und folglich der cotranslationale und der posttranslationale Transport, sofern Sec62 darin involviert ist, ausgeschaltet werden können. Nach Etablierung dieser Strategien sollten die SR α - bzw. Sec62- und SR α -depletierten Zellen wiederum auf Proliferationsverhalten und Viabilität überprüft werden. Es stellte sich die dabei Frage, ob SR α in Säugerzellen ein essentielles Protein ist bzw. ob die gleichzeitige Depletion von Sec62 und SR α gravierenden Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat, was möglicherweise Nebeneffekte auf spätere Transportstudien haben könnte.

Letztendlich galt es in *in vitro*-Studien die Transporteffizienz definierter Transportsubstrate in HeLa-Zellen nach alleiniger SR α - bzw. Sec62-Depletion oder gleichzeitiger Depletion beider Proteine zu analysieren. Von besonderem Interesse war die Frage, ob sich die Sec62-Abhängigkeit auf kleine Proteine beschränkt, wie es von Lakkaraju gezeigt wurde (Lakkaraju *et al.*, 2012) oder ob auch größere Transportsubstrate Sec62 für ihre Biogenese benötigen. Dazu wurden die Transportsubstrate radioaktiv synthetisiert und unter co- oder posttranslationalen Bedingungen in das ER von semipermeabilisierten HeLa-Zellen transportiert.

III. MATERIAL & METHODEN

III.1. Material

III.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Langenfeld	Gilson-Pipetten
Applied Biosystems, Carlsbad, USA	StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Optical Adhesive Covers (96-Well-Platten) MicroAmp® Fast 96-well reaction plates (0,1 ml)
Beckman, München	GS-6KR Zentrifuge (Bactifuge) J2-MC-Zentrifuge mit JA-10 und JA-20-Rotor
Brand	Einmalküvetten
Eppendorf, Hamburg	Kühlzentrifuge 5402 Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml) Thermomixer comfort Tischzentrifuge 5415R
Eurofins MWG GmbH	Oligonukleotide (Primer)
Fröbel Labortechnik, Wasserburg	Geltrockner Speed-Vac Wipptische
GE Healthcare, Uppsala, Schweden	ECL-Plex Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5 ECL-Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 Ettan DALT ^{six} Electrophoresis System Image Eraser SF Immobiline™ DryStrip 3-11 NL IPGphor 3 Electrophoresis Power Supply EPS 601 Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL Ettan Spot Picker Paper bridges Sample cups Storage Phosphor Screen Exponierplatten Storage Phosphor Screen Exponierkammern

III. MATERIAL & METHODEN

	Image scanner III
	Typhoon Trio™ Scanner
Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim	Sterilbank
Glaserei Wenzel, München	Glasplatten für Gelelektrophorese
Greiner Bio-One, Frickenhausen	Cryo.s™ Kryoröhrchen
	Gewebekulturflaschen 250 ml
	Zellkulturmultiwell-Platten mit 6-, 12- und 96-Well
	Zellkulturschalen mit Ø 3,5 cm und 6 cm
Greiner Labortechnik, Frickenhausen	Rotationsschüttler
Heidolph, Schwabach	Magnetrührer MR 3000
Heraeus, Hanau	Brutschränke
	Trockenschrank
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	Pipetus®-akku-Pipettierhilfe
Isotherm KGW	Behälter für Flüssigstickstoff
Invitrogen, Darmstadt	Countess® Automated Cell Counter
Julabo, Seelbach	Wasserbad
Millipore Co., Bedford, USA	Immobilon-P Transfermembran (0,45 µm Porengröße)
	Milliporewasseranlage Milli-Q
Nikon Instruments, Düsseldorf	Filterset (DAPI, FITC)
	Nikon Eclipse TE 2000-S
	Nikon Plan Fluor 10x/0,3-Objektiv
	Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0,45-Objektiv
Panasonic, Hamburg	Mikrowellenherd
Peqlab, Erlangen	NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer
	Primus 96 advanced-PCR-Maschine
Pharmacia Biotech	Ultraspec 3000 Spectrometer
Roche, Mannheim	XCelligence Real Time Cell Analyzer SP
Rösner- Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden	Handschuhe
Sarstedt, Nürnberg	Pipettenspitzen
	Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP 61, BP 4100, LA 420
Schleicher, Schuell, Dassel	Filterpapiere

III. MATERIAL & METHODEN

Schütt, Göttingen	Autoklav
Scientific Industires, Bohemia, USA	Vortex-Mixer (Genie 2™)
Serva Electrophoresis, Heidelberg	2D Gel DALTsix NF 12.5 %- Kit Gelkassetten Gelroller
Sigma-Aldrich, Steinheim	Glasbeads
Systec GmbH, Wetttenberg	Autoklav DX-65
Thermo Fisher Scientific, Dreieich	Bottle Top-Filterereinheit (500 ml) CO ₂ -Inkubator HERAcCell® 150 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate
Whatman GmbH, Dassel	Whatman FP30/0,2 CA-S rotrand (0,2 µm)
Werkstatt Biochemie 1, Göttingen	Elektrophoresekammern (Eigenbau)
WTW, Weilheim	pH-Meter pH 537
Zeiss, Jena	Binokulares Mikroskop Axiolab für Hellfeld Fluar 20x/0,75 M27- Objektiv
Ziegra, Isernhagen	Eismaschine

III.1.2. Software

GE Heathcare, Uppsala, Schweden	ImageQuant™ 5.1 DeCyder™ 2D 6.5 Labscan
---------------------------------	---

III.1.3. Chemikalien

Applied Biosystems, Carlsbad, USA	siRNA TaqMan® Gene Expression Assays TaqMan® Gene Expression MasterMix
Biochrom AG, Berlin	FCS
Calbiochem® (Merck, Darmstadt)	Digitonin MG132
Carl Roth, Karlsruhe	LB-Agar, LB-Medium
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Agar

III. MATERIAL & METHODEN

Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz	Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability reagent
Fermentas, St. Leon-Rot	Nukleosidtriphosphate PageRuler™-Prestained Protein Ladder
Fluka, Buchs, Schweiz	L-Cystein
GE Healthcare, Uppsala, Schweden	2D Clean up-Kit 2D Quant-Kit Mineralöl Cy-Farbstoff minimal Label- Kit DeStreak-Rehydrierungslösung IPG-Puffer m ⁷ GpppG Pharmalyte
Genomed, Löhne	JET Star Plasmid Purification Midi-Kit
Invitrogen, Darmstadt	1x PBS Gibco® DMEM Gibco® DMEM + GlutamMax™ L-Glutamin MEM NEAA (non-essential amino acid mix) 100x Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer Opti-MEM® SuperScript® II Reverse Transcriptase
Merck Darmstadt	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure Ammoniumsulfat DMSO Dinatriumhydrogenphosphat EDTA Essigsäure Glycerin Ethanol Glycin Kaliumchlorid Magnesiumacetat Manganchlorid Methanol Natriumchlorid Natriumdihydrogenphosphat Rubidiumchlorid

III. MATERIAL & METHODEN

	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Milipore Co., Bedford, USA	Nonidet P40
PAA, Pasching, Österreich	Penicilin/Streptomycin 100x Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) in 1xPBS
Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim	[³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol)
Promega Biotec, Madison, USA	Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated L4960 RNasin®-Ribonukleaseinhibitor
Roche, Mannheim	XCelligence E-Plate (96-Well)
Qiagen, Hilden	HiPerFect Transfection Reagent QIA quick PCR Purification-Kit RNeasy Micro-Kit siRNAs
Remel, Lenexa, USA	Bacto-Pepton
Riedel de Haen, Hannover	Aceton Essigsäure Kaliumacetat
Roche, Mannheim	DTT FuGene HD Lumi Imager F1
Roth, Karlsruhe	Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
Serva Electrophoresis, Heidelberg	Acrylamid APS Bisacrylamid Bromphenolblau SERVA Blue R Ethanol Harnstoff HEPES Saccharose SDS TEMED Thioharnstoff
Sigma-Aldrich, Steinheim	Adeninsulfat β-Mercaptoethanol BSA D(+)-Galaktose

III. MATERIAL & METHODEN

	D(+)-Glukose
	Kanamycin
	L-Alanin
	L-Arginin
	L-Asparagin
	L-Aspartat
	L-Cystein
	L-Glutamin
	L-Lysin
	L-Methionin
	L-Phenylalanin
	L-Prolin
	L-Serin
	L-Threonin
	L-Tryptophan
	myo-Inositol
	para-Aminobenzoensäure
	Polyethylenglykol
	Puromycin-Dihydrochlorid
	Uracil
United States Biological, Swampscott, USA	yeast nitrogen base
Thermo Fisher Scientific, Dreieich	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate
TSI GmbH, Zeven	Sucofin Magermilchpulver

III.1.4. Enzyme

Roche, Mannheim	Proteinase K Pwo-(<i>Pyrococcus woesei</i>) DNA Polymerase RNase A
Fermentas, St. Leon-Rot	Alkalische Phosphatase Bgl II Sal I Xba I Xho I T4-Ligase
Promega Biotech, Madison, USA	SP6 RNA- Polymerase T7 RNA- Polymerase Trypsin

III.1.5. Antikörper

III.1.5.1. Primäre Antikörper

Bei dem Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper handelt es sich um Peptidantikörper. Alle dafür notwendigen Schritte, von Peptidsynthese bis zur Gewinnung der Seren, wurden von Dr. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes (UdS)) durchgeführt. Alle weiteren Antikörper stammen aus der Universität Göttingen oder wurden gekauft. Die Antikörper sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

III. MATERIAL & METHODEN

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper

Antikörper	interne Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
α - β -Aktin	β -Aktin	Monoklonaler Antikörper gegen die β -Untereinheit von Aktin	Maus, Sigma	1:5000
α -BiP	950	Polyklonaler Peptidantikörper gegen BiP, ein Protein des luminales ER-Lumens	Kaninchen, UdS	1:500
α -ERj1	Johanna II	Polyklonaler Peptidantikörper gegen ERj1, ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, UdS	1:500
α -ERj3	336	Affinitätsgereinigter, polyklonaler Peptidantikörper gegen ERj3, ein Protein des ER-Lumens	Kaninchen, UdS	1:200
α -Grp170	ABP150	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Grp170, ein Protein des ER-Lumens	Kaninchen, UdS	1:1000
α -Grp94	Grp94	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Grp94, ein Protein des ER-Lumens	Kaninchen, UdS	1:500
α -RpL4	994	Polyklonaler Peptidantikörper gegen L4, ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit	Kaninchen, UdS	1:500
α -RpL23a	1087/1088	Polyklonaler Peptidantikörper gegen L23, ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit	Kaninchen, UdS	1:500
α -RpS3	680	Polyklonaler Peptidantikörper gegen S3, ein Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit	Kaninchen, UdS	1:500
α -Sec61 α	Göttinger Sec61 α	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Sec61 α , ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, Universität Göttingen	1:200
α -Sec61 β	Sec61 β	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Sec61 β , ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, UdS	1:1000
α -Sec62	Sec62	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Sec62, ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, UdS	1:1000
α -Sec63	Sec63	Polyklonaler Peptidantikörper gegen Sec63, ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, UdS	1:500
α -SR α	SR α	Polyklonaler Peptidantikörper gegen SR α , ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, UdS	1:200
α -SR β	SR β	Polyklonaler Peptidantikörper gegen SR β , ein integrales membranständiges Protein des ERs	Kaninchen, UdS	1:1000
α -SRP54	SRP54	Polyklonaler Peptidantikörper gegen SRP54, die GTPase des SRPs	Maus, BD Transduction Laboratories	1:500

III.1.5.2. Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper wurden gekauft. Es wird dabei zwischen den Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern, welche mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate detektiert werden können, und den Cy-Farbstoff-gekoppelten Antikörpern, welche mittels des Typhoon Trio™ Scanners detektiert werden können, unterschieden. Sie sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

Hersteller	Antikörper	Verdünnung
GE Healthcare, Uppsala, Schweden	ECL-Plex Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5	1:1000
	ECL-Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3	1:1000
Sigma-Aldrich, Steinheim	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:1000
	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus IgG	1:1000

III.1.6. Verwendete Stämme von *E. coli* und Medien und Platten zu deren Anzucht

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*-Stämme) und deren Medien bzw. Platten zur Anzucht sind in Tabelle 3 und angegeben.

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme
(Amp= Ampicilin; LB= *lysogen broth*; Kan= Kanamycin)

Bakterien-stamm	Charakteristik	Zweck	Medium
DH5α	supE44,F-, φ80dlacZΔ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, λ-, thi-1, gyrA96, relA1	Präparation von Plasmiden zur Transfektion von humanen Zellen (Hanahan, 1983)	LB-Medium, LB _{Amp} -Medium, LB _{Amp} -Platten, LB _{Kan} -Medium
JM101	supE thi-1Δ(lac-proAB) [F'traD36 proAB lacIqZΔM15]	Präparation von Plasmiden zur <i>in vitro</i> -Synthese von Transportsubstraten (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)	L LB-Medium, LB _{Amp} -Medium, LB _{Amp} -Platten

Tabelle 4: Zusammensetzung des LB-Mediums bzw. der LB-Platten

LB-Medium		LB-Platten	
LB-Pulver	25 g	LB-Agar	35 g
Aqua _{dest}	1 l	Aqua _{dest}	1 l
autoklavieren		autoklavieren	
		abkühlen	
		in sterilen Petrischalen verteilen	
		aushärten lassen	

Sofern die *E. coli*-Zellen mit einem Plasmid transformiert wurden, das eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker trug, wurde dem Medium nach dem Abkühlen dieses Antibiotikum zugefügt. Die Endkonzentration von Ampicilin betrug 100 µg/ml, die Endkonzentration von Kanamycin 25 µg/ml. Im Falle der LB-Platten wurde das Antibiotikum zwischen dem Abkühlen und Gießen zugefügt. Im Falle der HuSH-shRNA-Plasmide (*small hairpin*) der Firma Origene wurde Kanamycin als Antibiotikum eingesetzt, für alle anderen fand Ampicillin Verwendung. Die Platten wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

III.1.7. Verwendete Stämme von *S. cerevisiae* und die Medien und Platten zu deren Anzucht

Die in dieser Arbeit verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme (*S. cerevisiae*) sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae*

(GSY= Hefe aus der Kollektion von G. Schlenstedt; UC Berkeley= University of California at Berkeley; WT= Wildtyp; YPD= *yeast extract peptone dextrose*)

Hefestamm	Alternativ-name	Genotyp	Herkunft	Referenz	Medium Kultivierungstemperatur
RDM50-94C	SEC62ts (GSY 14)	Mat α /	R. Schekman,	(Deshaies und	YPD-Medium
		leu 2-3,112/	UC Berkeley;	Schekman, 1989)	YPD-Platten
		his 4/ura 3- 52/sec62	G. Schlenstedt, UdS		24 °C
W303	WT	Mat α /leu2/	G. Schlenstedt,	(Fries <i>et al.</i> , 2007)	YPD-Medium
		trp1/ura3/	UdS		YPD-Platten
		ade2/can1			37 °C

Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden auf YPD-Platten bei 24 °C bzw. 37 °C kultiviert (siehe Tabelle 6) und für die Durchführung der Versuche in Flüssigmedium in eine logarithmische Wachstumsphase gebracht.

III. MATERIAL & METHODEN

Tabelle 6: Zusammensetzung des YPD-Mediums bzw. der YPD-Platten

YPD-Medium		YPD-Platten	
Bacto-Pepton	20 g	Bacto-Pepton	20 g
Bacto-Hefeextrakt	10 g	Bacto-Hefeextrakt	10 g
Glukose	20 g	Glukose	20 g
Aqua _{dest}	1 l	Bacto-Agar	20 g
		Aqua _{dest}	1 l
autoklavieren		autoklavieren	
		abkühlen	
		in sterilen Petrischalen verteilen	
		aushärten lassen	

Für die Wachstumstests in Flüssigmedium oder auf Platten, wurde GSY14 mit Vektoren, die URA3 als Selektionsmarker tragen, transformiert. Diese Zellen wurden dann entsprechend in SD_{Ura}-Medium oder auf SD_{Ura}-Platten kultiviert (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8).

Tabelle 7: Zusammensetzung des SD_{Ura}-Mediums bzw. der SD_{Ura}-Platten

SD _{Ura} -Medium		SD _{Ura} -Platten			
<i>yeast nitrogen base</i>	1,7 g	<i>yeast nitrogen base</i>	1,7 g	Bacto-Agar	20 g
Ammoniumsulfat	5 g	Ammoniumsulfat	5 g	Aqua _{dest}	0,75 l
Aminosäuremix (Tabelle 8)	2 g	Aminosäuremix (Tabelle 8)	2 g		
Leucin	1 mM	A Leucin	1 mM	B	
Aqua _{dest}	0,9 l	Aqua _{dest}	0,15 l		
autoklavieren		autoklavieren		autoklavieren	
abkühlen		abkühlen		abkühlen	
40 µl 1 % Thiamin-HCL zugeben		A und B vereinen			
2 % Glukose oder Galaktose zugeben		40 µl 1% Thiamin-HCl zugeben			
		2 % Glukose oder Galaktose zugeben			
		in sterilen Petrischalen verteilen			
		aushärten lassen			

Tabelle 8: Zusammensetzung des Aminosäuremixes

Aminosäuremix			
Adeninsulfat	5 g	L-Lysin	10 g
L-Alanin	10 g	L-Methionin	10 g
L-Arginin	10 g	L-Phenylalanin	10 g
L-Asparagin	10 g	L-Prolin	10 g
L-Aspartat	10 g	L-Serin	10 g
L-Cystein	10 g	L-Threonin	10 g
L-Glutamin	10 g	L-Tryptophan	10 g
L-Glutamat	10 g	L-Tyrosin	10 g
L-Glycin	10 g	L-Valin	10 g
L-Histidin	10 g	<i>myo</i> -Inositol	10 g
L-Isoleucin	10 g	<i>para</i> -Aminobenzoessäure	1 g
L-Leucin	50 g		

Die Platten wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

III.1.8. Verwendete Zelllinien und Medien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und die dafür benötigten Medien sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Medien
(FCS= fetales Kälberserum; P/S= Penicilin/Streptomycin)

Zelllinie	ATCC/DSMZ -Nummer	Charakteristik	Medium
HeLa-ATCC	CCL-2 TM	humane Cervix-Karzinomzelllinie; Virus transformiert; epitheliale Zellen; adhärent	Gibco® DMEM + GlutamMax TM + 10% FCS + 1% P/S
PC3	ACC 465	humane Prostata-Karzinomzelllinie; isoliert aus einer Knochenmetastase; epitheliale Zellen; adherent	Gibco® DMEM + 10% FCS + 1% P/S + 1% MEM NEAA + 1% L-Glutamin

Die Zellen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 % passagiert (siehe III.2.7.1).

III.1.9. Verwendete DNA-Oligonukleotide (Primer)

In dieser Arbeit wurden drei Plasmide für deren Expression in Hefen bzw. Säugerzellen kloniert. Die für die Klonierung eingesetzten Primer sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide (Primer)

(GFP= grünfluoreszierende Protein; IRES= interne ribosomale Bindestelle; Neo= Neomycin; pGS= Plasmid aus der Kollektion von G. Schlenstedt; sabp= stromabwärts Primer; saufp= stromaufwärts Primer)

Name	Alternativname	Sequenz	Schnittstelle	Beschreibung	Ligation in
RZ 245	XbaI-Sec62- saurp	5'-gc-TCTAGA- atggcgggaacgcagg	T [^] CTAGA	Amplifikation von humanem Sec62	pGS59
RZ 246	Sec62-Sall- sabp	5'-tgcg-GTCGAC- tgatttttcatgtgaagatttagg	G [^] TCGAC	Amplifikation von humanem Sec62	pGS59
RZ 345	EcoRV-HIS-SR α - saurp	5'-gcg-GATATC- atgagtcaccatcaccatcactcc	GAT [^] ATC	Amplifikation von humanem SR α mit HIS-Tag	pcDNA3- Neo-IRES- GFP-1
RZ 346	EcoRV-SR α - saurp	5'-gcg-GATATC- atggtcgacttctcaccattttctcc	GAT [^] ATC	Amplifikation von humanem SR α	pcDNA3- Neo-IRES- GFP-1
RZ 331	SR α -XhoI- sabp	5'-gc-CTCGAG- ttaagccttcatgaggcagcc	C [^] TCGAG	Amplifikation von humanem SR α	pcDNA3- Neo-IRES- GFP-1

III.1.10. Verwendete Plasmide

III.1.10.1. Plasmide zur Transfektion von *S. cerevisiae*

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Transfektion von *S. cerevisiae* sind in Tabelle 11 angegeben. Diese Plasmide wurden stets in dem *E. coli*- Stamm JM 101 amplifiziert.

Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Transfektion von *S. cerevisiae*

Plasmidname	Charakteristik	Resistenz- gen	Selektions- marker	Herkunft
pGS59 (Leervektor; LV)	YE _p GAL1 / URA3	Amp	URA3	G. Schlenstedt, UdS
pGS59-SEC62	Insertion von humanem Sec62	Amp	URA3	diese Arbeit

III.1.10.2. Plasmide zur Transfektion von humanen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Plasmide zur Transfektion von humanen Zellen sind in Tabelle 12 angegeben. Diese Plasmide wurden stets aus dem *E. coli*- Stamm DH5 α gereinigt.

Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten shRNA-Plasmide zur Transfektion von humanen Zelle

Plasmidname	Zielgen	Sequenz der shRNA	Resistenzgen	Selektionsmarker	Plasmidnummer	Herkunft
HuSH-shRNA- Kontroll-GFP- Plasimd (LV)	-	-	Kanamycin	Puromycin	TR30007	Origene
HuSH-shRNA- SEC63-GFP- Plasmid #77	SEC63 NM_007214 <i>Homo sapiens</i>	AGTGGAGACC AGATTCTAAT ACGCACAAC	Kanamycin	Puromycin	GI338277	Origene
HuSH-shRNA- SEC63-GFP- Plasmid #79	SEC63 NM_007214 <i>Homo sapiens</i>	CCTGTGCTAT TACCACAGTC AAAGCAACA	Kanamycin	Puromycin	GI338279	Origene
HuSH-shRNA- SEC63-GFP- Plasmid #80	SEC63 NM_007214 <i>Homo sapiens</i>	AAGATGCCAC AAGCAGACCA ACGGATAAT	Kanamycin	Puromycin	GI338280	Origene

III. MATERIAL & METHODEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide zur Transfektion von humanen Zellen sind in Tabelle 13 angegeben. Diese Plasmide wurden stets in dem *E. coli*- Stamm DH5 α amplifiziert.

Tabelle 13: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide zur Transfektion von humanen Zellen
(CMV= Zytomegalie-Virus)

Plasmidname	Charakteristik	Resistenzen	Promotor	Herkunft
pcDNA3-Neo-IRES-GFP (LV)	Insertion einer IRES-GFP-Sequenz in den pcDNA3-Neo-Basisvektor	Ampicillin	CMV	U. Wissenbach, UdS
pcDNA3-Neo-ERj3-IRES-GFP	Insertion von humanem ERj3	Ampicillin	CMV	J. Dudek, UdS
pcDNA3-Neo-Sec62-IRES-GFP	Insertion von humanem Sec62	Ampicillin	CMV	J. Benedix, UdS
pcDNA3-Neo-SR α -IRES-GFP	Insertion von humanem SR α	Ampicillin	CMV	diese Arbeit
pcDNA3-Neo-SR α -HIS-IRES-GFP	Insertion von humanem SR α	Ampicillin	CMV	diese Arbeit

III.1.10.3. Plasmide zur *in vitro*-Synthese von Proteinen

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur *in vitro*-Synthese von Transportsubstraten sind in Tabelle 14 angegeben. Diese Plasmide wurden stets in dem *E. coli*- Stamm JM101 amplifiziert.

Tabelle 14: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur *in vitro*-Synthese von Transportsubstraten

(CNR= Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italien; MPI Freiburg= Max-Planck-Institut für Immunologie, Freiburg; UCSF= University of California, San Francisco)

Transport-substrat	Plasmid-name	Charakteristik	Resistenz-gen	Promotor	Herkunft
ppl	pB4	Präprolaktin, Sequenz aus <i>Bos taurus</i>	Ampicillin	SP6	P. Walter, UCSF
ppcec	pCA1-mut	Mutante von Präprocecropin A: Ile44-Ile45→Met44-Met45), Sequenz aus <i>Hyalophora cecropia</i>	Ampicillin	T7	Sven Lang, UdS
ERj3	pcDNA3-ERj3	ERj3, Sequenz aus <i>Homo sapiens</i>	Ampicillin	T7	J. Dudek, UdS
inv ch	pSputK-inv-c	invariante Kette, Sequenz aus <i>Homo sapiens</i>	Ampicillin	SP6	S. High, University of Manchester
Igκ	PC1 neo KS1	Immunglobulin leichte Kette κ, Sequenz aus <i>Homo sapiens</i>	Ampicilin	T7	I. G. Hass, MPI Freiburg
cyt b5	pGEM4B5-op3	modifiziertes ER-ständiges Cytochrom b5: C-terminaler Opsin-Anhang inklusive Glykosylierungsstelle	Ampicillin	SP6	N. Borgese, CNR

III.1.11. Verwendete RNA-Oligonukleotide (siRNAs)

Die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Oligonukleotide (*small interfering* RNAs; siRNAs) sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs

Name	Zielgen; Organismus	Sequenz (Sense-Strang)	verwendete Konzentration [nM]	Hersteller
<i>BIP</i> -UTR	<i>BIP</i> NM_005347 <i>Homo sapiens</i>	GCGGCUGUUUACUGCUUUUtt	35	Qiagen
Kontrol-siRNA	-	Sequenz unbekannt; AllStar negative control (Qiagen)	10-35	Qiagen
<i>SEC62</i> #1	<i>SEC62</i> NM_003262 <i>Homo sapiens</i>	GGCUGUGGCCAACUAUCUtt	15	Qiagen
<i>SEC62</i> -UTR	<i>SEC62</i> NM_003262	CGUAAAGUGUAUUCUGUACtt	15	Applied Biosystems
<i>SRα</i> #1	<i>SRα</i> NM_0011778421 <i>Homo sapiens</i>	CGGUGACUCCACAGUAAAAtt	15	Qiagen
<i>SRα</i> #2	<i>SRα</i> NM_0011778421 <i>Homo sapiens</i>	GGACAAGAUGCGUGAUCUtt	15	Qiagen
<i>SRα</i> -UTR #3	<i>SRα</i> NM_0011778421 <i>Homo sapiens</i>	CCAGAGCUUUGC UAAUAAUtt	15	Qiagen
<i>SRα</i> #4	<i>SRα</i> NM_0011778421 <i>Homo sapiens</i>	ACCCGGCGUUUGC UAAUAAUtt	15	

III.1.12. Raue Mikrosomen

Als Positivkontrolle für die immunologische Detektion von ER-Proteinen, die mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran überführt wurden, dienten raue Mikrosomen (RMs) aus Hundepankreas. Diese sind vesikuläre Partikel des endoplasmatischen Retikulums und sollten während ihrer Präparation kaum Veränderungen in ihrer Zusammensetzung erfahren haben. Folglich sollten noch alle Proteine, auf die die humanen Zellen in den Westernblot-Analysen getestet wurden, vorhanden sein.

Die Mikrosomen wurden von Dr. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) in einem etablierten Verfahren gewonnen (Görlich und Rapoport, 1993; Walter und Blobel, 1983; Watts *et al.*, 1983).

III.2. Methoden

III.2.1. Methoden der Klonierung

III.2.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mussten erst erstellt werden. Zur Klonierung dieser Plasmide (Tabelle 11 und Tabelle 13) mussten humane cDNAs mithilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert werden. Voraussetzung für eine erfolgreiche *in vitro*-Amplifikation ist die Kenntnis der flankierenden Nucleotidsequenz des DNA-Abschnitts von Interesse, um die entsprechenden komplementären DNA-Oligonukleotide entwerfen zu können. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide sind Tabelle 10 zu entnehmen. Ein PCR-Reaktionsansatz enthielt neben den entsprechenden stromaufwärts und stromabwärts DNA-Nukleotiden die zu amplifizierende DNA, Reaktionspuffer, ein dNTP-Gemisch, aus Desoxyadenosintriphosphat, Desoxycytidintriphosphat, Desoxyguanosintriphosphat und Desoxythymidintriphosphat, und Pwo-DNA-Polymerase. Letztere stammt aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus woesei* und weist aufgrund seiner 3'-5'-Exonuclease-Aktivität eine niedrige Fehlerrate in der PCR auf (Dabrowski und Kur, 1998).

Das Pipettierschema des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 16 angegeben.

Tabelle 16: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes
(DMSO= Dimethylsulfoxid)

PCR-Reaktionsansatz	
10x PCR-Puffer	10 µl
MgCl ₂	8 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
zu amplifizierende DNA (1 µg/µl)	0,5 µl
Pwo-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
DMSO	1 µl
stromaufwärts DNA-Nukleotide (50 µM)	1 µl
stromabwärts DNA-Nukleotide (50 µM)	1 µl
Aqua _{dest.}	ad 100 µl

Nachdem die Proben in den Thermocycler gestellt worden waren, wurde das in Tabelle 17 aufgeführte Programm gestartet:

Tabelle 17: Schema, nachdem die PCR durchgeführt wurde

PCR-Programm		
initiale Trennung der doppelsträngigen DNA	94 °C	5 min
Trennung der doppelsträngigen DNA	94 °C	1 min
Anlagerung der Primer	TM	30 s
Elongation durch die Pwo-Polymerase	72 °C	2 min
Nachinkubation zur Vervollständigung der Synthese	72 °C	10 min
Lagerung im Gerät	8 °C	∞

} 30 Zyklen

Dabei ist die Anlagerungstemperatur der DNA-Nukleotide für jedes Gen unterschiedlich. Diese sogenannte theoretische Schmelztemperatur ist von der Beschaffenheit der beiden verwendeten Primer und dem zuamplifizierenden Fragment abhängig (Rychlik *et al.*, 1990). Im Falle von *SRα* betrug sie 55 °C, im Falle von *SEC62* 53 °C. Um den Erfolg der PCR zu kontrollieren, wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) (siehe Tabelle 19) versetzt und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe III.2.1.4).

III.2.1.2. Restriktionsverdau von Plasmiden oder DNA-Amplifikaten

Für die Klonierung wurden die DNA-Amplifikate mithilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei muss man zwischen präparativem Restriktionsverdau, welche ein Teil der Klonierung darstellt, und analytischen Restriktionsverdau, welche den Erfolg der Klonierung testen soll, unterscheiden. Die Bedingungen der DNA-Spaltung orientierten sich dabei an den verwendeten Restriktionsendonukleasen. Die Pipettierschemata ist in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes

	Präparativer Verdau	Analytischer Verdau
DNA	15 µl PCR-Produkt bzw. 1 µl Plasmid-DNA (=1 µg)	1 µl
Enzymeinheiten	50 U	5 U
10x Puffer	5 µl	1 µl
Aqua _{dest}	ad 50 µl	ad 10 µl

Die Vorgehensweisen bei der präparativen und der analytischen Spaltung unterschieden sich in den nächsten Schritten und waren wie folgend beschrieben.

Die präparative Spaltung erfolgte über Nacht bei 37 °C. Als nächstes wurde der gespaltene, linearisierte Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt (siehe III.2.1.3).

Die analytische Spaltung erfolgte für 1 h bei 37 °C. Um die Reaktion abzustoppen und sie für die anschließende Analyse per Agarose-Gelelektrophorese vorzubereiten (siehe III.2.1.4), wurden 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) (siehe Tabelle 19) zugegeben.

III.2.1.3. Behandlung restriktionsverdauter Vektoren mit alkalischer Phosphatase

Vor der Durchführung der Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt (siehe III.2.1.5) wurde der gespaltene, linearisierte Vektor mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt. Dadurch wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert und eine Religation des Vektors verhindert. Dazu wurde der Restriktionsansatz des Vektors mit 0,5 U alkalischer Phosphatase versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl DNA-Probenpuffer (6x) (siehe Tabelle 19) zugegeben, um die Reaktion abzustoppen und die Probe für die folgende Agarose-Gelelektrophorese vorzubereiten (siehe III.2.1.4).

III.2.1.4. Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können in Abhängigkeit von ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Auf der einen Seite kann diese Eigenschaft analytisch genutzt werden, um zu kontrollieren, ob die auf den LB_{Amp}-Platten gewachsenen *E. coli*-Zellen ein Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment aufgenommen haben. Dazu wurden ein Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt (siehe III.2.1.2) und die Proben nach der Agarose-Gelelektrophorese auf ein gewünschtes DNA-Fragment getestet. Auf der anderen Seite kann die Agarose-Gelelektrophorese präparativ genutzt werden, etwa zur Isolierung bestimmter DNA-Fragmente wie PCR-Amplifikate. Analog zu anderen Elektrophoresemethoden wird auch hier der Analyt anhand seiner Nettoladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierbei macht man sich die Eigenschaft zu nutze, dass die DNA bei neutralem pH eine durch das Phosphatrückgrat bedingte negative Nettoladung besitzt. Diese Ladung dirigiert die DNA durch das poröse Agarosegel zur Anode. Große DNA-Fragmente durchlaufen dabei das Gel langsamer als kleine, weil ihnen die Poren des siebartigen Agarosegels einen höheren Widerstand bieten. Daher muss die Konzentration des Gels in Abhängigkeit der zu untersuchenden DNA gewählt werden. Im Falle dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele verwendet.

Zur Herstellung der Gele wurden 1,2 g Agarose in 120 ml TAE-Puffer (siehe Tabelle 19) unter Erhitzen gelöst und nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Lösung wurde dann in eine horizontale Flachbettkammer mit entsprechendem Kamm gegossen. Nach der Polymerisation wurden der Kamm entfernt, das

Agarosegel zusammen mit der Flachbettkammer in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die zu analysierende Probe wurde mit DNA-Probenpuffer (6x) (siehe Tabelle 19) versetzt und in die durch den Kamm entstandenen Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 200 mA für 1 h bis 2 h. Zur späteren Bestimmung der Fragmentgröße wurde ebenfalls ein entsprechender DNA-Marker mit aufgetragen. Da das Ethidiumbromid in die Helixstruktur von Nukleinsäuren interkaliert, können diese bei Anregung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht mittels Image Master[®] VDS.

Tabelle 19: Zusammensetzung der für die Agarose-Gelelektrophorese benötigten Puffer
(Tris= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)

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

III.2.1.5. Ligation

Die kovalente Verknüpfung der amplifizierten DNA-Fragmente mit den Zielvektoren erfolgte durch deren Inkubation mit T4-DNA-Ligase. Sie bildet dabei eine Esterbindung zwischen endständigen 5'-Phosphat-Gruppen mit freien 3'-OH-Gruppen. Sofern die zu verknüpfenden DNA-Enden komplementäre DNA-Sequenzen besitzen, z.B. durch einen vorher durchgeführten Restriktionsverdau (siehe III.2.1.2), wird die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen und gleichzeitig gerichteten Ligation erhöht werden. Neben der eigentlichen Ligation von PCR-Amplifikat (Insert) und Vektor wurde auch ein Kontrollansatz mitgeführt, bei dem das Amplifikat durch Wasser ersetzt wurde. Dieser Ansatz diente der Feststellung der Häufigkeit einer Religation des Vektors. Die Ligation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur und war wie in Tabelle 20 aufgeführt zusammengesetzt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Ligationsansatzes und des benötigten Puffers
(ATP= Adenosintri-phosphat; BSA= bovines Serumalbumin; DTT= Dithiothreitol)

	Ligationsansatz	Kontrollansatz	10x Ligationspuffer	
Vektor	0,5 µl	0,5 µl	Tris, pH7,5	550 mM
Amplifikat	2 µl	0 µl	Magnesiumchlorid	50 mM
T4-DNA-Ligase	0,5 U	0,5 U	DTT	100 mM
10x Ligationspuffer	1 µl	1 µl	ATP	10 mM
Aqua _{dest}	ad 10 µl	ad 10 µl	BSA	1 mg/ml

III.2.1.6. Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte unter Schütteln bei 37 °C in 100 ml LB-Medium. Als Kulturgefäß dienten 500 ml-Schüttelkolben, um einen ausreichenden Gasaustausch zu ermöglichen. Dem Medium wurde das entsprechende Antibiotikum beigefügt (siehe III.1.6). Zur Anzucht auf LB_{Amp}-Platten wurden die Bakterienstämme ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

III.2.1.7. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA musste das gewünschte Plasmid in chemokompetente Bakterien transformiert (siehe III.2.1.8) und später die amplifizierten Plasmide isoliert werden (siehe III.2.1.9). Die dazu benötigte Transformationskompetenz der *E. coli*-Zellen wurde durch die Calciumchlorid-Methode erreicht.

Zuerst wurde der gewünschte Bakterienstamm, DH5 α oder JM101, auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml LB-Medium mit einem der gewachsenen Bakterienkolonien angeimpft und unter Schütteln erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden am nächsten Tag 200 ml LB-Medium mit dieser Kultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von 0,6 wurden die Bakterien für 5 min auf Eis gekühlt. Die folgenden Schritte erfolgten ausschließlich unter der Verwendung gekühlter Gefäße (-20 °C), gekühlter Puffer und Rotoren (4 °C), um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erhalten. Die Bakterien wurden nun für 10 min bei 600 rpm und 4 °C zentrifugiert (Rotor JA-10), um sie anschließend in 80 ml P1-Puffer aufzunehmen (siehe Tabelle 21). Die Bakterien wurden 5 min auf Eis gekühlt, erneut wie vorher beschrieben pelletiert und in 8 ml P2-Puffer suspendiert (siehe Tabelle 21). Die Zellen wurden anschließend in Aliquots von 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 21: Zusammensetzung der in der Herstellung der chemokompetenten *E. coli*-Zellen benötigten Puffer

P1-Puffer		P2-Puffer	
Rubidiumchlorid	100 mM	Kalziumchlorid	75 mM
Manganchlorid	50 mM	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	10 mM
Kaliumacetat	30 mM	Glycerin	15 % (v/v)
Kalziumchlorid	10 mM		
Glycerin	15 % (v/v)		
pH 5,8 mit Essigsäure		pH 6,5 mit KOH	

III.2.1.8. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemokompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 µl des Ligationsansatzes versetzt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 90 s bei 42 °C, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis für 2 min. Danach wurden 1 ml LB-Medium hinzugegeben (siehe Tabelle 4) und die Kultur 45 min bei 37 °C unter Rollen inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13200 rpm in der Tischzentrifuge wurden die *E. coli*-Zellen pelletiert, anschließend in 50 µl LB-Medium suspendiert und letztendlich die Suspension auf einer LB-Platte inklusive des entsprechenden Antibiotikums ausplattiert (siehe Tabelle 12 bis Tabelle 14). Die Platte wurde danach über Nacht bei 37 °C inkubiert.

III.2.1.9. Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Um einzelne Bakterienkolonien nach einer Klonierung mittels Restriktionsverdau (siehe III.2.1.2) auf eine gerichtete Integration des Inserts in den Vektor zu untersuchen (siehe III.2.1.5), wurden kleinere Mengen an Plasmid-DNA mittels einem modifizierten Protokoll aus (Birnboim und Doly, 1979) isoliert.

Hierzu wurden 2 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur und 13200 rpm für 15 s pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Lysepuffer (siehe Tabelle 22) suspendiert und anschließend mit 150 µl Neutralisationspuffer (siehe Tabelle 22) versetzt. Nach der Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde der Ansatz für 30 s gemischt, wodurch die DNA extrahiert wurde. Während der folgenden Zentrifugation für 2 min bei 13200 rpm in der Tischzentrifuge erfolgte eine Phasentrennung. Zellmembranreste, chromosomale DNA und RNA verblieben in der unteren organischen Phase und denaturierte Proteine sammelten sich in der Interphase. Von der oberen wässrigen Phase, welche die Plasmid-DNA enthielt, wurden 450 µl in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 96 %igem Ethanol versetzt. Während der folgenden Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde die DNA gefällt und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 30 s bei 13200 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde mit 750 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach einer erneuten Zentrifugation für 30 s bei 13200 rpm wurde der Überstand verworfen. Nach dem Trocknen des Nukleinsäurepellets in einer Speed-Vac wurde das Pellet in 95 µl TE-Puffer aufgenommen, 5 µl RNaseA (siehe Tabelle 22) zugefügt und 3 min bei 55 °C inkubiert. In dieser Zeit konnte sich das DNA-Pellet lösen, bevor die RNA verdaut wurde. Dies geschah durch eine Inkubation für 30 min bei 37 °C.

Tabelle 22: Zusammensetzung der in der Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA benötigten Puffer (SDS= Natriumdodecylsulfat)

Lysepuffer		Neutralisationspuffer		TE-Puffer		RNase A	
NaOH	0,2 M	Natriumacetat, pH 5,2	3 M	Tris, pH 8	10 mM	RNase A	10 mg/ml
SDS	1 %			EDTA	1 mM	Tris, pH 7,5	10 mM
						Natriumchlorid	15 mM
				autoklavieren		15 min auf 100 °C erhitzen	

III.2.1.10. Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mittels des JET Star-Kits der Firma Genomed isoliert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Anionenaustausches mithilfe einer positiv geladenen Säule, an die die unter neutralen Bedingungen negativ geladenen Nukleinsäuren nach der Lyse der Bakterien binden. Die RNA kann anschließend von der Säule gewaschen und die DNA schließlich mit großer Reinheit durch Puffer hoher Ionenstärke von der Säule eluiert werden.

Hierzu wurden 100 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Die Vorgehensweise der DNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt (siehe III.2.3.2) und schließlich auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

III.2.1.11. Quantifizierung und Reinheit von isolierter DNA

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mithilfe des NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma Peqlab bestimmt. Dabei vermisst das Spektralphotometer die optische Dichte bei 260 nm. Als Referenzwert dient die Absorption von Wasser. Die Extinktion von 1,0 bei OD₂₆₀ entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl (Sambrook *et al.*, 1989). Über die Reinheit der Probe lässt sich eine Aussage treffen, indem man auch die Absorption bei 280 nm misst und den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt. Eine nicht verunreinigte DNA-Lösung hat einen Quotienten von ca. 1,8. Bei einem Wert kleiner als 1,8 ist die Probe mit Proteinen verunreinigt, bei einem Wert größer als 1,8 ist die Probe mit RNA verunreinigt.

Nach Bestimmung des Leerwertes wurde 1 µl der DNA-Probe vermessen und automatisiert die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad durch das Spektralphotometer angegeben.

III.2.2. Hefespezifische Methoden

III.2.2.1. Kultivierung von *S. cerevisiae*-Zellen

Die Anzucht der *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte unter Schütteln bei einer Temperatur von 24 °C oder 37 °C in 5 ml YPD-Medium bzw. SD_{Ura}-Medium (siehe III.1.7). Als Kulturgefäß dienten 25 ml-Schüttelkolben, um einen ausreichenden Gasaustausch zu ermöglichen. Das SD_{Ura}-Medium war mit dem jeweiligen Zucker, Glukose oder Galaktose, versetzt. (siehe III.1.6). Zur Anzucht auf YPD- bzw. SD_{Ura}-Platten wurden die Hefestämme ausgestrichen und über Nacht bei 24 °C bzw. 37 °C inkubiert. Auch hier unterschieden sich die SD_{Ura}-Platten wieder in ihrem beigefügten Zucker.

III.2.2.2. Herstellung transformationskompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Um die Komplementationsstudien mit temperatursensitiven Hefe-Zellen (SEC62ts) durchführen zu können, mussten chemokompetente Hefezellen erstellt und mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert werden. Die dazu benötigte Transformationskompetenz der *S. cerevisiae*-Zellen wurde durch die Lithiumacetat-Methode erreicht (Ito *et al.*, 1983a).

Zuerst wurde der gewünschte Hefestamm auf einer YPD-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 24 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml YPD-Medium mit einem der gewachsenen Hefekolonien angeimpft und unter Schütteln erneut über Nacht bei 24 °C inkubiert. Daraufhin wurde am nächsten Tag YPD-Medium mit dieser Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft und unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die *S. cerevisiae*-Zellen für 5 min bei 3500 rpm und 4 °C in einer Tischzentrifuge pelletiert, um sie anschließend in 50 % des Ausgangsvolumens an Lithiumacetat-Puffer aufzunehmen (siehe Tabelle 23). Die Hefezellen wurden erneut wie vorher beschrieben pelletiert und in 1 % des Ausgangsvolumens an Lithiumacetat-Puffer suspendiert (siehe Tabelle 23). Die Zellen wurden anschließend bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert.

Tabelle 23: Zusammensetzung des für die Herstellung chemokompetenter *S. cerevisiae*-Zellen benötigten Lithiumacetat-Puffers
(TE= Tris-EDTA)

Lithiumacetat-Puffer	
Lithiumacetat	100 mM
TE, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
Sterilfiltrieren	

III.2.2.3. Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

ProTransformationsansatz wurden 10,5 µg DNA aus Lachssperma für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 1 min auf Eis gekühlt. Zu jeweils 50 µl chemokompetenter *S. cerevisiae*-Zellen wurden das Lachssperma-DNA, 1 µg Plasmid-DNA und 350 µl PEG-Puffer (Polythylenglykol-Puffer; siehe Tabelle 24) zugefügt und für 30 min bei 24 °C unter Rollen inkubiert. Dann wurden die Zellen mit je 35 µl DMSO versetzt, gemischt und einem 5minütigen Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Durch einen Zentrifugationsschritt für 3 min bei 2900 rpm in der Tischzentrifuge wurden die Hefezellen pelletiert, anschließend in 500 µl TE-Puffer (siehe Tabelle 24) suspendiert, nochmals pelletiert und in je 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Letztendlich wurden die Suspensionen auf SD_{Ura}-Platten, welche Glukose enthielten, ausplattiert. Die Platten wurden danach über Nacht bei 24 °C inkubiert.

Tabelle 24: Zusammensetzung der für die Transformation der chemokompetenten *S. cerevisiae*-Zellen benötigten Puffer

TE-Puffer		PEG-Puffer	
Tris, pH 7,5	10 mM	Lithiumacetat	100 mM
EDTA	1 mM	Tris, pH 7,5	10 mM
		EDTA	1 mM
		PEG	40 %
pH 7,5 sterilfiltrieren		pH 7,5 sterilfiltrieren	

III.2.3. Methoden der Genexpressionsanalyse via quantitativer *real-time* PCR

Durch Adaption der PCR lässt sich eine Aussage über das Verhältnis einer spezifischen RNA zwischen unterschiedlichen Zellproben treffen. Dafür muss die Gesamt-RNA der Zellen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und letztendlich die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) durchgeführt werden. In den nächsten Abschnitten werden die einzelnen Schritte erklärt (siehe III.2.3.1 bis III.2.3.4).

III.2.3.1. Isolation von RNA aus humanen Zellen

Die Gesamt-RNA der humanen Zellen wurden mittels des RNeasy Micro-Kits der Firma Qiagen isoliert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass unter hohen Salzbedingungen DNA und RNA an Silica-Membranen binden. Die DNA kann anschließend durch DNase-Behandlung noch während sie an die Membran gebunden ist verdaut werden und die RNA schließlich mit großer Reinheit durch Wasser von der Säule eluiert werden.

Hierzu wurden die Zellen dem Versuch entsprechend vorbehandelt (siehe III.1.3), geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Die restliche Vorgehensweise der RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

III.2.3.2. Quantifizierung und Reinheit von isolierter RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mithilfe des NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma Peqlab bestimmt. Dabei bestimmt das Spektralphotometer die optische Dichte bei 260 nm. Als Referenzwert dient die Absorption von Wasser. Die Extinktion von 1,0 bei OD₂₆₀ entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 33 ng/µl (Sambrook *et al.*, 1989). Über die Reinheit der Probe lässt sich eine Aussage treffen, indem man auch die Absorption bei 230 nm und 280 nm misst und die Quotienten OD₂₆₀/OD₂₃₀ und OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt. Eine nicht mit Proteinen verunreinigte RNA-Lösung hat einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotienten von ca. 2. Eine nicht mit Polysacchariden verunreinigte RNA-Lösung hat einen OD₂₆₀/OD₂₃₀-Quotienten von ca. 0,45. Nach Bestimmung des Leerwertes wurde 1 µl der RNA-Probe vermessen und automatisiert die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad durch das Spektralphotometer angegeben.

III.2.3.3. Reverse Transkription

In der reversen Transkription (RT) macht man sich zunutze, dass man durch Oligo(dT)-Nukleotide, welche an den Poly-A⁺-Schwanz von mRNA binden, und reverse Transkriptase RNA zu DNA umschreiben kann. Ziel der RT ist es, die isolierte RNA in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) umzuschreiben, welche anschließend in der qRT-PCR eingesetzt werden kann. Da die RT nicht immer gleich effizient ist, wurde die RT nicht gekoppelt mit der qRT-PCR durchgeführt. So konnte vor der qRT-PCR die cDNA-Probe von überschüssigen Substraten und Substanzen der RT gereinigt, die Konzentration der cDNA bestimmt und gleiche Mengen an cDNA in der quantitativen PCR eingesetzt werden, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern.

Die RT wurde mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Nukleotide und der SuperScript® II Reverse Transcriptase von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die überschüssige Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Nukleotide und die Transkriptase nach der RT zu entfernen, wurde dann die cDNA mittels des QIAquick PCR Purification-Kits von Qiagen laut Angaben des Herstellers gereinigt. Die cDNA-Probe wurde anschließend im UV/Vis-Spektralphotometer vermessen, auf eine cDNA-Konzentration von 30 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

III.2.3.4. Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion

Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf einer sukzessiven Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR. Von der ursprünglichen Idee aus, die Amplifikation der DNA durch die Interkalierung von Ethidiumbromid und eine in das PCR-Gerät eingebaute UV-Lampe und CCD-Kamera zu verfolgen (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993), entwickelte sich eine Methode, bei der der Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Effekt (Stryer, 1978) genutzt wird, um den Abbau von fluoreszenzmarkierten Sonden zu messen (Cardullo *et al.*, 1988). Die Funktionsweise dieser Sonden kann unterschiedlich sein. Da in dieser Arbeit nur die TaqMan-Methode verwendet wurde (Livak *et al.*, 1995), soll nur diese hier genauer erklärt werden. Das Prinzip ist wie folgt: Zu der cDNA werden während der qRT-PCR neben herkömmlichen DNA-Oligonukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Sonden gegeben. Diese besitzen am 5'-Ende ein Reporter-Fluorochrom und am 3'-Ende ein *Quencher*-Fluorochrom, welche unterschiedliche Anregungsenergien besitzen, wobei das vom Reporter-Fluorochrom emittierte Licht bei räumlicher Nähe das *Quencher*-Fluorochrom anregen kann. Wenn die Taq-Polymerase die Sonde erreicht, baut sie diese ab und *Quencher* und Reporter werden räumlich voneinander getrennt. Ab diesem Moment kann das vom Reporter-Fluorochrom emittierte Licht nicht mehr das *Quencher*-Fluorochrom anregen. Durch die Art des Designs der Sonde wird ein höheres Fluoreszenzsignal durch das Reporter-Fluorochrom erreicht, je mehr Sonden binden konnten und abgebaut wurden, was Rückschlüsse auf die Menge der cDNA und letztendlich auf die mRNA der ursprünglichen Proben zulässt. Dies wird anhand des sogenannten C_T -Wertes (*cycle threshold*) erreicht. Er beschreibt die exponentielle Phase der Messung, in der die Fluoreszenz des Reporters das Hintergrundsignal überschreitet. Für den Vergleich zweier unterschiedlich behandelte Proben wurden sogenannte $\Delta\Delta C_T$ -Werte gebildet. Dafür wurden für jede Probe je eine Messung für das Zielgen und ein Referenzgen durchgeführt und deren Quotient auf den der jeweiligen Vergleichsprobe normalisiert. In dieser Arbeit handelte es sich bei der Testprobe um Zellen, die mittels siRNAs für ein bestimmtes Protein depletiert worden waren. Die Vergleichsprobe waren mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen. Als Referenzgen diente das *TATA-box binding protein* (TBP).

Tabelle 25: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Expressions-Assays (bp= Basenpaare)

Name des Gens	Amplikonlänge	Assay-Nummer
DNAJB11	97 bp	Hs01566896_m1
SEC62	97 bp	Hs00451815_s1
TBP	91 bp	Hs00427620_m1

Die TaqMan® Gene Expression Assays, der TaqMan® Gene Expression Master Mix und das StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems wurden über Applied Biosystems bezogen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben in einer 96-Well-Platte.

III.2.4. Methoden der Proteinbiochemie

III.2.4.1. Zellaufschluss zur Westernblot-Analyse

Nach ihrer Ernte und Zählung mussten die Zellen zur Vorbereitung auf die gelelektrophoretische Auftrennung lysiert werden. Dazu wurden sie in Lysepuffer (siehe Tabelle 26) auf eine Konzentration von 20000 Zellen/ μ l eingestellt, suspendiert und anschließend mit dem gleichen Volumen an 2x Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 26) auf eine Endkonzentration von 10000 Zellen/ μ l verdünnt. Die Suspension wurde 10 min bei 56 °C gekocht und nach Zugabe von *Glasbeads* für 10 min geschüttelt, um die DNA zu fragmentieren. Die Proben konnten so bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 26: Zusammensetzung der für die Präparation von Zelllysaten benötigten Puffer

Lysepuffer		Laemmli-Puffer	
Natriumchlorid	10 mM	Tris; pH 6,8	1 M
Tris; pH 8,0	10 mM	Glycerin	87 %
Magnesiumchlorid	3 mM	SDS	10 %
Nonidet P40	0,5 %	β -Mercaptoethanol	10 %
		Bromphenolblau	0,002 %

III.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen eines komplexen Gemischs wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli, 1970). Durch die Inkubation der Proteine in Laemmli-Puffer, der SDS und β -Mercaptoethanol enthält, und dem anschließendem Erhitzen, denaturieren die Proteine und das negativ geladene SDS kann binden. Durch das konstante Verhältnis von 1,4g SDS/g Protein ergibt sich eine gleichmäßige negative Nettoladung der Polypeptide in Abhängigkeit zu ihrem Molekulargewicht (Weber und Osborn, 1969). In einem elektrischen Gleichspannungsfeld wandern die Proteine folglich durch ein Gel zur Anode und werden abhängig von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je größer die Strecke, die ein Protein in einem bestimmten Zeitintervall im Gel zurücklegt, desto kleiner ist demnach sein Molekulargewicht (Andrews, 1986). Charakteristisch für die diskontinuierliche SDS-PAGE ist der Aufbau des Gels aus einem niedrigprozentigen Sammelgel zur Fokussierung und einem höherprozentigen Trenngel zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Das Molekulargewicht des Polypeptids bestimmt auch die Prozentigkeit des Trenngels (10 %, 12,5 % oder 17,5%): Je größer das Protein, desto höherprozentiger sollte der Acrylamidanteil im Trenngel sein. Bei

Proteinen mit weniger als 15 kDa wird jedoch die Methode der Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese präferiert (siehe III.2.4.3).

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 27: Zusammensetzung der unterschiedlichen Gele und des Sammelgels

Acrylamid-Konzentration Lösung		Trenngel			Sammelgel
		10 %	12,5 %	17,5 %	5 %
40 % (w/v) Acrylamid	[ml]	3,75	4,69	6,56	0,6
2 % (w/v) Bisacrylamid	[ml]	1,0	1,25	1,76	0,15
Aqua _{dest}	[ml]	4,05	2,86	1,39	3,35
1 M Tris; pH 6,8	[ml]		-		0,6
1,875 M Tris; pH 8,8	[ml]		6		-
10 % (w/v) SDS	[µl]		150		48
TEMED	[µl]		5		7
20 % (w/v) APS	[µl]		45		45
Gesamtvolumen	[ml]		15		4,8

Um das Trenngel zwischen die Gelplatten gießen zu können, mussten die zusammengesetzten Platten mit einem Bodengel aus 2 % (w/v) Agarose abgedichtet werden. Nach dem Aushärten von Trenn- und Sammelgel wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet (siehe Tabelle 28). Die Proteinproben wurden wie in III.2.4.1 beschrieben mit Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 26) vorbereitet und in die Taschen des 14 cm x 11 cm x 0,1 cm großen Vertikalgels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 2 h 30 min bei 45 mA oder über Nacht bei 6 mA.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Laufpuffers

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

III.2.4.3. Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 15 kDa wurden mit 19,4%igen SDS-Gelen aufgetrennt. Um eine gewisse Stabilität der Gele trotz hoher Acrylamidkonzentration zu gewährleisten, wurde Harnstoff in einer Endkonzentration von 6 M beigefügt, der durch seine hohe Hygroskopizität die Beständigkeit des Gels verbessert (Ito *et al.*, 1980; Ito *et al.*, 1983b).

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 29: Zusammensetzung des Harnstoff-Gels

Lösung	Acrylamid-Konzentration	Trenngel	Sammelgel
			5 %
60 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid	[ml]	5,88	1,8
Aqua _{dest}	[ml]	-	2,6
1 M Tris; pH 6,8	[ml]	-	0,63
1,875 M Tris; pH 8,8	[ml]	6,5	-
10 % (w/v) SDS	[µl]	160	50
TEMED	[µl]	6	5
20 % (w/v) APS	[µl]	55	25
Gesamtvolumen	[ml]	11,97	3,73

Um das Trenngel zwischen die Gelplatten gießen zu können, mussten die zusammengesetzten Platten mit einem Bodengel aus 2 % (w/v) Agarose abgedichtet werden. Nach dem Aushärten von Trenn- und Sammelgel (am besten über Nacht in einer Feuchtkammer) wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Harnstoff-Laufpuffer überschichtet (siehe Tabelle 30). Die Proteinproben wurden wie in III.2.4.1 beschrieben mit Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 26) vorbereitet und in die Taschen des 14 cm x 11 cm x 0,1 cm großen Vertikalgels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 6 h bis 8 h bei 20 mA oder über Nacht bei 6 mA.

Tabelle 30: Zusammensetzung des Harnstoff-Laufpuffers

Harnstoff-Laufpuffer	
Glycin	192 mM
Tris	50 mM
SDS	0,1 % (w/v)

III.2.4.4. Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Westernblot)

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, mussten sie auf eine Trägermembran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) mit einer Porengröße von 0,45 µM transferiert werden. Das SDS-Gel wird dazu auf eine PVDF-Membran gelegt und beides in ein zum Gel senkrechtes elektrisches Feld überführt. So bewegen sich die durch SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran und bleiben durch hydrophobe Wechselwirkungen haften.

Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Schwenken in 100 %igem Methanol benetzt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde sie zusammen mit zwei identisch

großen Whatman-Papieren und zwei Schwämmen in Blot-Puffer äquilibriert (siehe Tabelle 31). Die Anordnung der einzelnen Komponenten des Blots in der Flipp-Kassette war wie folgt: Schwamm, Whatman-Papier, Membran, Gel, Whatman-Papier, Schwamm. Anschließend wurde die Flipp-Kassette so in die Blot-Apparatur gestellt, dass sich das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode orientierten. Zuletzt wurde die Blot-Kammer mit Blot-Puffer gefüllt und der Transfer gestartet. Er erfolgte bei 15 °C für 3 h oder über Nacht bei einer Stromstärke von 400 mA.

Tabelle 31: Zusammensetzung des für den Westernblot benötigten Blot-Puffers

Blot-Puffer	
Tris	12,5 mM
Glycin	96 mM

III.2.4.5. Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Um mögliche Effekte einer Zellmanipulation zu analysieren, wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper auf der PVDF-Membran nachgewiesen. Das grundlegende Prinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft von Antikörpern spezifisch und hochaffin mittels ihres Paratops an Epitope zu binden. Zur Visualisierung dieser Antikörperbindung und damit auch des Proteins von Interesse, wird ein zweiter, sekundärer Antikörper eingesetzt, dessen Paratop an den F_C-Teil des ersten, primären Antikörpers bindet. Der sekundäre Antikörper ist kovalent mit einer Peroxidase oder einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, was die Visualisierung des Proteins auf der PVDF-Membran ermöglicht.

Nach dem Westerblot (siehe III.2.4.4) wurde die Membran zunächst für 15 min in einer Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen und unkoordinierte Anlagerungen von Antikörpern an die hydrophobe Membran zu unterbinden. Dann folgte für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht die Inkubation der Membran mit primärem Antikörper. Dazu wurde dieser in Blockierlösung (siehe Tabelle 32) laut den Angaben aus Tabelle 1 verdünnt. Die Membran wurde anschließend drei Mal für 5 min in PBS (siehe Tabelle 32) gewaschen, für 1 h in sekundärem Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 2), der ebenfalls in Blockierlösung gelöst war und letztendlich wieder 3 Mal für 5 min in PBS gewaschen.

Wurde ein Fluoreszenz-gekoppelter sekundärer Antikörper eingesetzt, wurde die Membran vollständig getrocknet und die Fluoreszenz mittels des Typhoon TrioTM Scanners der Firma GE Healthcare detektiert. Wurde ein Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet, wurde die Membran direkt nach dem letzten Waschschrift für 1 min in einem 1:1-Gemisch der ECL-Lösungen (*enhanced chemiluminescence*) des SuperSignal West Pico ChemiluminescentSubstrate-Systems inkubiert. Die

Peroxidase oxidiert das Luminol, wobei Lumineszenz auftritt, welche mittels des Lumi Imager F1 der Firma Roche detektiert wurde.

Tabelle 32: Zusammensetzung der für die Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen benötigten Puffer

PBS		Blockierlösung	
Na ₂ HPO ₄	10 mM	Magermilchpulver	5 %
NaH ₂ PO ₄	2,3 mM	in PBS	
NaCl	155 mM		
sterilfiltrieren		in PBS	

III.2.4.6. Autoradiographie durch *Phosphorimaging*

Als Autoradiographie bezeichnet man die Visualisierung einer biologischen Komponente durch radioaktive Isotope, ursprünglich durch Schwärzung eines Röntgenfilms. In dieser Arbeit wurden zur Detektion des radioaktiven Zerfalls *Phosphorimaging*-Platten eingesetzt. Die von der Probe emittierte β -Strahlung bringt die Moleküle der Platte in einen angeregten Zustand, den sie erst beim Auslesen der Platte mittels eines *Phosphorimagers* verlassen. Die dabei freigesetzte Energie wird so digitalisiert und kann densitometrisch ausgewertet werden.

Der Einbau des radioaktiven [³⁵S]-Methionins erfolgte während der *in vitro*-Proteinsynthese im Kaninchen-Retikulozytenlysat für die Durchführung der *in vitro*-Transportversuche in semipermeabilisierte Zellen (SPCs). Die SDS-Gele, auf denen die radioaktiv markierten Proteine aufgetrennt worden waren, wurden zur Fixierung der Proteine für 15 min in Entfärberlösung (siehe Tabelle 33) unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine 30minütige Inkubation in Neutralisationslösung (siehe Tabelle 33) und die Trocknung des Gels. Dazu wurde es auf ein nasses Whatman-Papier überführt, mit Folie bedeckt und bei 90 °C für 1 h getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Strahlung erfolgte durch Auflegen der *Phosphorimager*-Platte für einen unterschiedlichen Zeitraum. Er variierte von 2 h bis 14 Tage und war abhängig von der Anzahl der Methionine in der jeweiligen Proteinsequenz. Die Exponierplatten wurden letztendlich durch *Phosphorimaging* mithilfe des Typhoon TrioTM Scanners analysiert.

Tabelle 33: Zusammensetzung der zur Trocknung der Gele benötigten Lösungen

Entfärberlösung		Neutralisationslösung	
Methanol	40 % (v/v)	Methanol	50 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)	Glycerin	1 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)		

III.2.4.7. Densitometrie (quantitative Bestimmung der Signalstärke)

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinsignalen, seien es Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-Signale nach immunologischer Detektion oder radioaktive Zerfallssignale der Autoradiographien, wurde die ImageQuant™ 5.1 Software verwendet. Sie ermöglichte eine computerbasierte Analyse der Graustufe pro Flächeneinheit. Analysiert wurden dazu die durch den Image Scanner III, den Lumi Imager F1 oder den Typhoon Trio™ Scanner digitalisierten Bilder. Es wurden lediglich Singalstärken quantifiziert, die sich in einem linearen Messbereich befanden. Die durch die ImageQuant™ 5.1 Software ausgegebenen Werte der behandelten Zellen wurden mit denen der unbehandelten Zellen verrechnet und gegebenenfalls graphisch mittels Excel (Microsoft) dargestellt.

III.2.5. Methoden der Proteomanalyse via differentieller 2D-Gelelektrophorese

Die Idee, Proteine in zwei Dimensionen aufzutrennen, ist schon in den 50er-Jahren entstanden. So wurden beispielsweise Proteine in zwei hintereinander durchgeführten SDS-Gelelektrophoresen, die sich in den pH-Bedingungen oder Gelkonzentrationen unterschieden, aufgetrennt. Die Kombination einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) und SDS-PAGE wurde daraufhin erstmals 1970 von zwei unabhängigen Gruppen gleichzeitig publiziert (Kaltschmidt und Wittmann, 1970; Kenrick und Margolis, 1970). Sie nutzten diese ursprüngliche Form der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) jedoch nur für die Reinigung einzelner Proteine oder Proteinkomplexe. Wiederum unabhängig voneinander wurde 1975 die 2D-PAGE das erste Mal von Joachim Klose und Patrick O'Farrell zur Auftrennung eines kompletten Proteoms eingesetzt (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Seitdem ist die 2D-PAGE auf Grund ihrer guten Auflösung die populärste Methode um Proteome aufzutrennen. Durch die vielen Schritte, und folglich auch vielen Fehlerquellen, hat die 2D-PAGE eine hohe Gel-Gel-Varianz. Ein großes Problem besteht in der Vergleichbarkeit zweier unabhängig voneinander gelaufenen 2D-Gele. Dies erschwert es, Unterschiede zweier Proteome, z.B. einer manipulierten Zellpopulation und einer Kontrollpopulation, zu ermitteln (Molloy *et al.*, 2003). Die Weiterentwicklung zur differentiellen 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) löste dieses Problem (Unlü *et al.*, 1997). Da die Lysine der miteinander zu vergleichenden Proteome mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, können beide Proben in der gleichen 2D-PAGE aufgetrennt werden. Somit befinden sich gleiche Proteine auf der gleichen Position im SDS-Gel und über die Intensität der Fluoreszenzsignale lässt sich eine Aussage über die Menge dieses Proteins in beiden Proben sagen. Dadurch können Rückschlüsse über eine Änderung des Proteingehalts nach einer Zellmanipulation gezogen werden. Letztendlich ermöglicht die parallele Durchführung von mehreren 2D-PAGES und das Mitführen eines internen Standards auf allen Gelen eine quantitative und statistische Auswertung der Proben. Wenn man nun die nach einer Zellmanipulation statistisch

regulierten Proteine massenspektrometrisch identifiziert, kann eine genaue Aussage über die Auswirkung der Zellmanipulation auf bestimmte Proteine getroffen werden.

In dieser Arbeit wurden durch SEC62-UTR-siRNA manipulierte Zellen mit den entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Dazu wurden nach der RNAi zu gegebener Zeit die Zellen geerntet, die Proteine isoliert und quantifiziert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Cy3- bzw. Cy5-Farbstoff). Als interner Standard wurde ein gleichmäßiges Gemisch aller Proben mit Cy2-Farbstoff markiert. Es folgten die IEF (1. Dimension) und SDS-PAGE (2. Dimension) und die Darstellung der Proteine durch den Typhoon Trio™ Scanner. Da sechs solcher Gele parallel durchgeführt wurden und eines davon als präparatives Gel eingeplant worden war, konnten nach quantitativer Analyse der Fluoreszenzsignale und statistischer Auswertung durch die Software DeCyder™ 2D 6.5 (GE Healthcare) die relevanten Proteine ermittelt werden. Mittels des Ettan Spot Pickers (GE Healthcare) konnten diese schließlich aus dem Gel herausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse an Dr. René P. Zahedi (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften; Dortmund) geschickt werden.

III.2.5.1. Proteinextraktion

Nach entsprechender Zellmanipulation wurden die Zellen zu gegebener Zeit durch Trypsinbehandlung geerntet, in frischem Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 3 min bei Raumtemperatur und 2000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und in PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen wieder in PBS suspendiert und nochmals zentrifugiert. Nun wurde das Pellet in 100 µl DIGE-Puffer/1x10⁶ Zellen aufgenommen (siehe Tabelle 34) und mit *Glasbeads* versetzt. Zur Lyse der Zellen wurden sie nun für 30 min bei 4 °C geschüttelt. Die Probe wurde für 30 s bei 13200 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde laut Herstellerangaben mittels des 2D Clean up-Kits von GE Healthcare von Salzen, Lipiden u.ä. gereinigt und das gereinigte Protein wieder in dem Ausgangsvolumen an DIGE-Puffer aufgenommen.

Tabelle 34: Zusammensetzung des zur Zellyse und Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen benötigten Puffers
(CHAPS= 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat)

DIGE-Puffer	
Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	65 mM
TRIS	24 mM
pH 8,75 mit HCl	

Anschließend wurde der pH der Proben auf 8,5 eingestellt, da dies der optimale pH-Wert für die spätere Fluoreszenzmarkierung ist.

III.2.5.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Gel-Streifen der 1. Dimension nicht mit Proteinen zu überladen bzw. um gleiche Mengen an Protein mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren zu können, mussten die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt werden. Dies erfolgte nach Herstellerangaben mittels des 2D Quant-Kits von GE Healthcare und der Bestimmung der Absorption bei 480 nm im Photometer UltroSpec 3000.

III.2.5.3. Fluoreszenzmarkierung isolierter Proteine

In dieser Arbeit wurde die minimal Markierung der Proteine durchgeführt. Dies bedeutet, dass nicht alle Lysine der Proteine, sondern nur ca. 3 % der Lysine über ihre primären Aminogruppen eine Verbindung mit den Cyaninfarbstoffen eingehen. Dabei werden die Molekulargewichte der Proteine nur unwesentlich verändert und die Nettoladungen bleiben sogar komplett unbeeinflusst. Auf jedes Gel wurden je 16,7 µg Protein beider zu vergleichenden Proben und 16,7 µg interner Standard aufgetragen werden. Da sechs Gele mit biologischen Replikaten gleichzeitig durchgeführt wurden, bedeutete dies, dass der Standard aus den Proteomen der insgesamt sechs Kontrollzellpopulationen und sechs manipulierten Zellpopulationen zusammengesetzt wurde. Dementsprechend sah das Markierungsschema wie folgt aus:

Tabelle 35: Pipettierschema der Gele und Markierungsschema der einzelnen Proben

Gelnummer	Kontroll-siRNA			SEC62-UTR-siRNA			Standard	
	Probennummer	Proteinmenge	Farbstoff	Probennummer	Proteinmenge	Farbstoff	Proteinmenge	Farbstoff
Gel #1	#1			#2				
Gel #2	#2	16,7 µg	Cy3	#4	16,7 µg	Cy5		
Gel #3	#3			#6			pro Probe	
Gel #4	#4			#1			1,4 µg	Cy2
Gel #5 (präparativ)	#5	16,7 µg	Cy5	#5	16,7 µg	Cy3	=	
Gel #6	#6			#3			16,7 µg	

Die Proteine wurden im Verhältnis von 50 µg Protein/1 nmol Farbstoff markiert. Dies bedeutet, dass 16,7 µg Protein mit 0,33 nmol Cy-3 oder Cy5-Farbstoff versetzt wurden. Im Falle des Standards wurden 8,35 µg jeder Probe miteinander vereint, dies ergibt 100,2 µg Gesamtprotein, und mit 2,0 nmol Cy2-Farbstoff versetzt. Von diesem Gemisch wurden später auf jedes Gel 16,7 µg Protein aufgetragen, was 1,4 µg Protein einer jeden Probe bedeutet. Die Markierung erfolgte im Dunkeln für 30 min bei 4 °C und wurde durch Zugabe von 0,5 µl 10 mM-Lysin gestoppt.

III.2.5.4. 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Während der IEF werden die Proteine abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt (pI) innerhalb eines Gelstreifens aufgetrennt. Dies beruht auf der Tatsache, dass der Gelstreifen einen immobilisierten pH-Gradienten besitzt und eine Spannung an ihn angelegt wird. Die auf den Streifen aufgetragenen Proben wandern nun im Gel solange abhängig von ihrer Nettoladung zur Anode bzw. Kathode, bis ihre Nettoladung Null ist. An dieser Stelle werden die Proteine folglich fokussiert.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich IEF-Streifen mit einem nichtlinearen pH-Gradienten von 3 bis 11 der Firma GE Healthcare verwendet. Einen Tag vor der IEF wurden die Streifen in 450 µl DeStreak-Rehydrierungslösung inklusive 0,5 % IPG-Puffer rehydriert. Am nächsten Tag wurden für jedes Gel die jeweiligen markierten Proteinproben vereint und mit einem gleichen Volumen an 2x DIGE-Proben-Puffer versetzt (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Zusammensetzung des für die IEF benötigten 2x DIGE-Proben-Puffers

2x DIGE-Proben-Puffer	
Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
DTT	130 mM
CHAPS	65 mM
Pharmalyte	20 g/l

Die Streifen wurden in die Keramikwanne des IEF-Geräts (IPGphor 3) überführt. Der Stromkreis wurde geschlossen, indem die Enden der Streifen mit feuchtem Whatman-Papier (*paper bridges*) bedeckt und die Elektroden darauf gesetzt wurden. Die Proben wurden über spezielle Probenkammern (*sample cups*) an der anodischen Seite der Streifen aufgetragen. Anschließend wurden sowohl die Streifen als auch die Proben mit inertem Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen der Streifen bzw. Verdampfen der Probe zu verhindern. Anschließend wurde das IEF-Gerät geschlossen und die IEF durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 37: Schema, nachdem die IEF durchgeführt wurde

IEF-Programm	
500 V	1 h
500 V – 1000 V	variabel; nicht weniger als 7 h
1000 V – 8000 V	3 h
8000 V	2 h 30 min

Es war zu beachten, dass pro Streifen nur eine Stromstärke von 25 µA angelegt werden durfte.

III.2.5.5. 2. Dimension: SDS-Gelelektrophorese

In der zweiten Dimension werden die auf dem IEF-Streifen fokussierten Proteine analog zur „normalen“ SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch erhält man letztendlich ein Gel, auf dem die Proteine von links nach rechts nach ihrem pI und von oben nach unten nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Das in dieser Arbeit verwendete System für die zweite Dimension wurde bei GE Healthcare bezogen. Es bestand aus erwerblichen SDS-Gelen (2D Gel DALTsix NF 12.5 %- Kit), den dazugehörigen Puffern und der Elektrophoreseeinheit (Ettan DALTsixElectrophoresis System).

Um sicherzugehen, dass in der zweiten Dimension keine Disulfidbrücken vorlagen, wurden die IEF-Streifen nochmals in DTT haltigem Puffer äquilibriert und die reduzierten Disulfidbrücken alkyliert. Daher wurden die Streifen nach der IEF erst kurz mit Aqua_{dest} gespült und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur in Äquilibrierungspuffer I inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Aqua_{dest} wurde die Streifen für 15 min bei Raumtemperatur in Äquilibrierungspuffer II inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift in Aqua_{dest} wurde der Streifen zur Vorbereitung für die zweite Dimension für 5 min bei Raumtemperatur in Kathodenpuffer äquilibriert. Sowohl der zum Ansetzen der beiden Äquilibrierungspuffer benötigte Puffer als auch der Kathoden- und der Anodenpuffer wurden mit den erwerblichen SDS-Gelen mitgeliefert.

Tabelle 38: Zusammensetzung der für die Äquilibrierung der IEF-Streifen benötigten Puffer

Äquilibrierungspuffer I		Äquilibrierungspuffer II	
Harnstoff	10,8 g	Harnstoff	10,8 g
DTT	300 mg	Iodacetamid	750 mg
ad 36 ml mit Äquilibrierungspuffer		ad 36 ml mit Äquilibrierungspuffer	

Die SDS-Gele wurden nach Herstellerangaben in die Gel-Kassetten (Ettan Dalt precast gel holding cassette) eingespannt und in die Elektrophoreseapparatur gestellt. Die mit den SDS-Gelen erhaltene Agarose wurde erwärmt und auf die Gele aufgetragen. Anschließend wurden die IEF-Streifen auf die Gele überführt. Nach Befüllen der Elektrophoreseapparatur mit dem Anoden- bzw. Kathodenpuffer wurde die zweite Dimension durch Anlegen eines elektrischen Feldes durchgeführt. Das Programm dieser SDS-PAGE ist in Tabelle 39 angegeben.

Tabelle 39: Schema, nach dem die 2. Dimension durchgeführt wurde

	Spannung	Stromstärke	Leistung	Dauer
Schritt 1	50 V	10 mA	1 W	1 h
Schritt 2	600 V	30 mA	30 W	5 h

III.2.5.6. Statistische Auswertung der 2D-DIGE und Vorbereitung der Proteine auf die Massenspektrometrie

Um die für weitere Analysen interessanten Proteine nach der 2D-DIGE ermitteln zu können, mussten die Fluoreszenzsignale der 2D-Gele mittels des Typhoon TrioTM Scanners detektiert werden. Es ist zu beachten, dass jedes 2D-Gel in drei Fluoreszenzkanälen gescannt wurde. Demnach entstand für jedes Gel 3 Bilder, für den kompletten Versuch folglich 18 Stück. Mittels der Software DeCyderTM 2D 6.5 wurden die drei Bilder eines jeden Gels übereinander gelegt und die Intensitäten des Cy3- und des Cy5-Signals miteinander verglichen. So konnten Proteine ermittelt werden, die nach der RNAi 1,5-fach verändert in diesem Replikat vorkamen (DIA; differentielle Gelanalyse). Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurden nun mithilfe des internen Standards, der auf jedem Gel gleich war, die Replikate miteinander verglichen. Dieser Prozess wird als *matchen* bezeichnet. So erhält man nicht nur für jedes Gel die Anzahl der gefundenen Proteine, die auf jedem Gel regulierten Proteine, sondern in Einbezug aller sechs Replikate jene Proteine angegeben, die nach dem t-Test mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ 1,5 häufiger oder seltener vorkamen (BVA; biologische Varianzanalyse). Eines der Gele wurde schon vor der IEF als präparatives Gel eingeplant (Gel 5; siehe Tabelle 35). Dies bedeutet, dass zusätzlich zum fluoreszenzmarkierten Protein noch unmarkiertes Protein mit aufgetragen wurde. So ist auf diesem Gel genügend Protein vorhanden (200 µg), um die als interessant erscheinenden Proteine auszuschneiden und massenspektrometrisch bestimmen zu können. Für diese Proteine konnten die Koordinaten durch eine Fluoreszenzmarkierung, die vor dem Einscannen auf dem Gel angebracht wurde, bestimmt werden. Sie wird ebenfalls im Ettan Spot Pickerwiedererkannt, wodurch die vorgemerkten Proteine mittels ihrer Koordinaten vollautomatisiert ausgestanzt werden können. Die ausgestanzten Proteine wurden in einer 96-Well-Platte abgelegt und bis zu ihrem Versand an Dr. René P. Zahedi aus der Arbeitsgruppe Sickmann vom Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften in Dortmund bei -80 °C gelagert.

In Dortmund wurden die Massenspektren der Peptide eines jeden einzelnen Proteins mit einem LTQ-Orbitrap Hybrid-Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher bestimmt. Dr. Zahedi führte auch den Datenbankabgleich der Spektren durch. Die so erhaltene Datei gab für jedes vermessene Protein eine Liste mit allen möglichen Kandidaten, ihre Molekulargewichte, ihre pIs, den emPAI (Ishihama *et al.*, 2005), ihre Sequenzübereinstimmungen mit den gemessenen Spektren und weitere Parameter an. Die letztendliche Zuordnung, welches Protein am wahrscheinlichsten das tatsächlich als reguliert vorgefundene Protein war, wurde selbst durchgeführt. Als Kriterien galten neben dem emPAI der pI und die Masse der Proteine und ihre Lage zueinander auf dem Gel.

III.2.6. Methoden der *in vitro*-Proteintranslokation

III.2.6.1. Präparation semipermeabilisierter Zellen

In dieser Arbeit sollten Transportstudien eines bestimmten Transportsubstrats in siRNA manipulierte Zellen bzw. Kontrollzellen durchgeführt werden. Dies bedeutete, dass die Zellen mittels eines Protokolls von Wilson *et al.* (Wilson *et al.*, 1995) dementsprechend für den Versuch vorbereitet werden mussten: die Plasmamembran musste mithilfe von Digitonin permeabilisiert und die endogene mRNA abgebaut werden. Dabei machte man sich zu Nutze, dass Digitonin eine hohe Affinität für Cholesterol und dieses in der Zelle eine heterogene Verteilung hat. So wird spezifisch die Plasmamembran permeabilisiert, das ER und das Golgi-Apparatsbleiben nahezu unbeeinflusst (Plutner *et al.*, 1992). Da nun die Plasmamembran ihre Integrität verloren hat, kann durch mehrere Waschschrte das Cytosol entfernt werden, sodass nur das Grundgerüst der Zelle mit ihren Organellen übrig bleibt. Letztendlich wird durch eine Inkubation mit Nuklease störende endogene mRNA abgebaut. Wenn man nun Kaninchen-Retikulozytenlysat und eine spezifische mRNA zugibt, kann die Synthese eines bestimmten Substrats und dessen Transporteffizienz in das ER mit oder ohne vorherige Manipulation der Zellen durch siRNAs getestet werden. Dabei wird die Effizienz der Prozessierung des Vorläuferproteins zum murenen Protein oder dessen Glykosylierung bestimmt.

Die Zellen wurden wie in III.2.7.1, III.2.7.5 und III.2.7.4.1 beschrieben kultiviert und mit siRNAs und/oder Expressionsplasmiden manipuliert. Nach ihrer Trypsinisierung wurden sie in frischem Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Ab diesem Punkt erfolgten alle Schritte der Präparation unter gekühlten Bedingungen und mit gekühlten Lösungen, sofern nichts anderes angegeben wird. Die Zellen wurden in der GS-6KR-Zentrifuge von Beckman im Rotor GH-3.8 durch eine Zentrifugation für 3 min bei 2000 rpm sedimentiert und in 6 ml KHM-Puffer (siehe Tabelle 40) aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen wieder in 6 ml KHM-Puffer suspendiert und 1 µl Digitonin (siehe Tabelle 40) pro 1×10^6 Zellen zugegeben. Der Ansatz wurde zur Permeabilisierung 5 min auf Eis inkubiert, anschließend mit KHM-Puffer auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Cytosol enthielt, wurde verworfen und das Pellet (Membranfraktion) in 6 ml HEPES-Puffer (siehe Tabelle 40) suspendiert. Nach einer 10minütigen Inkubation wurden die Zellen nochmals pelletiert, in 200 µl KHM-Puffer aufgenommen, mit 0,5 µl CaCl_2 (siehe Tabelle 40) und 4 U Nuklease S7 versetzt. Der Ca^{2+} -abhängige Nukleaseverdau erfolgte für 12 min bei Raumtemperatur und wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl EGTA-Lösung (siehe Tabelle 40) abgestoppt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 2000 rpm in einer gekühlten Tischzentrifuge, wurden die Zellen mit KHM-Puffer in einem Endvolumen von genau 1 ml aufgenommen und, wie in III.2.7.3 beschrieben, deren Zellzahl in einer 4-fach Bestimmung ermittelt.

III. MATERIAL & METHODEN

Gleichzeitig konnte durch die Bestimmung der Viabilität mittels Trypanblau-Färbung die Effizienz der Permeabilisierung kontrolliert werden. Bei einer korrekten Präparation sollten nahezu alle Zellen blau angefärbt und die ermittelte Viabilität folglich sehr niedrig sein. Letztendlich wurden die Zellen wieder pelletiert und mit KHM-Puffer auf eine Zellkonzentration von genau 40000 Zellen/ μ l eingestellt. Diese Zellen wurden daraufhin als semipermeabilisierte Zellen bezeichnet.

Um die Effizienz der Proteindepletion oder eines Rettungsversuchs mittels Expressionsplasmid zu messen, wurde eine entsprechende Menge SPCs in Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 26) aufgenommen und mittels SDS-PAGE (siehe III.2.4.2) und Western-Blot-Analyse (siehe III.2.4.4) die Proteinmenge dieser Proben bestimmt.

Tabelle 40: Zusammensetzung der für die Präparation semipermeabilisierter Zellen benötigten Lösungen (EGTA= Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)

KHM-Puffer		HEPES-Puffer		Digitonin	
Kaliumacetat	110 mM	Kaliumacetat	50 mM	Digitonin	40 mg/ml
Magnesiumacetat	2 mM	HEPES/KOH	90 mM		
HEPES/KOH	20 mM	pH 7,2 bei 2 °C			
pH 7,2 bei 2 °C					
CaCl₂-Lösung		EGTA-Lösung			
Kalziumchlorid	200 mM	EGTA	200 mM		

III.2.6.2. *In vitro*-Transkription mit SP6/T7-RNA-Polymerase

Es sollten bestimmte Proteine radioaktiv markiert werden, um sie als Transportsubstrate nutzen zu können. Dazu wurde zunächst durch *in vitro*-Transkription des ursprünglichen Plasmids (siehe Tabelle 14) die entsprechende mRNA gewonnen. Im Falle von pB4 (ppL) handelte es sich um ein mittels EcoRI oder PvuII linearisiertes Plasmid, der Vektor pCA1-mut (ppcec) wurde durch einen Restriktionsverdau mit HindIII linearisiert.

Die Komponenten des Transkriptionsansatzes (siehe Tabelle 41) wurden zusammengegeben und für 3 h bei 40 °C inkubiert. Die Transkription wurde durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Bis zu dessen Verwendung wurde das Transkript bei -80 °C gelagert.

Tabelle 41: Zusammensetzung des Transkriptionsansatzes

Transkriptionsansatz	
Prämix A	30 µl
m ⁷ GpppG	2,5 µl
RNasin [40 U/µl]	1,5 µl
SP6 bzw. T7-Polymerase [20 U/µl]	1 µl
Plasmid-DNA	1 µg
ad 50 µl mit Aqua _{dest}	

III.2.6.3. Synthese radioaktiv markierter Polypeptide *in vitro*

Indem man in einem vorher Nuklease behandelten Retikulozytenlysat durch die Zugabe von *in vitro*-transkribierter mRNA gezielt radioaktiv markierte Transportsubstrate synthetisiert (Pelham und Jackson, 1976), kann deren Transport in das ER in Abhängigkeit einer Translokationskomponente betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde zur Synthese der radioaktiv markierten Proteine das *Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated L4960* der Firma Promega eingesetzt. Retikulozyten verlieren im Laufe ihrer Genese ihren Zellkern, besitzen jedoch noch alle zur Translation notwendigen cytosolischen Komponenten wie z.B. Co-Faktoren und Ribosomen. Die im Lysat befindliche endogene mRNA wurde vom Hersteller durch Behandlung mit Nuklease S1 abgebaut, wodurch sich ein ideales System zur gezielten Synthese radioaktiver Transportsubstrate bietet (Pelham und Jackson, 1976). Die Markierung erfolgte durch Zugabe des radioaktiven Isotops [³⁵S]-Methionin und die Synthese erfolgte nach Herstellerangaben (siehe Tabelle 42) (=posttranslationale Bedingungen). Wurde die Synthese in Anwesenheit von SPCs (32 %) durchgeführt, wurde ein Teil des Wassers von ihnen ersetzt und dementsprechend verringert. Diese Art der Synthesbedingungen wird im Folgenden als cotranslationale Translokationsbedingungen bezeichnet. Eine genauere Beschreibung des cotranslationalen bzw. posttranslationalen Transports ist III.2.6.4 bzw. III.2.6.5 zu entnehmen.

Tabelle 42: Zusammensetzung des *in vitro*-Translationsansatzes

<i>in vitro</i> -Translationsansatz	
Retikulozytenlysat	12,5 µl
Aminosäuremix ohne Methionin	0,5 µl
RNasin	0,5 µl
mRNA	1,0 µl (oder 3 µl ppcec-RNA)
[³⁵ S]-Methionin	1,0 µl
ad 25 µl mit Aqua _{dest}	

III.2.6.4. Cotranslationale Translokation von Transportsubstraten in Membranvesikel

Um eine Analyse des Proteintransports in das ER unter cotranslationalen Bedingungen durchführen zu können, wurden dem *in vitro*-Translationsansatz bereits schon zu Synthesebeginn 32 % SPCs beigefügt. Dementsprechend musste die Menge des Wassers im Ansatz angeglichen werden. Die Synthese mit gekoppelter Translokation in das ER erfolgte für 1 h bei 30 °C. Um die Transporteffizienz bestimmen zu können, wurde nach Synthese die Probe mit Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und schließlich per SDS-PAGE (siehe III.2.4.2) aufgetrennt. Die finale Analyse des Transports erfolgte durch Autoradiographie, *Phosphorimaging* (siehe III.2.4.5) und densitometrische Auswertung der radioaktiven Signale (siehe III.2.4.7).

III.2.6.5. Posttranslationale Translokation von Transportsubstraten in Membranvesikel

Für den posttranslationalen Transport wurden die radioaktiv markierten Proteine vollständig in Abwesenheit der SPCs synthetisiert. Dazu wurde der *in vitro*-Translationsansatz für 15 min bei 30 °C inkubiert und die Synthese anschließend durch Zugabe von 0,1 µg/µl Cycloheximid und 0,08 µg/µl RNase A gestoppt. Der Ansatz wurde danach erneut für 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 16 % SPCs zugefügt und der Transport für 30 min bei 30 °C durchgeführt. Wie im Falle des cotranslationalen Transports wurde auch hier der Transport durch Zugabe von Laemmli-Puffer und 5minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Die Transporteffizienz wurde ebenfalls per SDS-PAGE (siehe III.2.4.2), *Phosphorimaging* (siehe III.2.4.5) und densitometrische Auswertung der radioaktiven Signale (siehe III.2.4.7) bestimmt.

III.2.7. Methoden der Zellkultur

III.2.7.1. Kultivierung und Subkultivierung humaner Zelllinien

Die Methode der Zellkultur bedeutet das Kultivieren isolierter humaner, tierischer oder auch pflanzlicher Zellen außerhalb des eigentlichen Organismus. Dazu werden sie in einem adäquaten Medium gehalten, welches ihnen alle notwendigen Komponenten für das Wachstum liefert, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Aminosäuren oder Salze. Es können sowohl immortalisierte Zellen (permanente Kulturen), z.B. Tumorzellen oder transfizierte Zellen, als auch primäre Zellen (finite Kulturen) in Kultur gehalten werden. Der Vorteil einer primären Zelllinie ist, dass sie am wenigsten verändert wurde und deshalb den Bedingungen im Organismus am ehesten entspricht. Gegen sie spricht eine aufwendige Herstellung bei begrenzter Lebensdauer, ihre Veränderung während des Kulturverlaufs, z.B. Verringerung der Zellteilungsrate, und eine aufwendigere Handhabung, da gerade aus humanem Material gewonnene Zellen infektiös sein können. Auch wenn permanente Zelllinien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, stärker verändert sind als primäre Zelllinien und folglich nur noch wenige typische *in vivo*-Eigenschaften besitzen, haben sie einige Vorteile. So stehen sie zu jedem Zeitpunkt zur Verfügung und liefern nahezu unveränderte Bedingungen unabhängig von der Dauer einer Studie. Dies ist gerade für Langzeitkinetiken, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, vorteilhaft. In dieser Arbeit wurden ausschließlich adhärente humane Zelllinien verwendet, welche ursprünglich aus Tumorgewebe gewonnen wurden und kommerziell zur Verfügung standen (siehe III.1.8).

Zur Kultivierung wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Medium (siehe III.1.8) in 75 cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert und bei ca. 80 % Konfluenz passagiert (subkultiviert). Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch eine Behandlung mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) für 5 min bei 37 °C abgelöst. Während dieser Inkubation werden die Membranproteine, welche die Adhäsion an die Oberfläche der Kulturschale vermitteln, nach basischen Aminosäuren hydrolytisch gespalten. Die Trypsinisierung wurde durch die Zugabe von 1 ml Medium abgestoppt und 0,5 ml der Zellen in weiteren 14 ml Medium wie beschrieben kultiviert. Dies entspricht einer Passagierung der Zellen von 1:8.

Sollten Versuche durchgeführt werden, bei denen die Zellen mit siRNAs oder Plasmiden transfiziert werden sollten, wurden die Zellen in kleineren Kulturschalen kultiviert. Dazu wurde eine an die Fläche der Kulturschale angepasste, festgelegte Menge an Zellen ausgesät (siehe Tabelle 43).

Tabelle 43: Auszusäende Zellzahl in Abhängigkeit von der Kulturschale

Kulturschale Fläche	Zellzahl	Endvolumen
12-Well 3,9 cm ²	1x10 ⁵ -2x10 ⁵ Zellen	0,9 ml
6-Well 9,6 cm ²	2x10 ⁵ -3x10 ⁵ Zellen	1,9 ml
6 cm-Schale 21 cm ²	5x10 ⁵ -6x10 ⁵ Zellen	3,9 ml

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit unter den einzelnen Versuchen gewährleisten zu können, obwohl die Zellen schon unterschiedlich lange in Kultur waren, wurden die Zellen am Vortag des Versuchs stets 1:2 passagiert. Dadurch wurde bezweckt, dass sich die Zellen vor Versuchsbeginn stets in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

III.2.7.2. Kryokonservierung und Auftauen von humanen Zelllinien

Um Zelllinien über einen längeren Zeitraum in zellteilungsfrei lagern zu können, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Dazu wurden die Zellen wie beschrieben (siehe III.2.7.1) mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe III.2.7.3) wurden 2,5 x 10⁶ Zellen in 750 µl vorgekühlter Lösung 1 (siehe Tabelle 44) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Unter Schütteln wurden 750 µl Lösung 2 (siehe Tabelle 44) tropfenweise hinzugefügt und die Zellen schließlich in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff für 2 h abgekühlt. Die endgültige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Tabelle 44: Zusammensetzung der für die Kryokonservierung benötigten Lösungen

Lösung 1		Lösung 2	
FCS	40 %	DMSO	20 %
zum jeweiligen Medium		zum jeweiligen Medium	

Um die so konservierten Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, wurden sie bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml vorgewärmten Medium verdünnt, um das toxische DMSO aus den Zellen herauszuwaschen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 600 rpm und Raumtemperatur in der Beckman GS-6KR-Zentrifuge, wurde das Zellpellet in 15 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Diese Zellen wurden routinemäßig mittels eines Mycoplasmentests auf eine mögliche Kontamination durch parasitäre Mycoplasmen getestet.

III.2.7.3. Zellzählung und Viabilitätsmessung mittels *Countess[®] automated Cell Counter*

Die Zellzählung und Viabilitätsbestimmung wurde routinemäßig vor und nach jedem Versuch durchgeführt. Eine genaue Kenntnis der Zellzahl und Viabilität war unter anderem nötig, um:

1. eine definierte Zellzahl in einem Versuch aussäen zu können (siehe Tabelle 43).
2. bei der Kryokonservierung eine definierte Zellzahl pro Röhrchen einfrieren zu können (siehe III.2.7.2).
3. die Präparation der SPCs nach definierten Angaben durchführen zu können.
4. Zelllysate mit einer bestimmten Zellzahl herstellen zu können (10000 Zellen/ μ l Lysat).
5. am Ende des Versuchs eine Aussage über die Zellproliferation und Zellviabilität treffen zu können, wie es z.B. nach Zeitkinetiken der Fall war.

Bei der Zellzählung mittels dem *Countess[®] automated Cell Counter* kann durch die Färbung der Zellen mit Trypanblau die Gesamtzellzahl eines definierten Volumens bestimmt und zwischen toten und lebendigen Zellen unterschieden werden. Dies beruht auf der Tatsache, dass das Anion von Trypanblau an Zellproteine binden, aber eine intakte Zellmembran nicht passieren kann. Die Membran toter Zellen hingegen ist für Trypanblau permeabel. Daher werden tote Zellen durch die Zugabe von Trypanblau komplett blau gefärbt, während lebende Zellen nur eine blaue Umrandung haben.

Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS durch eine Trypsinbehandlung abgelöst (siehe III.2.7.1), in frischem Medium suspendiert und ein Aliquot im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Es erfolgte eine automatisierte Auszählung der Zellen in einem Volumen von 10 μ l nach Angaben des Herstellers. So wurde die Gesamtzellzahl, die Lebend- und Todzellzahl bestimmt und durch das Verhältnis von Lebend- zu Todzellzahl die Viabilität der Zellpopulation erhalten.

Jedoch muss beachtet werden, dass Trypanblau bei zu langer Einwirkzeit cytotoxisch wirkt und daher die Zahl der toten Zellen mit der Zeit fälschlicherweise als zu hoch angegeben wird. Daher sollte nach einer Verdünnung der Zellen mit Trypanblau direkt die Messung erfolgen.

III.2.7.4. Säugerzellmanipulation durch RNA-Interferenz

In Pflanzen, Pilzen und Tieren führt die Anwesenheit von kurzen doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) zu einer sequenzspezifischen Unterdrückung der Genexpression (Fire *et al.*, 1998). Dies wird als

posttranskriptionales Gen *silencing* (PTGS) oder auch RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. In der Zellkultur findet diese Erkenntnis ihre Anwendung, da gezielt kurze synthetische siRNAs (Elbashir *et al.*, 2001a) oder über ein Expressionsplasmid codierte shRNAs (Lew *et al.*, 2012; Mary *et al.*, 2010) in die Zellen eingebracht werden können und somit spezifisch die komplementäre mRNA abgebaut werden kann. (Bosher und Labouesse, 2000) Durch den natürlich vorkommenden Abbau der Proteine in Zellen (*turn over*) (Bachmair *et al.*, 1986; Bojkowska *et al.*, 2011; Hershko und Ciechanover, 1998; Leonhard *et al.*, 2000; Montgomery *et al.*, 1998) in Kombination mit der RNAi vermittelten mRNA-Degradation, kommt es durch fehlende Synthese des jeweiligen Proteins letztendlich zu dessen Depletion in der Zelle.

Wie führt eine dsRNA zur PTGS? Nach der Transfektion der Zellen mit einer synthetischen siRNA oder einem shRNA-exprimierenden Plasmid, wird die dsRNA durch eine cytosolische Nuklease der RNase III Familie, namens Dicer, auf die typische Länge von 19 bp bis 23 bp (Milhavet *et al.*, 2003) getrimmt. Dabei erhält sie den charakteristischen zwei Nukleotide langen Überhang am 3'-Ende und ein phosphoryliertes 5'-Ende (Elbashir *et al.*, 2001b; Zamore *et al.*, 2000). Die beiden Stränge der dsRNA werden als *passenger*- (Sinnstrang) und *guide*-Strang (Antisinnstrang) bezeichnet. Die dsRNA wird anschließend in den ebenfalls cytosolischen Riboproteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) integriert und der *passenger*-Strang durch Argonautenproteine gespalten (Hammond *et al.*, 2001) und entlassen. Der so aktivierte RISC-Komplex kann dann vermittelt durch den *guide*-Strang an die komplementäre mRNA binden und diese ebenfalls degradieren. Die entstandenen mRNA-Fragmente werden im Cytosol letztendlich durch weitere Nucleasen abgebaut.

In dieser Arbeit wurde RNAi sowohl durch synthetische siRNAs (siehe Tabelle 15 und III.2.7.4.1) als auch durch endogen exprimierte shRNAs (siehe Tabelle 12 und III.2.7.5.1) erreicht. Sie wurden gezielt gewählt, um eine bestimmte mRNA zu depletieren und unter Beachtung der Halbwertszeit des entsprechenden Proteins auch dessen Gehalt zu reduzieren. Wenn man bestimmte Mechanismen, wie z.B. Transport, Proliferation, Migration, etc., in solch manipulierten Zellen mit Kontrollzellen vergleicht, kann eine Aussage über die Funktion des depletierten Proteins in diesem Prozess getroffen werden. Um unspezifische Effekte ausschließen zu können, (*off-traget*- oder *side*-Effekt) wurden mindestens zwei unterschiedliche siRNAs pro Ziel-mRNA in den Analysen eingesetzt.

III.2.7.4.1 Säugerzellmanipulation durch RNAi mittels synthetischer siRNAs

Die Zellen wurden einen Tag vor Transfektion 1:2 passagiert, um sie in eine exponentielle Wachstumsphase zu überführen. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Die Kulturschale wurde individuell für jeden Versuch gewählt und die Zellen ausgesät (Tabelle 43). Es wurde ein Transfektionsansatz aus

OptiMEM, siRNA und HiPerfect angesetzt (siehe Tabelle 45), gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert, kurz geschwenkt und die Zellen letztendlich bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumswechsel und die Transfektion wurde wiederholt (Nachtransfektion).

Tabelle 45: Zusammensetzung des siRNA-Transfektionsansatzes in Abhängigkeit von der Kulturschale

Kulturschale Fläche	Zellzahl	Endvolumen	siRNA-Konzentration	HiPerfect
12-Well 3,9 cm ²	1x10 ⁵ -2x10 ⁵ Zellen	0,9 ml	siehe Tabelle 46	6 µl
6-Well 9,6 cm ²	2x10 ⁵ -3x10 ⁵ Zellen	1,9 ml	siehe Tabelle 46	12 µl
6 cm-Schale 21 cm ²	5x10 ⁵ -6x10 ⁵ Zellen	3,9 ml	siehe Tabelle 46	20 µl
ad 100 µl mit Optimem				

Lagen schon Transfektionsprotokolle aus Vorarbeiten anderer für die PTGS mit siRNAs vor, wurden die empfohlenen siRNA-Konzentrationen übernommen (siehe Tabelle 46). Für die Transfektionen mit SR α -siRNA bzw. einer Kombination von SR α - und SEC62-siRNAs wurden die optimalen siRNA-Konzentrationen und die Zeitpunkte der optimalen Protein-Depletion ermittelt.

Dazu wurden die Zellen in Kavitäten eines 12-Wells ausgesät und mit unterschiedlich hohen siRNA-Konzentrationen für unterschiedliche Zeiträume behandelt. Nach ihrer Ernte, Zellzählung und Lyse wurden die Zellproben auf ein SDS-Gel aufgetragen, per Westernblot die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und schließlich die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Es erfolgte letztendlich die Bestimmung der Proteinmengen von Sec62 und SR α in den unterschiedlichen Proben, entweder nur mit einer einzelnen siRNA behandelt oder mit einer Kombination von siRNAs transfiziert. Der Vergleich des Proteingehalts zwischen den Proben geschah durch einen Abgleich des β -Aktin-Gehalts.

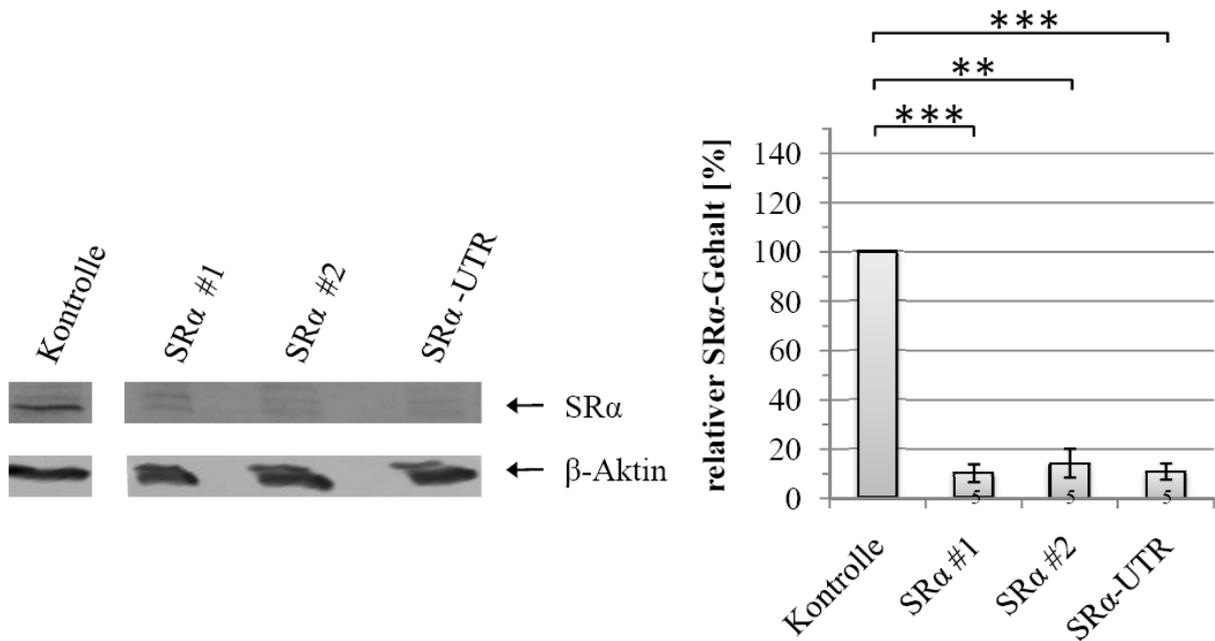


Abbildung 5: Restproteingehalt nach 96 h Transfektion der HeLa-Zellen mit 15 nM einer SRα-siRNA

HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 15 nM Kontroll-siRNA bzw. SRα-siRNA behandelt. Es folgten Zellernte, Zellyse und die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Nach Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgten die Detektionen von SRα und β-Aktin, um eine quantitative Aussage über die SRα-Depletion machen zu können. Das Excel-Diagramm zeigt beispielhaft fünf verschiedene Versuche gemittelt.

Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen erfolgte mit dem t-Test ($0,01 > p > 0,001$: **; $p > 0,001$: ***).

Für eine SRα-Depletion erwies sich die 96stündige Transfektion mit 15 nM siRNA als effizient (siehe Abbildung 5). Es wurde beispielhaft in fünf gemittelten Versuchen im Durchschnitt eine Reduktion des Proteingehalts auf unter 20 % erreicht. Aus diesem Grund wurden alle Versuche in dieser Arbeit mit dieser siRNA-Konzentration durchgeführt.

Um SRα und Sec62 gleichzeitig in der Zelle depletieren zu können, musste eine siRNA-Kombination ermittelt werden, die für beide Proteine ein effizientes *silencing* ermöglicht. Daher wurden unterschiedliche Kombinationen getestet.

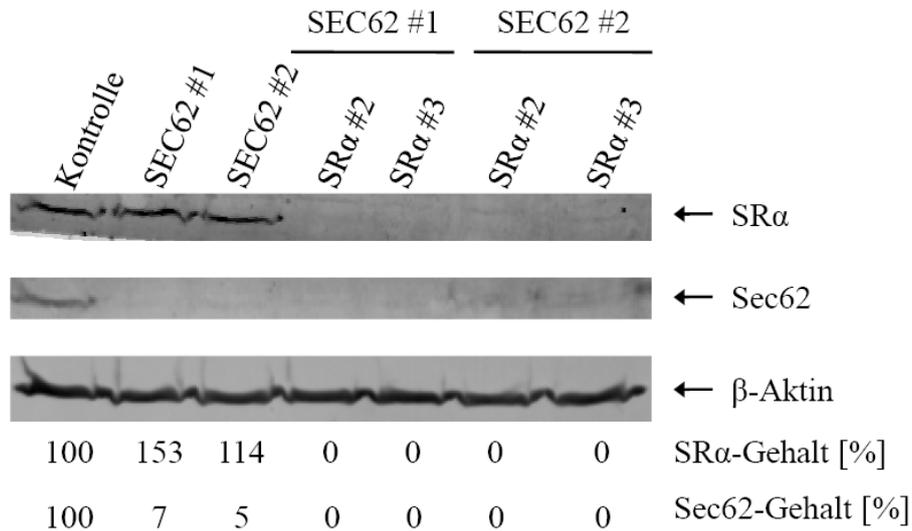


Abbildung 6: Restproteingehalt nach 96 h Transfektion der HeLa-Zellen mit 15 nM einer SRα-siRNA und/oder 15 nM einer SEC62-siRNA

HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 15 nM Kontroll-siRNA bzw. 15 nM einer SRα-siRNA und/oder 15 nM SEC62 #1-siRNA bzw. SEC62 #2-siRNA behandelt. Es folgten Zellernte, Zellyse und die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Nach Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgten die Detektionen von SRα, Sec62 und β-Aktin, um eine quantitative Aussage über die SRα- und/oder Sec62-Depletion machen zu können.

Sowohl für die Manipulation der Zellen mit einer einzelnen siRNA gegen SRα oder Sec62 als auch für die Kombination beider zeigte sich eine sehr effiziente Depletion der entsprechenden Proteine (siehe Abbildung 6). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die SEC62 #1- oder SEC62 #2-siRNA eingesetzt worden war. Für die weiteren Versuche wurde die SRα-siRNA in Kombination mit der SEC62 #1-siRNA eingesetzt.

Aus diesen Versuchen und der bereits bekannten siRNA-Konzentration für eine BIP-Depletion gibt es folgende Übersichtstabelle:

Tabelle 46: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete siRNA-Konzentrationen

Name	Verwendete Konzentration [nM]
BIP-UTR	35
Kontrol-siRNA	10-35
SEC62 #1	15
SEC62-UTR	15
SRα #1	15
SRα #2	15
SRα-UTR #3	15
SRα #4	15

III.2.7.5. Plasmid-vermittelte Säugerzellmanipulation

In dieser Arbeit wurden gezielt Plasmide in die humane Zelle eingebracht, um folgende Resultate zu erzielen:

1. Der Expressionsvektor enthielt eine gezielt gewählte DNA-Sequenz, die für eine doppelsträngige haarnadelförmige RNA-Sequenz codierte. Diese shRNAs können über RNAi die zelleigene komplementäre mRNA reduzieren (siehe III.2.7.4). Durch diese Vorgehensweise konnten mithilfe eines auf dem Plasmid codierten Selektionsmarkers stabile Zelllinien erstellt werden, welche eines bestimmten, zu untersuchenden Proteins konstitutiv depletiert sind.
2. Ein Protein wurde synthetisiert, das vorher durch RNAi depletiert worden war. Diese Versuche wurden verwendet, wenn man einen durch die Depletion beobachteten Effekt wieder aufheben wollte. Sie werden daher als Rettungsexperimente bezeichnet und gelten als sicherste Bestätigung für eine auf RNAi-Experimente aufbauende Hypothese.

In dieser Arbeit wurden die Plasmide mittels des Transfektionsreagens FuGENE HD[®] der Firma Roche in die Zellen eingebracht. Die Transfektionsmethode beruht auf einer Komplexbildung aus Plasmid und Transfektionsreagenz, welche zusammen die Zellmembran passieren können. Im Zellinneren wird das Plasmid freigesetzt und kann schließlich im Zellkern wie die zelleigene DNA exprimiert werden.

Lagen bereits Transfektionsprotokolle aus Vorarbeiten anderer vor, wie im Falle für die Plasmide pcDNA3-Neo-Sec62-IRES-GFP oder pcDNA3-Neo-ERj3-IRES-GFP, so wurden diese übernommen (siehe Tabelle 47): Die in 6 cm-Schalen ausgesäten und bereits zweimal mit siRNA transfizierten Zellen (siehe III.2.7.4.1) erhielten 72 h nach erster siRNA-Behandlung einen Mediumswechsel (3,75 ml frisches Medium). Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden OptiMEM, DNA und FuGene HD[®] vereint und nach kurzem Mischen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert und nach vorsichtigem Schwenken der Schale zur Vermischung des Mediums mit dem Plasmid-Transfektionsansatz wurden die Zellen anschließend bei 37 °C mit 5 % CO₂ weitere 24 h bis zur Ernte inkubiert.

Tabelle 47: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für bereits etablierte Plasmide

Plasmid	Optimem	Fugene	DNA	Verhältnis
pcDNA3-Neo-Sec62-IRES-GFP	236 µl	10 µl	2 µl	10:2
pcDNA3-Neo-ERj3-IRES-GFP	230 µl	16 µl	4 µl	16:4

Im Fall der zwei klonierten SR α -Plasmide wurden die Transfektionsprotokolle erst erarbeitet. Es wurden daher die Verhältnisse Reagenz:DNA von 10:2 und 10:4 getestet. Es zeigte sich, dass das Verhältnis Reagenz:DNA von 10:2 nach einer 24stündigen Expression des Plasmids zu einer effizienten Proteinsynthese führte. Auch in Rettungsexperimenten erwies sich dieses Transfektionsprotokoll als erfolgreich: Nach 96stündiger RNAi mit der SR α -UTR-siRNA ging der Proteingehalt auf 15 % zurück. Nach 96tündiger RNAi inklusive 24stündiger Expression des Rettungsplasmids wurde der SR α -Proteingehalt auf durchschnittlich 129 % angehoben (siehe Abbildung 7).

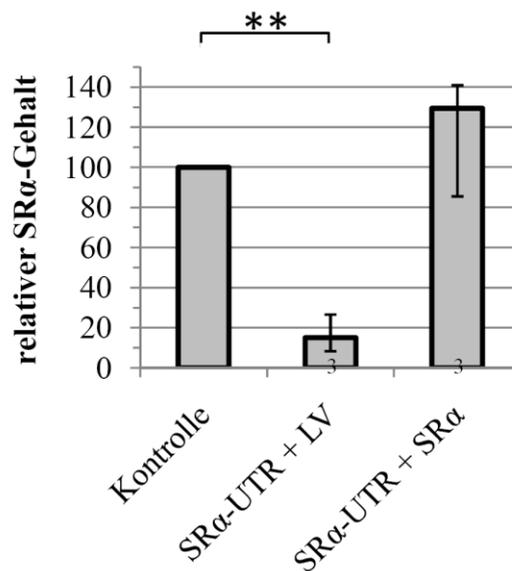


Abbildung 7: Durchschnittlicher SR α -Proteinlevel in Rettungsexperimenten

Nach 72 h Behandlung mit Kontroll-siRNA oder SR α -UTR-siRNA wurde mit 2 μ g Kontrollplasmid (LV) oder pcDNA3-Neo-SR α -IRES-GFP-Plasmid-DNA (SR α) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und durch Westernblot-Analyse auf den SR α -Gehalt getestet. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen erfolgte mit dem t-Test ($0,01 > p > 0,001$: **; Rest: nicht signifikant). LV= Leervektor

III.2.7.5.1 Säugerzellmanipulation durch Expressionsvektor basierte RNAi

In dieser Arbeit wurde eine stabile Zelllinie erstellt, deren Sec63-Proteinlevel reduziert ist. Dies wurde durch die Transfektion der Zellen mit den HusH shRNA-Plasmiden der Firma Origene erreicht (siehe Tabelle 12), welche DNAs codieren, deren transkribierten shRNAs gegen die SEC63-mRNA gerichtet sind. Desweiteren codieren sie auch GFP und eine Puromycinresistenz, durch die auf die erfolgreich transfizierten Zellen selektiert wurde.

Für die Erstellung der stabilen Zelllinien wurden für jedes Plasmid in je vier 6 cm-Schalen 5×10^5 Zellen in einem Volumen von 3,9 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie in einem

Transfektionsansatz aus 100 µl OptiMEM, 10 µg DNA und 30 µl Fugene transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und in einer 75 cm²-Kulturflasche vereint. Weitere 24 h später wurde dem Medium 1,5 µg/ml Puromycin zugesetzt und die Zellen weitere 14 Tage kultiviert, wobei alle zwei Tage mit PBS gewaschen und das Medium erneuert wurde. Durch die Zugabe von Puromycin wurde auf die transfizierten Zellen selektiert, was im Durchlichtmikroskop durch die Abnahme der Konfluenz erkennbar war. Sobald die Zellzahl wieder zunahm, wurde ein Teil der Zellen kryokonserviert, der andere Teil wurde mit konditioniertem Medium auf 0,3 Zellen/ml verdünnt und davon je 200 µl der Zellen in die Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Kavitäten wurden am nächsten Tag auf vereinzelte Zellen, die auf Grund einer GFP-Synthese grün leuchteten, kontrolliert. Diese Zellen wurden unter Beobachtung kultiviert und bei Bedarf in größere Zellkulturschalen umgesetzt. Sobald genügend Zellen der monoklonalen Zelllinien zur Verfügung standen, wurde ein Teil kryokonserviert und ein Teil in Kultur gehalten. Dies geschah immer in Anwesenheit von 1,5 µg/ml Puromycin.

Das konditionierte Medium wurde über einen längeren Zeitraum schon vor dem Versuch gewonnen, indem über Nacht HeLa-Zellen in einer 75 cm²-Kulturflasche mit 15 ml frischem Medium kultiviert wurden. Dieses war am nächsten Tag abgenommen und für 10 min bei 600 rpm und Raumtemperatur in der GS-6KR-Zentrifuge von Beckman zentrifugiert worden. Davon waren wiederum 10 ml entnommen und bei 4 °C bis zu seiner Verwendung gelagert worden. Dadurch wurde das Medium z.B. mit Wachstumsfaktoren angereichert, welches den vereinzelt Zellen bessere Kultivierungsbedingungen lieferte.

Aus dieser Vorgehensweise gingen vier monoklonale Zelllinien hervor: drei Zelllinien, die mit dem Hush-Plasmid #77 transfiziert worden waren und eine Kontrollzelllinie, die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert worden war. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, zeigen sie eine deutliche Synthese von GFP, was bedeutet, dass diese Zellen das entsprechende Plasmid tragen.

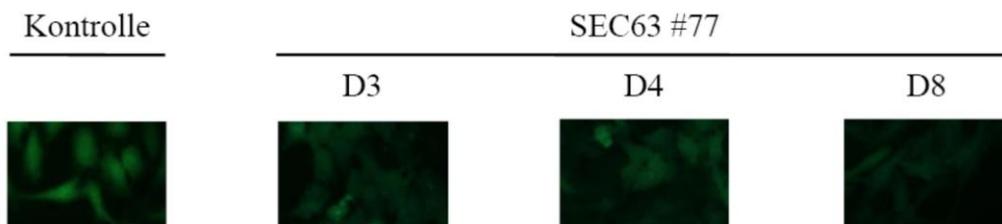


Abbildung 8: Kontrolle der erstellten Zelllinien auf GFP-Synthese

Nach Transfektion mit dem jeweiligen HusH shRNA-Plasmid wurden die Zellen in Medium mit 1,5 µg/ml Puromycin kultiviert. Die puromycinresistenten Zellen wurden geerntet, in konditioniertem Medium auf 0,3 Zellen/ml verdünnt und je 200 µl in 96-Well-Platten ausgesät. Im Durchlichtmikroskop wurden die Kavitäten auf einzelne Zellen getestet und per Fluoreszenzmikroskopie deren GFP-Synthese kontrolliert.

III.2.7.6. Echtzeit-Zellanalyse (xCELLigence RTCA)

Eine kontinuierliche Bestimmung der Zellproliferation adhärenter Zellen erfolgte mittels des xCelligence real-time cell analyzer (xCelligence RTCA) der Firma Roche. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung eines Stromflusses zwischen kleinen Elektroden, die den Boden der Kavitäten einer 96-Well-Platte (E-Plate) bedecken. Mit zunehmendem Zellwachstum sind mehr der Goldelektroden mit Zellen überschichtet, wodurch sich die Impedanz, also der durch die Zellen verursachte Widerstand im Stromkreis erhöht. So ist es möglich, die Änderung der Konfluenz in einer fortlaufenden Messung zu verzeichnen, wodurch Rückschlüsse über Zellzahl und -viabilität geschlossen werden können. Die Impedanz wird dafür als eine Zellindex-Zeit-Kurve dargestellt, wobei der Zellindex eine dimensionslose Größe ist.

Die für 96 h mit siRNA manipulierten Zellen wurden geerntet und gezählt. Ein Teil der Zellen wurde für die spätere Bestimmung des Restproteingehalts lysiert. Der andere Teil wurde so verdünnt, dass 10000 Zellen pro Kavität ausgesät werden konnten. Zuerst wurde jedoch eine Initialmessung der E-Plate mit 50 µl Medium pro Kavität durchgeführt. Nach der Aussaat der Zellen erfolgte die Kultivierung wie gewohnt bei 37 °C mit 5 % CO₂ für 48 h.

III.2.7.7. Viabilitätsanalyse mittels Nuclear-IDTM-Reagenz

Die Inkubation von Zellen in PBS mit 1 µM Nuclear-IDTM-Reagenz ermöglicht eine Analyse der Zellviabilität durch die Bestimmung der lebenden und toten Zellen. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass das Reagenz ein Gemisch zweier Fluorophore enthält und tote und lebende Zellen unterschiedlich anfärbt. Der blaufluoreszierende, zellpermeable Nukleinsäurefarbstoff färbt alle Nuklei der Zellen, ungeachtet deren Viabilität. Der grüne, zellimpermeable Nukleinsäurefarbstoff hingegen färbt lediglich Zellen mit sich auflösender Plasmamembran. Das Verhältnis zwischen grün- und blau gefärbten Zellen gibt Rückschluss auf die Viabilität der mikroskopierten Zellenpopulation bzw. bei Vergleich der Werte von behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen wurde eine Aussage über die Zytotoxizität getroffen.

Die Zellen wurden einem auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas ausgesät und der Fragestellung entsprechend vorbehandelt. Zum gewünschten Zeitpunkt wurde das Deckglas in eine 3,5 cm-Zellkulturschale überführt und für 30 min in 1 ml 1 µM Nuclear-IDTM-Reagenz in PBS bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Das Deckglas wurde mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger transferiert und mithilfe des Nikon Eclipse TE 2000-S sowohl im Hellfeld als auch mittels DAPI- und GFP-Filter mikroskopiert.

III.2.7.8. Inhibition des Proteasoms mittels MG132

Das Proteasom, ein multikatalytischer Proteasekomplex, ist für die Degradation fehlgefalteter oder fehllokalisierter Proteine im Cytosol der Zelle verantwortlich. Möchte man nach einer Zellmanipulation potentiell nicht-translozierte Proteine per SDS-PAGE (siehe III.2.4.2), Westerblot-Analyse (siehe III.2.4.4) und Antikörperdekoratation (siehe III.2.4.5) detektieren, muss das Proteasom folglich inhibiert werden. In dieser Arbeit wurde der Proteasomeninhibitor MG132 eingesetzt.

Die Zellen wurden der Fragestellung des Versuchs entsprechend vorbehandelt und dann für 8 h in Medium mit 10 μ M MG132 (in DMSO gelöst) bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Es erfolgten die Zellernte, -zählung und -lyse zur Vorbereitung auf eine SDS-PAGE und Westernblot-Analyse.

III.2.8. Statistische Analyse

Im Falle einer statistischen Analyse wurde der t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Berechnete Wahrscheinlichkeiten (p) wurden in verschiedene Klassen eingeteilt zur Bestätigung oder Widerlegung der Nullhypothese. Soweit nicht anders angegeben, zeigen die Fehlerbalken der Abbildungen den zugehörigen Standardfehler der Stichprobenmenge.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Sec62-Komplementationsstudie in *Saccharomyces cerevisiae*

Ziel der Komplementationsstudien in *Saccharomyces cerevisiae* war es, herauszufinden, ob das humane Sec62 trotz der im Laufe der Evolution neu gewonnenen basischen Peptide die Funktion des Hefeorthologs erfüllen kann. Dazu wurde der temperatursensitive Hefestamm SEC62ts (Deshaies und Schekman, 1989) nach Transformation mit einem Kontrollvektor bzw. einem Vektor, der die cDNA des humanen SEC62 enthielt, bei permissiver Temperatur von 24 °C oder der nichtpermissiven Temperatur von 37 °C kultiviert und auf sein Wachstum überprüft. Die Induktion der Expression des humanen SEC62 erfolgte durch Zugabe von Galaktose. In einer Studie gelang es 1994 die Letalität der Sec62-Depletion in Hefe durch die Expression des Drosophila-Homologs Dtrp1 zu kompensieren (Noel und Cartwright, 1994).

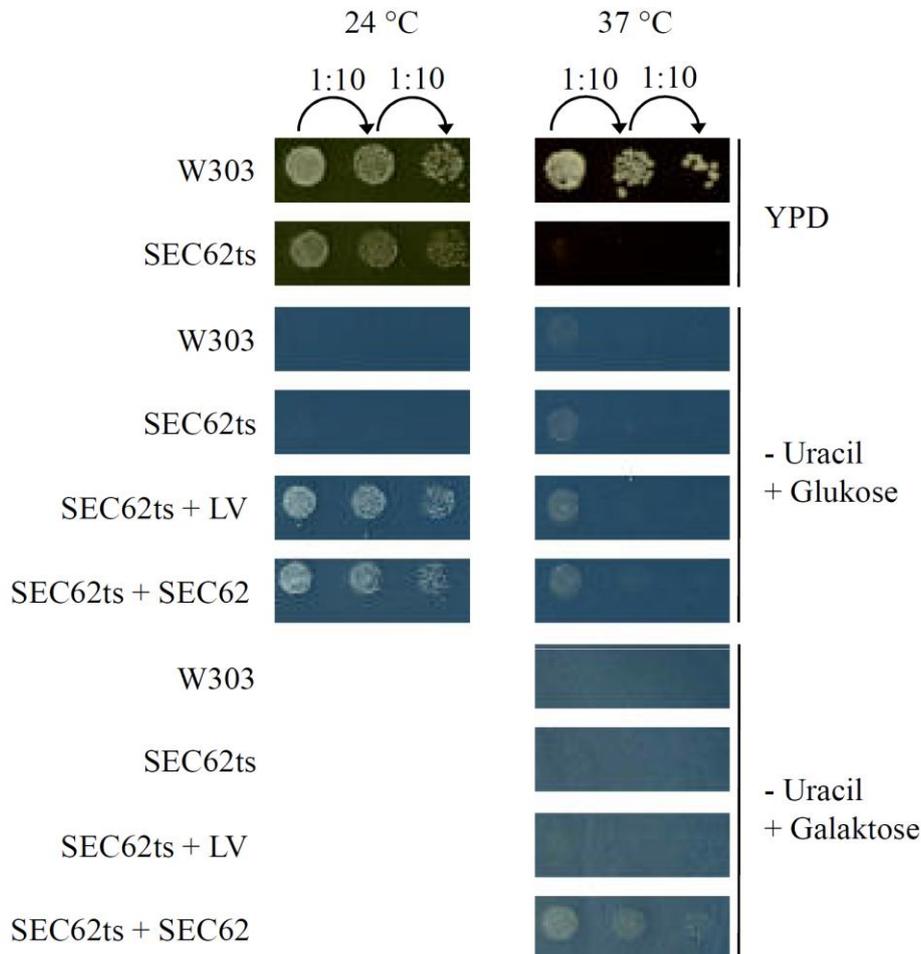


Abbildung 9: Wachstumstest des temperatursensitiven SEC62ts-Hefestamms bei 24 °C bzw. 37 °C auf Agarplatten ohne Uracil mit und ohne Induktion der Synthese des humanen Sec62

Der temperatursensitive SEC62ts Hefestamm RDM50-94C wurde auf SD_{-Ura}-Platten in der Abwesenheit von Uracil und in Anwesenheit von Glukose oder Galaktose in drei verschiedenen Verdünnungen aufgetragen und bei 24 ° bzw. 37 °C kultiviert. Wenn angegeben, waren die Hefezellen mit einem Multikopien-Vektor, der

IV. ERGEBNISSE

URA3 als Selektionsmarker und die humane cDNA von SEC62 unter Kontrolle des GAL1-Promotors (SEC62; pGS59-SEC62) enthielt bzw. den entsprechenden Leervektor (pGS59; LV), transformiert. Als weitere Positiv- bzw. Negativkontrollen dienten der Wildtypstamm W303 bzw. SEC62ts, die bei 24 ° bzw. 37 °C auf YPD-Platten kultiviert wurden. Die Platten wurden mit dem Imagescanner III von GE Healthcare digitalisiert.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, konnte der wildtypische Hefestamm sowohl bei 24 °C als auch bei 37 °C wachsen. Auf SD_{-Ura}-Platten war das Wachstum nicht möglich. Die temperatursensitive Mutante SEC62ts konnte nur auf YPD-Platte bei 24 °C wachsen, bei Kultivierung bei 37 °C auf YPD-Platte bzw. bei 24 °C auf einer der SD_{-Ura}-Platten wurde kein Wachstum beobachtet. Die Verdünnungen der SEC62ts-Hefezellen, die mit dem Leervektor (LV; pGS59) bzw. mit dem die cDNA von SEC62 tragenden Vektor (pGS59-SEC62) transfiziert waren, konnten bei Anwesenheit von Glukose nur bei 24 °C auf den SD_{-Ura}-Platten wachsen. Bei einer Kultivierung bei 37 °C war nur bei der geringsten Verdünnung ein leichtes Wachstum zu beobachten. Das humane SEC62-Gen stand unter Kontrolle des GAL1-Promotors. Im Falle einer Kultivierung auf SD_{-Ura}-Platten in Gegenwart von Galaktose bei 37 °C war im Falle des mit dem SEC62-codierenden Vektor transformierten SEC62ts-Stamms Wachstum zu verzeichnen. Dort wurde für jede Verdünnung Wachstum beobachtet.

Diese Beobachtung sollte in einer Wachstumskinetik bestätigt werden. Dazu wurden die temperatursensitiven Hefezellen erneut mit dem Vektor, der das humane SEC62-Gen unter Kontrolle des GAL1-Promotors trägt, transformiert. Anschließend wurden diese Zellen in SD_{-Ura}-Medium bei 24 °C oder 37 °C bei An- oder Abwesenheit von Galaktose kultiviert. Über einen Zeitraum von 48 h wurden Proben entnommen und auf Wachstum kontrolliert.

Abbildung 10 zeigt, dass bei 24 °C sowohl bei Anwesenheit von Glukose als auch bei Anwesenheit von Galaktose die optische Dichte (OD) der entnommenen Proben im Beobachtungsintervall anstieg. Dies bedeutet, dass die Hefezellen unter beiden Bedingungen gewachsen sind. Das Wachstum in Anwesenheit von Galaktose war langsamer, da Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle der Hefen darstellt und die Zelle sich zunächst vom Glukose- auf den Galaktosestoffwechsel umstellen muss (Demir und Aksan Kurnaz, 2006). Wurden die Hefezellen bei 37 °C kultiviert, stieg die OD nur in Anwesenheit von Galaktose an. Folglich konnten die Hefezellen nach Induktion der SEC62-Expression durch Galaktose auch bei 37 °C wachsen.

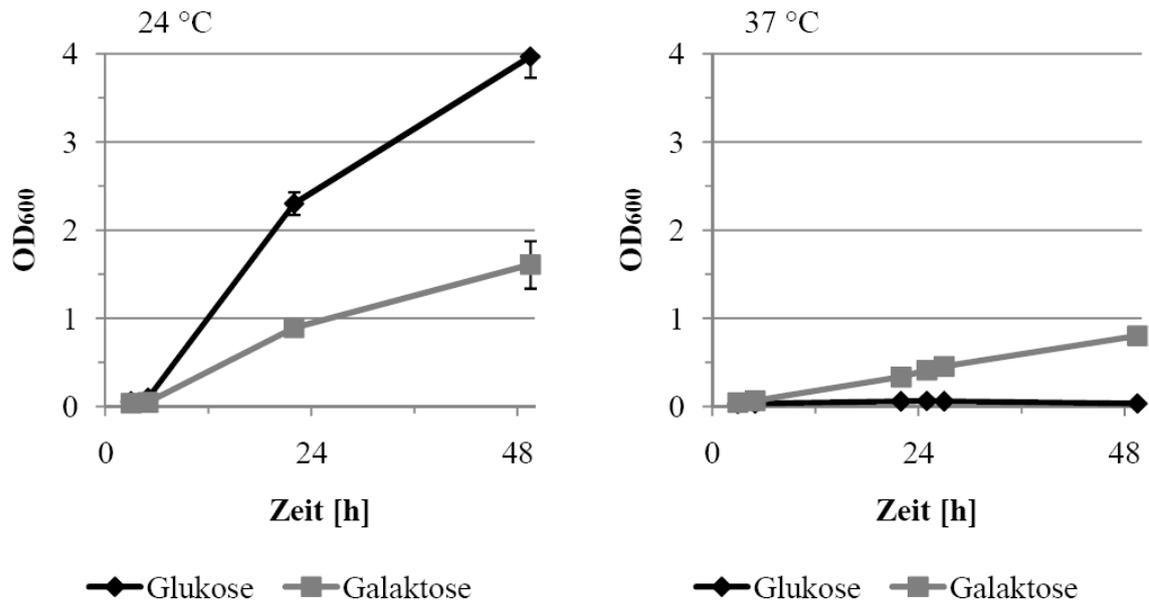


Abbildung 10: Wachstumskinetik des temperatursensitiven SEC62ts-Hefestamms bei 24 °C bzw. 37 °C in Flüssigmedium ohne Uracil mit (Galaktose) und ohne (Glukose) Induktion der Synthese des humanen Sec62

Der temperatursensitive SEC62ts Hefestamm RDM50-94C wurde mit einem Multikopien-Vektor transformiert, der URA3 als Selektionsmarker und die humane cDNA von SEC62 unter Kontrolle des GAL1-Promotors (SEC62; pGS59-SEC62) enthielt. Die Zellen wurden in SD_{Ura} -Medium in der Abwesenheit von Uracil und in Anwesenheit von Glukose oder Galaktose bei 24 ° bzw. 37 °C kultiviert. Über 48 h wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben des Mediums entnommen und die optische Dichte (OD) im Photometer UltraSpec 3000 der Firma GE Healthcare bei 600 nm gemessen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die temperatursensitive Hefe-Mutante SEC62ts sowohl im Wachstumstest auf einer SD_{Ura} -Platte als auch in einer Wachstumskinetik in Flüssigmedium nach Expression des humanen SEC62-Gens bei 37 °C wachsen konnte. Folglich konnte die Expression des humanen SEC62-Gens den durch die Kultivierung bei nichtpermissiver Temperatur induzierten letalen Phänotyp der SEC62ts-Hefemutante retten.

IV.2. Untersuchungen von Sec62 in PC3-Zellen

IV.2.1. Kinetik nach RNAi-vermittelter Sec62-Depletion als Vorarbeit für die differenzielle Proteomanalyse

Auf Grund der Orthologie zwischen dem Säuger- und dem Hefe-Sec62 wurde vermutet, dass in humanen Zellen Sec62 an der Proteintranslokation in das ER beteiligt ist. Daher sollten Proteine gefunden werden, deren Biogenese abhängig von Sec62 sein könnte. Die Methode der Wahl war eine Proteomanalyse mittels differentieller 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE). Dabei wurden die Proteome von Kontrollzellen und von Zellen, in denen über RNAi (RNA-Interferenz) Sec62-depletiert worden waren, verglichen. Proteine, deren Biogenese auf Sec62 angewiesen ist, sollten durch ihren natürlich vorkommenden Umsatz (*turnover*) nach Sec62-Depletion ebenfalls reduziert werden. Diese Proteine können durch 2D-DIGE identifiziert werden. Vergleichsstudien von Patienten mit Prostatakarzinom zeigten eine häufige Amplifikation des SEC62-Gens (Jung *et al.*, 2006). Einhergehend wurden sowohl ein erhöhter SEC62-mRNA-Gehalt als auch ein erhöhter Sec62-Proteingehalt nachgewiesen. Folgend wurden an PC3-Zellen Experimente zur Invasion und Migration nach Sec62-Depletion bzw. Rettung des Sec62-Gehalts durchgeführt (Greiner *et al.*, 2011a). Sie zeigten, dass das Migrations- und Invasionsverhalten der PC3-Zellen proportional zum Sec62-Gehalt ist. Aus diesen Experimenten ist bekannt, dass eine SEC62-siRNA vermittelte RNAi über einen Zeitraum von 96 h keinen Einfluss auf die Viabilität und Proliferation der PC3-Zellen hat (Greiner *et al.*, 2011a). Damit die Unterschiede zwischen Kontrollzellen und behandelten Zellen im 2D-DIGE jedoch möglichst deutlich sind, sollte die SEC62-Genexpression über einen noch längeren Zeitraum reduziert werden. So wurde erhofft, den Gehalt derer Proteine, die in ihrer Proteostase Sec62-abhängig sind, so effektiv wie möglich zu minimieren. Daher hieß es zunächst herauszufinden, ob das Sec62-Protein über einen längeren Zeitraum als 96 h aus der Zelle entfernt werden kann oder ob das SEC62-Gen wie in Hefe auch in PC3-Zellen essentiell ist.

Im ersten Schritt wurden PC3-Zellen nach 192stündiger RNAi auf ihre Proliferation und Viabilität getestet, geerntet und zur Kontrolle ebenfalls ihr Sec62-Gehalt in Bezug auf die kontrollbehandelten Zellen bestimmt. Man beachte, dass die siRNA-Behandlung zum Zeitpunkt 0 h und 24 h erfolgte. Während Abbildung 11 exemplarisch einen entsprechenden Westernblot zeigt, fasst Abbildung 12 die Daten zusammen.

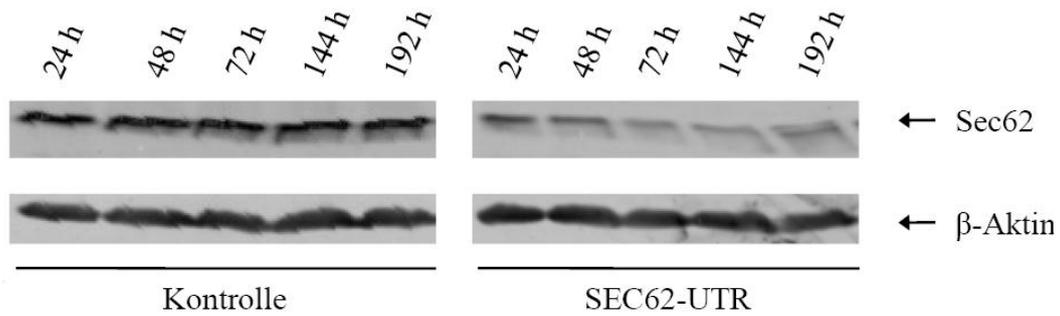


Abbildung 11: Westernblot-Analyse der 192stündigen Sec62-Depletion in PC3-Zellen (mit einmaliger Nachtransfektion nach 24 h)

PC3-Zellen wurden für 192 h mit 15 nM SEC62-UTR-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt, geerntet, in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Antikörperdekoration und Fluoreszenzscan wurden die Proteinsignale digitalisiert.

Das Proliferationsverhalten (B) und die Viabilitäten (C) der SEC62-siRNA-manipulierten Zellen unterschieden sich nur minimal von den Kontrollzellen. Jedoch wird durch Abbildung 12 A ersichtlich, dass es sich bei einem solchen siRNA-induzierten posttranskriptionalen Gen *silencing* (PTGS) lediglich um einen transienten Effekt handelt, da nach 144 h ein erneuter Anstieg des Sec62-Proteingehalts zu erkennen ist. Zudem war in diesen Experimenten nach Transfektion mit der SEC62 #1-siRNA die Sec62-Proteinreduktion nicht sehr effizient. Daher ist es möglich, dass das SEC62-Gen durchaus essentiell ist, die rückwertig gerichtete genetische Analyse durch den hohen Sec62-Proteingehalt jedoch dies nicht erkennen lässt. Erst die effiziente Depletion eines potentiell essentiellen Proteins kann einhergehende zelluläre Phänotypen sichtbar machen. Folglich lässt sich aus den Daten der Abbildung 12 nicht erschließen, ob man in PC3-Zellen das SEC62-Gen über 192 h stilllegen kann.

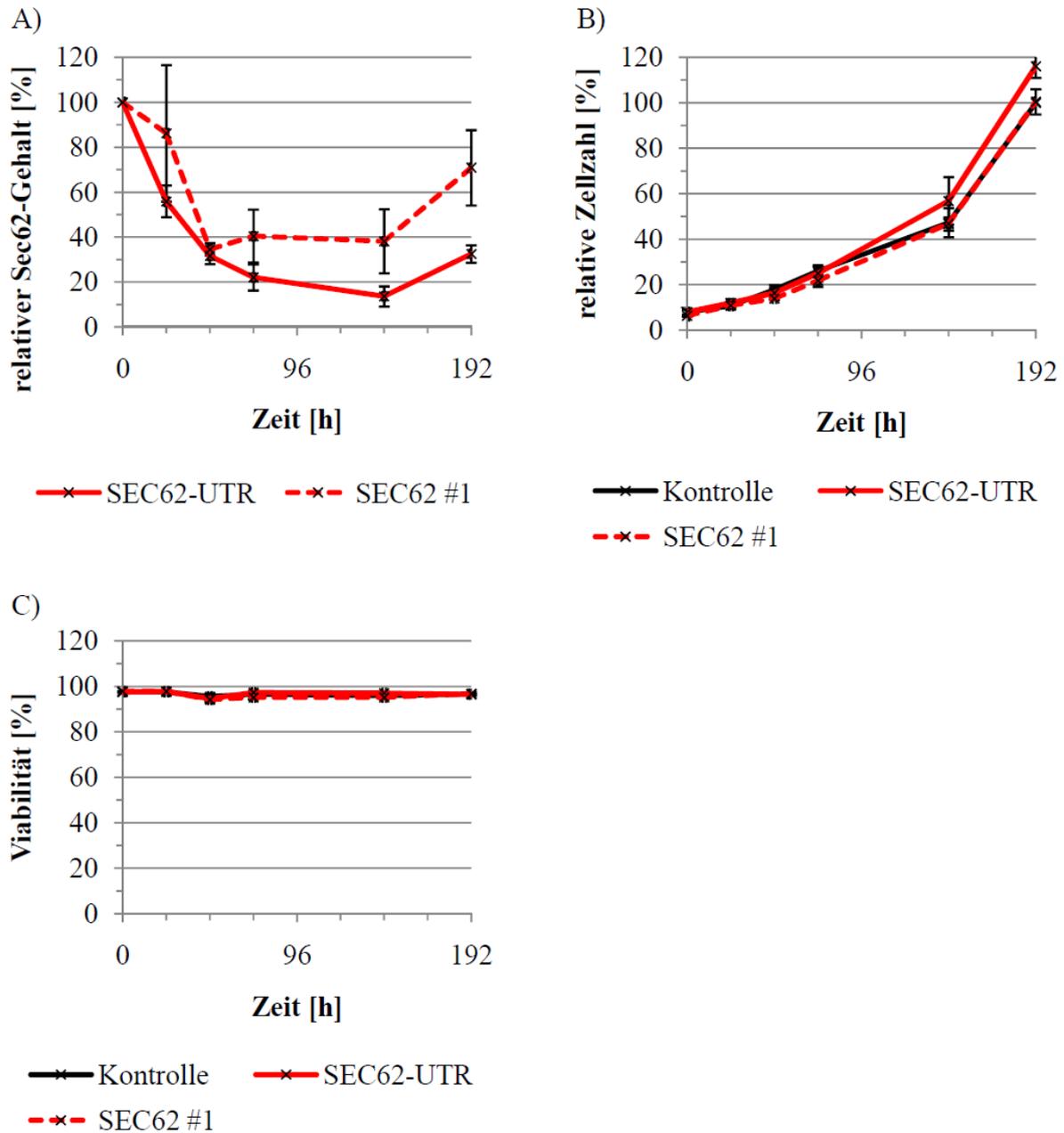


Abbildung 12: Kinetische Analyse der Proliferation und der Viabilität nach siRNA-induzierter Sec62-Depletion in PC3-Zellen über 192 h

PC3-Zellen wurden mit 15 nM SEC62-UTR-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Sobald die Zellen 100 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere Kulturschale umgesetzt, um einen Wachstumsarrest zu vermeiden. Zum jeweiligen Messpunkt wurde der Proteingehalt der Zellen bestimmt (A). Dazu wurden je 200000 Zellen in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Antikörperdekoration und Fluoreszenzscan wurden die Proteinsignale digitalisiert. Nach densitometrischer Auswertung erfolgte die graphische Darstellung der an β -Aktin abgeglichenen und an die Kontrollen normalisierten Proteingehalte. Zudem wurde sowohl die Zellzahl (B) als auch die Viabilität (C) mittels *Countess® automated Cell Counter* ermittelt. Die Zellzahl der Kontrollzellen bei 192 h wurde auf 100 % gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. (Sec62-UTR-siRNA: n= 5 (aus drei Experimenten, eins davon ein Triplikat); SEC62 #1-siRNA: n= 3 (ein biologisches Triplikat aus einem Experiment))

Im nächsten Schritt wurde daher getestet, ob es möglich ist, die humanen Zellen unter regelmäßiger SEC62-siRNA-Behandlung in Kultur zu halten. Dazu wurden in einer 192stündigen Kinetik erneut die

Zellzahlen und die Viabilitäten gemessen. Außerdem wurde zu jedem Messzeitpunkt auch der Proteingehalt bestimmt, um sicher zu gehen, dass Sec62 über den gesamten Zeitrahmen effizient reduziert war.

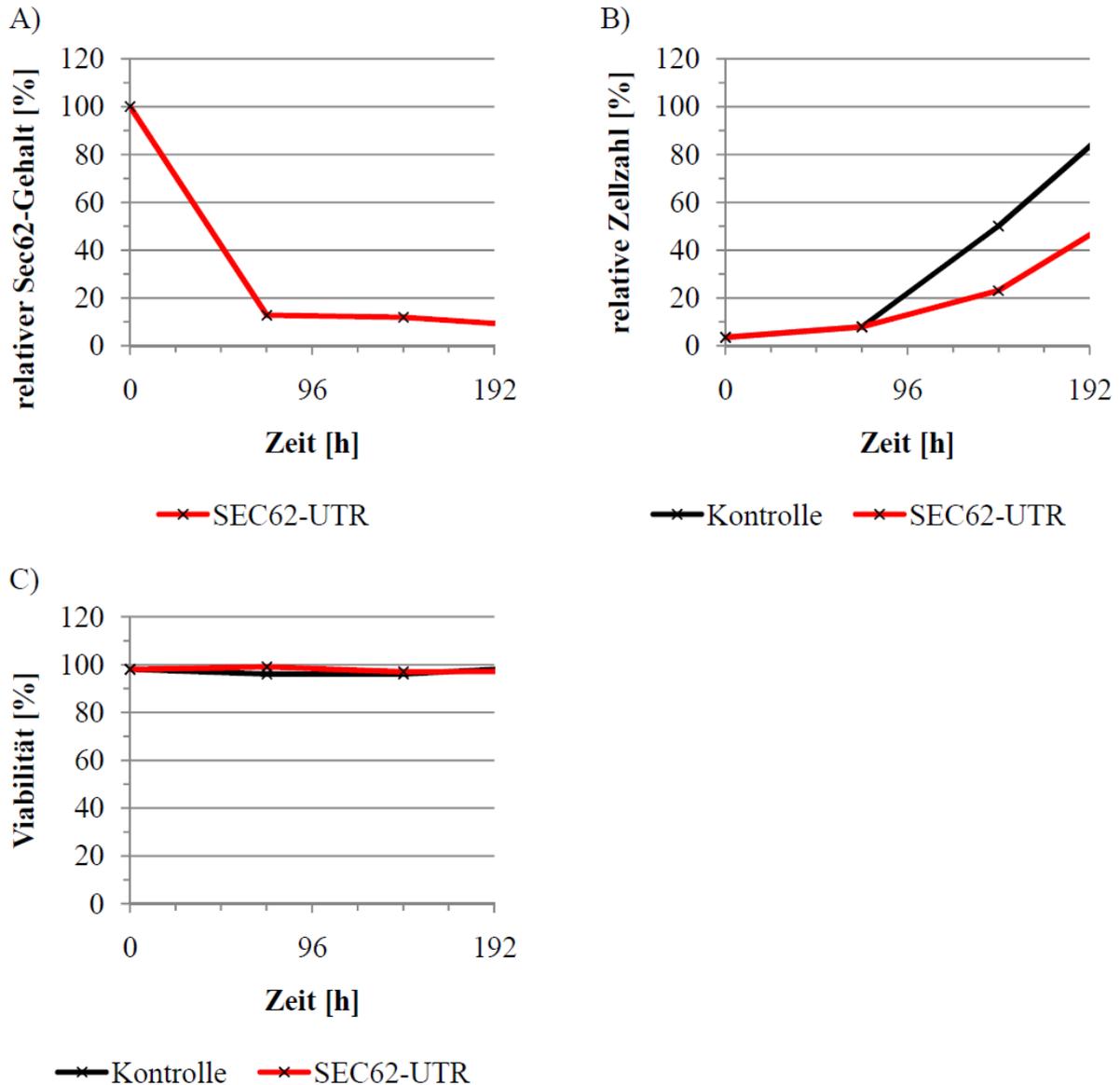


Abbildung 13: Kinetische Analyse der Proliferation und der Viabilität nach siRNA-induzierter Sec62-Depletion von PC3-Zellen über 192 h mit Nachtransfektion

PC3-Zellen wurden mit 15 nM SEC62-UTR-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Nach 24 h und nach 96 h wurden die Zellen nochmals mit siRNAs nachtransfiziert. Sobald die Zellen 100 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere Kulturschale umgesetzt, um einen Wachstumsarrest zu vermeiden. Zum jeweiligen Messpunkt wurde der Proteingehalt der Zellen bestimmt (A). Dazu wurden je 200000 Zellen in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Antikörperdekorierung und Fluoreszenzscan wurden die Proteinsignale digitalisiert. Nach densitometrischer Auswertung erfolgte die graphische Darstellung der an β -Aktin abgeglichenen und an die Kontrollen normalisierten Proteingehalte. Zudem wurde sowohl die Zellzahl (B) als auch die Viabilität (C) mittels *Countess® automated Cell Counter* ermittelt (C). Die Zellzahl der Kontrollzellen bei 192 h wurde auf 100 % gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen. (n= 1)

Das Ergebnis der Kinetik für PC3-Zellen (n= 1) ist in Abbildung 13 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass innerhalb von 72 h die SEC62-siRNA-Behandlung eine Sec62 Proteinreduktion auf weniger als 20 % zur Folge hat (A). Im Gegensatz zur Abbildung 12 bleibt der Proteingehalt stetig unter 20 % im Vergleich zur Kontrolle. Es stellt sich nun also die Frage, ob die Proliferation (B) oder die Viabilität (C) unter der Sec62-Reduktion gelitten haben. Während den ersten 48 h der SEC62-siRNA-Behandlung ist kein Unterschied im Wachstum zu erkennen. Danach ist die Proliferation der Sec62-depletierten PC3-Zellen leicht reduziert. Dennoch ist eindeutiges Wachstum zu erkennen. Im Falle der Viabilität ist kein Unterschied zwischen depletierten Zellen und Kontrollzellen zu erkennen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass dieser Versuch in PC3-Zellen nur einmalig durchgeführt wurde.

IV.2.2. Proteomanalyse mittels 2D-DIGE nach RNAi-vermittelter Sec62-Depletion

Nachdem festgestellt wurde, dass eine Stilllegung des SEC62-Gens und die damit einhergehende Sec62-Depletion keine Auswirkung auf die Viabilität von PC3-Zellen hatte, erfolgte nach solch einer Langzeitdepletion eine 2D-DIGE-Analyse. Dadurch sollten Proteine identifiziert werden, die nach Sec62-Depletion verringert in der Zelle vorliegen und somit einen Sec62-abhängige Transport in das ER besitzen könnten.

Um dieser Frage per 2D-DIGE nachzugehen, wurde in PC3-Zellen über 240 h unter regelmäßiger Nachtransfektion mit SEC62-UTR-siRNA das SEC62-Gen stillgelegt und kontinuierlich die Effizienz der Depletion per Westernblot-Analyse kontrolliert. Nach 240 h wurden die Zellen von sechs biologischen Replikaten geerntet und ebenfalls per Westernblot-Analyse auf den Sec62-Proteingehalt getestet (siehe Abbildung 14). Anschließend wurden die Gele so geplant, dass die SEC62-siRNA manipulierte Probe im Durchschnitt 9 % des Sec62-Gehalts der zu vergleichenden Kontrollprobe besaß (siehe Tabelle 48).

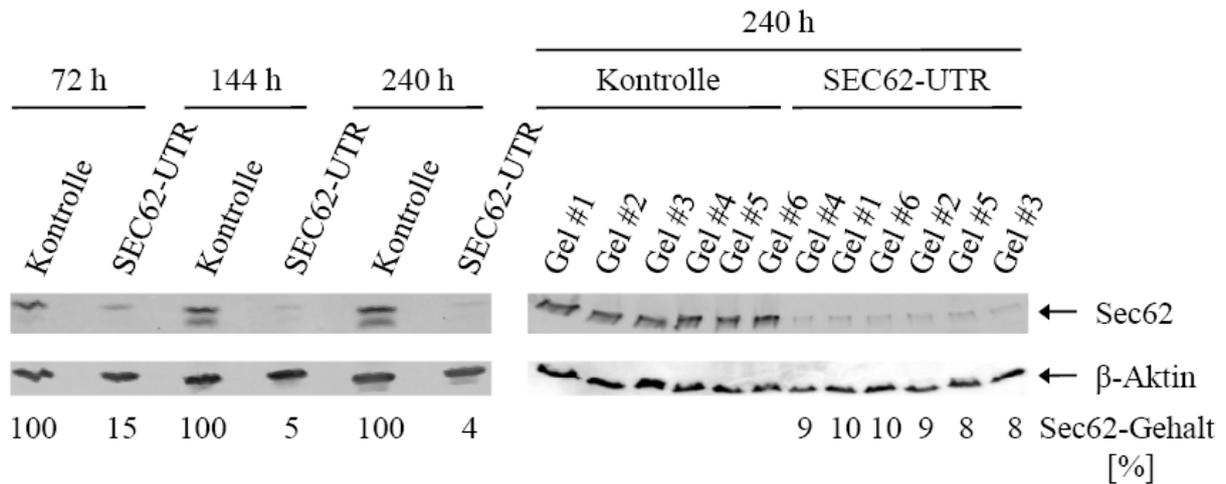


Abbildung 14: Westernblot-Analyse der Zeitkinetik und des Erntezeitpunkts als Kontrolle einer effizienten RNAi für die Proben der 2D-DIGE-Analyse

PC3-Zellen wurden mit 15 nM SEC62-UTR-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und über einen Zeitraum von 240 h kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Probenpaar, bestehend aus Sec62-depletierten und Kontrollzellen, geerntet und auf seinen Sec62-Proteingehalt getestet. Zum Endzeitpunkt wurden zusätzlich sechs Probenpaare für die spätere 2D-DIGE-Analyse geerntet. Von diesen Proben wurden ebenfalls je 200000 Zellen für die Bestimmung des Sec62-Gehalts verwendet.

Tabelle 48: Übersicht über den Aufbau des 2D-DIGE-Experiments

Dargestellt sind die Zuordnungen von Kontrollprobe und siRNA-manipulierten Proben zu den entsprechenden Gelen und die Art ihrer Fluoreszenzmarkierung. Außerdem ist zu erkennen, dass Gel #5 als präparatives Gel diente und somit neben dem Fluoreszenz-markierten Proben zusätzlich 118 μ g unmarkiertes Protein enthielt.

Gelnummer	Kontroll-siRNA		SEC62-UTR-siRNA		Standard Farbstoff
	Probennummer	Farbstoff	Probennummer	Farbstoff	
Gel #1	#1		#2		
Gel #2	#2	Cy3	#4	Cy5	
Gel #3	#3		#6		
Gel #4	#4		#1		Cy2
Gel #5 (präparativ)	#5	Cy5	#5	Cy3	
Gel #6	#6		#3		

Nach Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und dem Digitalisieren der Gele mittels Fluoreszenzscan in den drei Fluoreszenzkanälen, zeigte sich eine gute Auftrennung der Proteine. Gel #6 enthielt mit 2713 detektierten Fluoreszenzsignalen die wenigsten Proteine. Nach dem Übereinanderlegen der einzelnen Scans durch die Software (*matchen*) wurden 1147 dieser Proteine auf dem Gel #5, das als Gel mit den meisten Fluoreszenzsignalen automatisch als *master*-Gel festgelegt wurde, wiedergefunden. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test mittels der Software DeCyderTM 2D 6.5 von GE Healthcare durchgeführt. Ein Protein wurde nur dann als signifikant reguliert, und damit als potentiell Sec62-abhängig, angesehen, wenn es folgende Kriterien erfüllte: Es musste in 15 von 18 Scans, also auf fünf der sechs Gele, zu finden sein, sein durchschnittlicher Gehalt in den siRNA-behandelten Proben musste mindestens 1,5-fach höher/niedriger als in der Kontrolle

sein bei $p < 0,05$ und sein Fluoreszenzsignal sollte eine typische parabolische Form im Fluoreszenzscan besitzen. So wurden insgesamt 15 Proteine als signifikant reguliert definiert. Nur eines dieser Proteine, E1, wurde nach Sec62-Depletion erhöht vorgefunden. Alle anderen Proteine waren in ihrer Menge reduziert. Diese 15 Proteine wurden mit dem ETTAN Spot Picker aus dem präparativen Gel ausgestanzt. Ihre Lage auf dem präparativen Gel und ihre vorläufigen Bezeichnungen sind in Abbildung 15 angegeben. Die berechneten Werte des t-Tests und die Regulation des Proteingehalts bezogen auf die Kontrolle sind Tabelle 49 zu entnehmen.

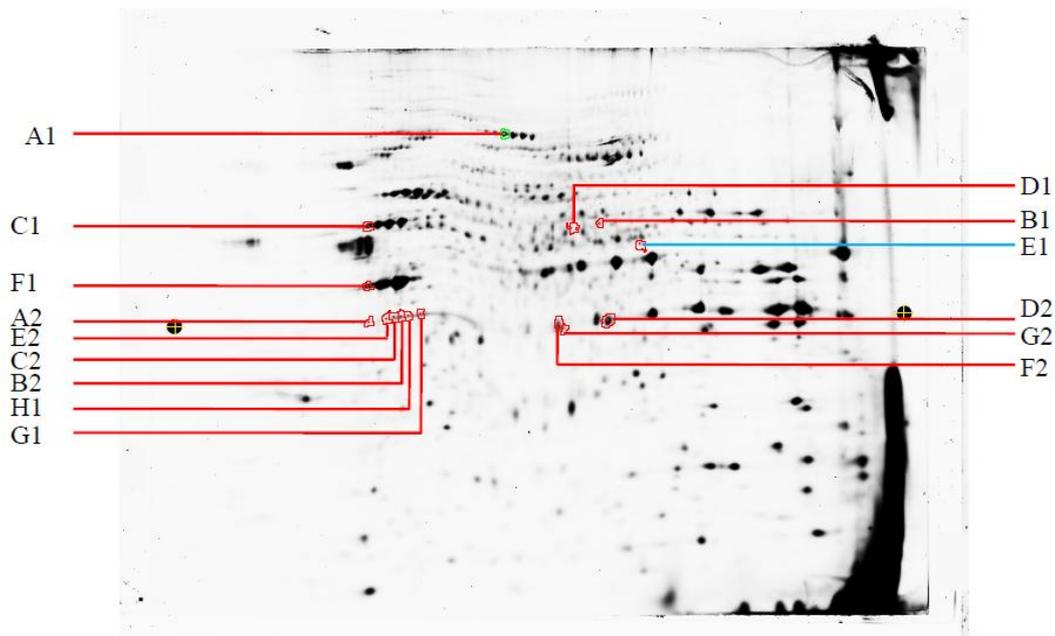


Abbildung 15: Darstellung des präparativen 2D-DIGE-Gels nach dem Fluoreszenzscan und die Lokalisierung der bei Sec62-Mangel als statistisch mindestens 1,5-fach reguliert gefundenen Proteine

Nach 240 stündiger Behandlung der PC3-Zellen mit SEC62-UTR-siRNA bzw. Kontroll-siRNA wurden die Zellen geerntet und nach Fluoreszenzmarkierung der isolierten Proteine per 2D-PAGE nach ihrem pI und ihrer Masse aufgetrennt. Nach statistischer Analyse von sechs biologischen Replikaten wurden 15 Proteine nach Sec62-Depletion mindestens 1,5-fach in ihrer Menge verändert gefunden ($p < 0,05$). Davon waren 14 Proteine in ihrer Menge verringert und eins (E1) erhöht. Als schwarze Punkte mit gelbem Kreuz sind links und rechts auf dem Gel die Referenzpunkte zur Ermittlung der Koordinaten der Proteine zu erkennen. Die Angaben A1 bis F2 entsprechen den Kavitäten einer 96-Well-Platte, in die die jeweiligen Gelstücke mittels Spot-Picker abgelegt wurden.

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden die aus dem präparativen Gel isolierten Proteine an Dr. René P. Zahedi (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften; Dortmund) geschickt. Dr. Zahedi führte für jedes gemessene Spektrum eine Datenbankanalyse durch und erstellte so eine Liste, die für jede Messung die möglichen Kandidatenproteine und dazugehörige Parameter umfasste. Nach Erhalt dieser Datei wurde die letztendliche Zuordnung, welche die Identität des reguliert gefundenen Proteins war, getroffen. Die wichtigsten Anhaltspunkte waren dafür die Masse und der pI, welche mit der Lokalisation des ursprünglichen Spots auf dem präparativen Gel abgeglichen wurden (siehe

Abbildung 15) und der emPAI der Kandidaten (Ishihama *et al.*, 2005). Der emPAI gibt an, in welcher Häufigkeit dieses Protein in dem ausgeschnittenen Gelstück gefunden wurde und folglich, mit welcher Wahrscheinlichkeit, die für das Fluoreszenzsignal beobachtete Regulation tatsächlich auf dieses Protein zurückzuführen ist. Dies ist insofern ein wichtiger Aspekt, da es während der gesamten Prozedur, vom Abbau der 2. Dimension bis zur Analyse der Gelstücke, zu Kontaminationen jener mit unerwünschten Proteinen, z.B. Keratin, kommen kann. Je höher der emPAI eines Proteins, desto häufiger dessen Anteil in dem analysierten Gelstück und desto wahrscheinlicher ist es, dass es sich dabei um das in der 2D-DIGE als reguliert gefundene Protein handelt.

Letztendlich fasst Tabelle 49 die analysierten Proteine mit den nach Auswertung der Datei als wahrscheinlich geltenden Identitäten und die entsprechenden Parameter zusammen. Keines der Proteine war ein Membranprotein, jedoch sind die Proteine EHD1, Annexin A1 und Annexin A2 an Membranen gebunden (Caplan *et al.*, 2002; Evans und Nelsestuen, 1994; Gerke und Moss, 2002; Lin *et al.*, 2001). Die beiden Annexine wurden aber auch im Cytosol gefunden und mit einer Bindung an das Cytoskelett in Verbindung gebracht (Hayes *et al.*, 2004). Coronin-1C und β -Aktin bzw. Vinculin sind Proteine, die am Cytoskelett beteiligt sind (Samarin *et al.*, 2010; Ziegler *et al.*, 2008) bzw. über eine Bindung an das Cytoskelett in der Zelladhäsion involviert sind (Humphries *et al.*, 2007).

IV. ERGEBNISSE

Tabelle 49: Übersicht über die nach der 2D-DIGE-Analyse ausgeschnittenen Proteine, ihre nach Auswertung der Spektren herausgearbeiteten Identitäten inklusive deren Masse und pI

Die 15 in der 2D-DIGE-Analyse als reguliert gefundenen Proteine wurden massenspektrometrisch analysiert. Die nach Datenbankanalyse den Spektren zugeordneten Proteine wurden anhand ihrer Masse und ihrem pI mit dem Gel aus Abbildung 15 verglichen und unter Berücksichtigung ihres emPAIs der wahrscheinlichste Treffer herausgearbeitet.

Vorläufiger Proteinname	Uniprot-Nummer	t-Test	Regulierung	emPAI	Masse [kDa]	pI	Identifiziert als
A1	P18206	0,035	-1,7	27,46	124	5,5	Vinculin
B1	Q9H4M9	0,038	-1,5	6,85	61	6,35	EHD1
C1	P10809	0,013	-1,5	27,55	61	5,7	Mitochondriales Hsp60
D1	P49368	0,027	-1,6	2,91	61	6,1	TCP1-gamma
E1	Q9ULV4	0,0066	1,5	10,35	54	6,65	Coronin-1C
F1	P60709	0,032	-1,7	5,62	42	5,29	β-Aktin
G1	P06748	0,00072	-1,5	0,79	33	4,64	Nucleophosmin
H1		0,0082	-1,7	0,62			
A2		0,0021	-1,8	1,17			
B2		0,031	-1,6	1,17			
C2		0,049	-1,8	1,17			
E2	P07355	0,043	-1,54	0,47	39	7,57	Annexin A2
D2		0,042	-1,53	12,68			
F2	P04083	0,0046	-1,53	2,69	39	6,57	Annexin A1
G2		0,022	-1,83	3,34			

Zielsetzung dieser 2D-DIGE-Analyse war es, Proteine zu identifizieren, die nach Stilllegung des SEC62-Gens reduziert oder erhöht vorlagen. Da für Sec62 eine Funktion im Transport von Proteinen in das ER postuliert wird, waren besonders sekretorische und membranständige Proteine von Interesse. Keines der in Tabelle 49 genannte Proteine erfüllt diese Kriterien. Daher erschien es an diesem Punkt nicht zweckmäßig, weitere 2D-DIGE-Analysen durchzuführen, um die Frage einer Rolle des Sec62-Proteins am Transport in oder über die ER-Membran zu beantworten. Hingegen wurden Regulationen für Proteine des Cytoskeletts gefunden. Diese Schlussfolgerung könnte folglich den publizierten Zusammenhang zwischen Migrations- und Invasionsfähigkeit von PC3- und HEK-Zellen und ihrem Sec62-Proteingehalt erklären (Greiner *et al.*, 2011a). Demnach könnte die Erhöhung der Sec62-Proteinmenge der Tumorzellen von Prostata-, Lungen- und Schilddrüsenkrebspatienten eine Umstrukturierung des Cytoskelltes zur Folge haben, was zur erhöhten Metastasierung dieser Tumorzellen führt.

IV.3. Untersuchungen von Sec62 und SR α in HeLa-Zellen

Kernfrage dieser Arbeit war, ob und wie Sec62 am Proteintransport in das ER beteiligt ist. Um dies zu beantworten, sollte ein Set diverser *in vitro*-Modellsubstrate über die ER-Membran transportiert bzw. in die Membran inseriert und die Translokationseffizienz durch Abspaltung der Signalsequenz (und Glykosylierung des Proteins) betrachtet werden.

Prinzipiell werden die Modellsubstrate bezüglich ihres Transportmechanismus unterschieden. Eine Gruppe ist während ihrer Translokation auf die Bindung des Ribosoms an das ER angewiesen. Dieser Mechanismus wird als cotranslationaler Transport bezeichnet, da die naszierende Kette während der Synthese direkt in das ER transloziert oder in die ER-Membran integriert wird. Die Ansteuerung des Ribosom-naszierende Kette-Komplexes (RNC) zum ER wird durch das SRP und dessen Rezeptor, bestehend aus SR α und SR β vermittelt (*targeting*) (Gilmore *et al.*, 1982; Lipp *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1982; Walter und Blobel, 1981; Walter *et al.*, 1981). Die andere Gruppe an Modellsubstraten wird mit einem ATP-abhängigen Mechanismus in das ER transportiert, der SRP-unabhängig ist (Schlenstedt *et al.*, 1990; Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Wiech *et al.*, 1987; Zimmermann *et al.*, 1990b). Da in diesem Fall das Protein nach seiner Synthese ins Cytosol entlassen und anschließend zum ER dirigiert wird, nennt man diesen Mechanismus posttranslationalen Transport. Durch Transportstudien in Hundepankreas-mikrosomen scheint im Säuger dieser Transportweg für kurze, weniger als 70 Aminosäuren lange Substrate zuzutreffen, da das SRP nicht an die naszierende Kette binden kann, bevor die Synthese beendet ist. Aus *in vitro*-Studien an Hefe-Zellen ist bekannt, dass die posttranslational transportierten Proteine eine Sec62-Abhängigkeit in ihrer Translokation besitzen (Ng *et al.*, 1996; Rothblatt und Meyer, 1986). *In vitro*-Studien über das 64 Aminosäuren lange sekretorische Protein Präprocecropin A (ppcec) demonstrierten, dass es posttranslational in Hundemikrosomen transportiert wird (Zimmermann *et al.*, 1990a). Eine Folgestudie über ppcec ergänzte daraufhin, dass die Anwesenheit des SRP-Rezeptors die Transporteffizienz stimulierte und eine Interaktion von SRP und ppcec konnte beschrieben werden (Schlenstedt *et al.*, 1990). Dies bedeutet, dass ppcec ein Substrat darstellt, das sowohl den co- als auch den posttranslationalen Mechanismus durchlaufen kann. Auch Lakkaraju zeigten, dass manche Proteine, die länger als 120 Aminosäuren sind, vom posttranslationalen auf den SRP-abhängigen Transportweg umsteigen können (Lakkaraju *et al.*, 2012). Wenn nun versucht wird, eine direkte Beteiligung des Sec62-Proteins an der Biogenese eines möglichen Substrats nachzuweisen, könnte dieses folglich auf den SRP-abhängigen Weg ausweichen und die Sec62-Abhängigkeit verschleiert werden. Während in *in vitro*-Transportstudien künstlich posttranslationale Bedingungen erzwungen werden können, indem das Substrat erst nach Beendigung der Synthese zu den ER-Membranen (z.B. raue Hundemikrosomen oder semipermeabilisierten Zellen) hinzugegeben wird, können in Zellkulturversuchen posttranslationale Bedingungen nur durch Inhibierung des cotranslationalen Transports herbeigeführt

werden. Besonders für Zellkulturversuche, bei denen angestrebt wird, ein Substrat per Plasmid zu exprimieren und dessen Prozessierung oder Sekretion per Westerblot und Immundetektion zu untersuchen, ist dementsprechend eine Strategie nötig, um die Sec62-Abhängigkeit zu demaskieren. Es entstand die Idee, mittels RNAi Sec62 oder SR α allein bzw. Sec62 und SR α kombiniert zu depletieren. Nachdem diese Strategie auf dem Papier entwickelt worden war, galt es, sie auch praktisch umzusetzen. Da für die Transportstudien ein etabliertes System zur Verfügung stand, bei dem die radioaktiv-markierten Modellsubstrate mit permeabilisierten HeLa-Zellen inkubiert werden, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem in HeLa-Zellen das SR α -Gen stillgelegt bzw. bei dem zeitgleich auch das SEC62-Gen ausgeschaltet werden kann. Dazu wurden die Zellen gleichzeitig mit 15 nM SEC62 #1-siRNA und 15 nM SR α #2-siRNA oder SR α -UTR-siRNA transfiziert.

Es stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob Sec62 und SR α in HeLa-Zellen essentiell sind. Gleichzeitig wurde analysiert, welche Auswirkungen eine zeitgleiche Depletion beider Proteine auf die Zelle hat. Analog zu der Kinetik in PC3 (siehe Abbildung 13) wurden daher über 192 h die Zellzahlen und Viabilitäten bestimmt und der Proteingehalt der Zellen densitometrisch ermittelt.

IV.3.1. Kinetik nach siRNA-vermittelter Proteindepletion von Sec62 und/oder SR α

Abbildung 16 fasst die relativen Proteinniveaus nach PTGS mit den jeweiligen siRNAs zusammen. Die dazugehörigen Zellzahlen und Viabilitäten sind Abbildung 17 zu entnehmen. Betrachtet man in Abbildung 16 A den Proteingehalt nach Transfektion mit SEC62-siRNA, ist erkennbar, dass die Sec62-Menge nach Einsatz der SEC62 #1-siRNA innerhalb der ersten 96 h auf 12 % reduziert wurde. Nach 144 h erreichte die Proteinmenge mit 14 % ihr Maximum und fiel nach insgesamt 192 h auf 10 % ab. Wurde die SEC62-UTR-siRNA eingesetzt, wurde ein ähnliches Ergebnis erreicht. Nach 96 h war der Proteinlevel auf 10 % reduziert, fiel in den nächsten 48 h weiter auf 8 % ab und erreichte nach insgesamt 192 h PTGS mit 18 % Sec62-Proteinmenge ihr Maximum. Folglich konnte der Sec62-Proteingehalt bei regelmäßiger Transfektion mit SEC62-siRNAs konstant auf weniger als 20 % reduziert werden.

Teilabbildung B gibt die Proteinlevel nach Transfektion mit SR α -siRNAs wieder. Im Falle einer PTGS durch SR α #1-siRNA sank der SR α -Proteingehalt innerhalb von 96 h auf 9 %, stieg nach 144 h auf das Maximum von 10 % und fiel nach 192 h auf 6 %. Für die SR α #2-siRNA und die SR α -UTR-siRNA war das Ergebnis ähnlich, daher sollen nur die durch sie bewirkten Maxima an restlichem SR α -Protein genannt werden. Nachdem die SR α #2-siRNA eingesetzt wurde, erreichte der SR α -Gehalt sein Maximum von 22 % nach 192 h. Wurden die Zellen mit SR α -UTR-siRNA transfiziert, betrug die restliche Proteinmenge maximal 17 % (192 h).

Wie verhält sich das Proteinniveau nun, wenn man die Zellen gleichzeitig mit je 15 nM SEC62-siRNA und SR α -siRNA transfiziert? Teilabbildung C zeigt den Verlauf des Sec62-Proteingehalts bei gleichzeitiger RNAi gegen SR α und Sec62. Er ist ähnlich dem nach alleiniger PTGS gegen Sec62. Sofern die SEC62 #1-siRNA in Kombination mit der SR α #1-siRNA eingesetzt wurde, betrug der Sec62-Gehalt nach 96 h und 144 h 17% und stieg zum Endpunkt von 192 h auf 36 % an. Wenn die SEC62 #1-siRNA mit der SR α -UTR-siRNA kombiniert wurde, verlief der Sec62-Wert von 20 % (96 h) über 16 % (144 h) auf ebenfalls 36 % (192 h). Der SR α -Gehalt nach gleichzeitiger Transfektion mit SR α -siRNA und SEC62-siRNA ist in Teilabbildung D dargestellt. Die Kombination der SR α #1-siRNA mit der SEC62 #1-siRNA führte nach 96 h zu einer Reduktion des SR α -Gehalts auf 15 %. In den nächsten 48 h fiel er auf 3 % ab und stieg nach insgesamt 192 h auf das Maximum von 30 % an. Setzte man stattdessen die SR α -UTR-siRNA in Kombination mit der SEC62 #1-siRNA ein, sank das Proteinniveau innerhalb von 96 h auf 13 %, stieg nach 144 h auf das Maximum von 20 % an und fiel wiederum auf 15 % ab.

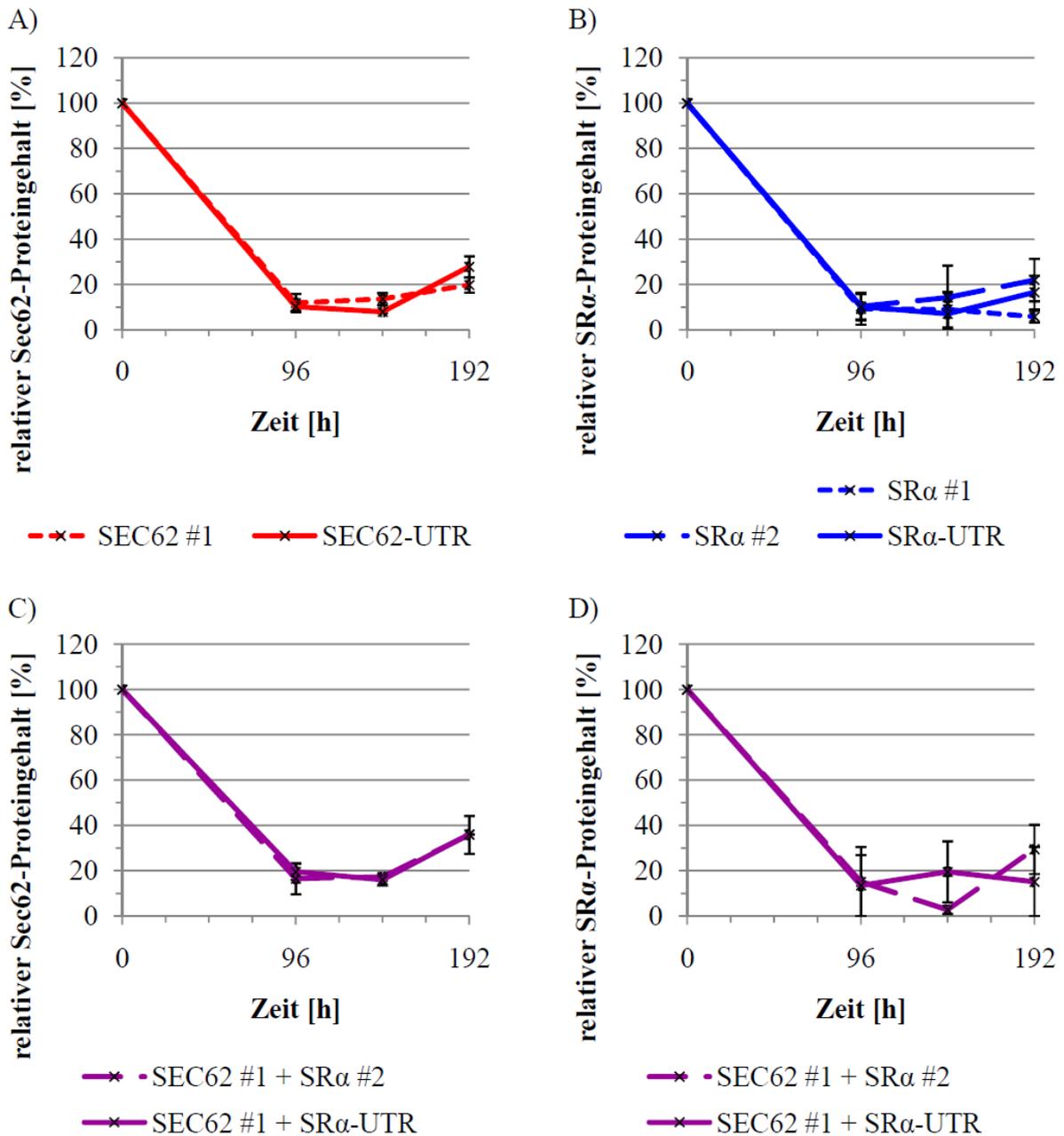


Abbildung 16: Kinetische Westernblot-Analyse der siRNA-induzierten Sec62- und/oder SRα- Depletion von HeLa-Zellen über 192 h mit regelmäßiger Nachtransfektion

HeLa-Zellen wurden mit 15 nM siRNA gegen Sec62 und/oder SRα oder Kontroll-siRNA behandelt. Sobald die Zellen 100 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere Kulturschale umgesetzt, um einen Wachstumsarrest zu vermeiden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und in Laemmli-Puffer lysiert. Zur Bestimmung des Sec62-Gehalts wurden 200000 Zellen auf ein SDS-Gel aufgetragen, für die Bestimmung des SRα-Gehalts 300000 Zellen. Die Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Antikörperdekorierung gegen Sec62 (A und C) bzw. gegen SRα (B und D) und Fluoreszenzscan wurden die Proteinsignale digitalisiert. Nach densitometrischer Auswertung erfolgte die graphische Darstellung der an β -Aktin abgeglichenen und an die Kontrollen normalisierten Proteingehalte. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Die Ergebnisse der kombinierten siRNA-Strategie sind zur besseren Übersicht in unterschiedlichen Graphen dargestellt, auch wenn die Daten aus identischen Experimenten gewonnen wurden. C) gibt den relativen Sec62-Gehalt und D) den relativen SRα-Gehalt in Abhängigkeit von der jeweiligen RNAi-Strategie an. (SEC62 #1-siRNA: n= 6 (aus vier Experimenten, eines davon ein biologisches Triplikat); SEC62-UTR-siRNA: n= 3 (aus drei Experimenten); SRα #1: 96 h: n=3; Rest: n=4 (aus drei Experimenten, eines davon als Duplikat); SRα #2-siRNA: 144 h: n= 6; Rest:

IV. ERGEBNISSE

n= 7 (aus vier Experimenten, teils als biologische Duplikate und Triplikate); SR α -UTR-siRNA: 196 h: n= 6; Rest: n=7 (aus vier Experimenten, teils als biologische Duplikate und Triplikate); SEC62-UTR-siRNA + SR α #2-siRNA: n= 3; SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA: 96 h und 144 h: n=3; 192 h: n=2 (aus biologischen Triplikaten/Duplikaten eines Experiments); BIP-UTR-siRNA: n= 3 (biologisches Triplikat eines Experiments))

Nachdem bekannt war, dass die Proteindepletion sowohl in der einzelnen siRNA-Strategie als auch bei Kombination der siRNAs effizient ist und der Restproteingehalt von 20 % nur nach 192 h bei Kombination der siRNAs überschritt, stellt sich die Frage, wie es sich mit den Zellzahlen und der mit dem *Countess® automated Cell Counter* ermittelten Viabilitäten in der 192stündigen Kinetik verhält. Es wurde analysiert, ob ein gleichzeitiges Defizit von SR α und Sec62 über einen solch langen Zeitraum das Zellwachstum oder die Viabilität negativ beeinflusst, da diese Proteine einen erwiesenen (Lauffer *et al.*, 1985; Walter *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 2009) bzw. aus Homologiestudien in anderen Organismen postulierten Beitrag (Beckerich *et al.*, 1998; Deshaies *et al.*, 1991; Deshaies und Schekman, 1989; Deshaies und Schekman, 1990; Ng *et al.*, 1996; Noel und Cartwright, 1994; Panzner *et al.*, 1995) zur Proteinsynthese in Säugerzellen liefern und daher eine gravierende Beeinträchtigung der Proteinbiogenese denkbar wäre. Abbildung 17 gibt die entsprechenden Daten zu den Experimenten von Abbildung 16 wieder. Die Zellzahl wurde dabei zu jedem Messzeitpunkt als prozentualer Anteil der Kontrollzellzahl nach 192 h angegeben. Als Beispiel für ein essentielles Gen wurde zusätzlich BiP durch siRNA-Behandlung in seiner Proteinmenge reduziert. BiP ist in der Hefe als essentielles Gen beschrieben (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989) und auch in HeLa-Zellen wurde bereits gezeigt, dass es nach 48stündiger BiP-Depletion zu einem Proliferationsarrest kommt und die Zellzahl teils sogar abnimmt (Schäuble *et al.*, 2012).

Wie in Abbildung 17A dargestellt, wuchsen die Sec62-depletierten Zellen weniger stark als die Kontrollzellen. In den anfänglichen 96 h war dieser Proliferationsarrest nicht sehr ausgeprägt. Während die Kontrolle zu diesem Zeitpunkt 23 % ihrer finalen Zellzahl erreichte, betrug die prozentuale Zellzahl der Sec62-depletierten Zellen 14 %, unabhängig von der eingesetzten SEC62-siRNA. Je länger die Kinetik dauerte, desto deutlicher wurde jedoch der Proliferationsarrest. Nach 192 h betrug die Zellzahl nach Transfektion der HeLa-Zellen mit SEC62 #1-siRNA nur noch 44 % und nach Transfektion mit SEC62-UTR-siRNA 42 % verglichen mit dem 192 h-Wert der Kontrolle. Die Viabilitäten blieben trotz Sec62-Depletion stabil (Abbildung 17 B). Unabhängig von der Zellmanipulation lag sie zwischen 77 % und 97 %. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass Sec62 in HeLa-Zellen zwar nicht essentiell ist, aber durchaus einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum hat. Dies stimmt mit dem Ergebnis aus der Sec62-Depletionskinetik in PC3-Zellen überein (Abbildung 13). Dort wurde ebenfalls festgestellt, dass die Proliferation reduziert war, wenn die Zellen ein Defizit an Sec62 aufwiesen (ca. 50 % der Endzellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen nach Sec62-Depletion). Wenn man nun die Kinetik bei einem Mangel an BiP betrachtet, wird deutlich, dass Sec62 in HeLa-Zellen nicht essentiell ist oder der Rest des Sec62-Proteins für ein Überleben der Zelle ausreicht (Abbildung 17A). Während nach 72 h kaum ein

Unterschied zwischen der Zellzahl zwischen Kontrolle und BiP-Depletion zu erkennen ist (17 % zu 11 % der finalen Zellzahl der Kontrolle) erhöhte sich die Zellzahl der Kontrolle nach 144 h auf 42 %, während die BiP-depletierten Zellen in ihrer Menge auf 2 % abnahmen. Zum Endzeitpunkt konnten sogar nur noch 1 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle geerntet werden. Auf den ersten Blick mag die Bestimmung der Viabilität mittels des *Countess® automated Cell Counter* widersprüchlich zu diesen Daten sein (Abbildung 17 B). Nach 72 h ist wie auch in der Proliferation kein Unterschied zwischen den Viabilitäten der Kontrolle und BiP-depletierten Zellen zu erkennen. Aber auch danach fällt die Lebendzellzahl auf maximal 77 % ab. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nach BiP-Depletion kaum noch Zellen geerntet werden konnten. Eben diese waren möglicherweise von der siRNA-Behandlung nicht betroffen. Dadurch wird das Verhältnis von toten Zellen zur Gesamtzellzahl fälschlicherweise nach unten verschoben. Folglich ist für die Beantwortung der Frage, ob ein Gen essentiell ist, die Bestimmung der Viabilität mit dem *Countess® automated Cell Counter* suboptimal. Daher wurde die Viabilität zusätzlich mit einer anderen Methode analysiert (Abbildung 18): das selektive Anfärben toter Zellen mit dem Nuclear-IDTM-Reagenz. Die Messung der Zellzahl stellt dementsprechend das aussagekräftigste Kriterium dar, wenn analysiert werden soll, ob ein Gen essentiell ist oder nicht.

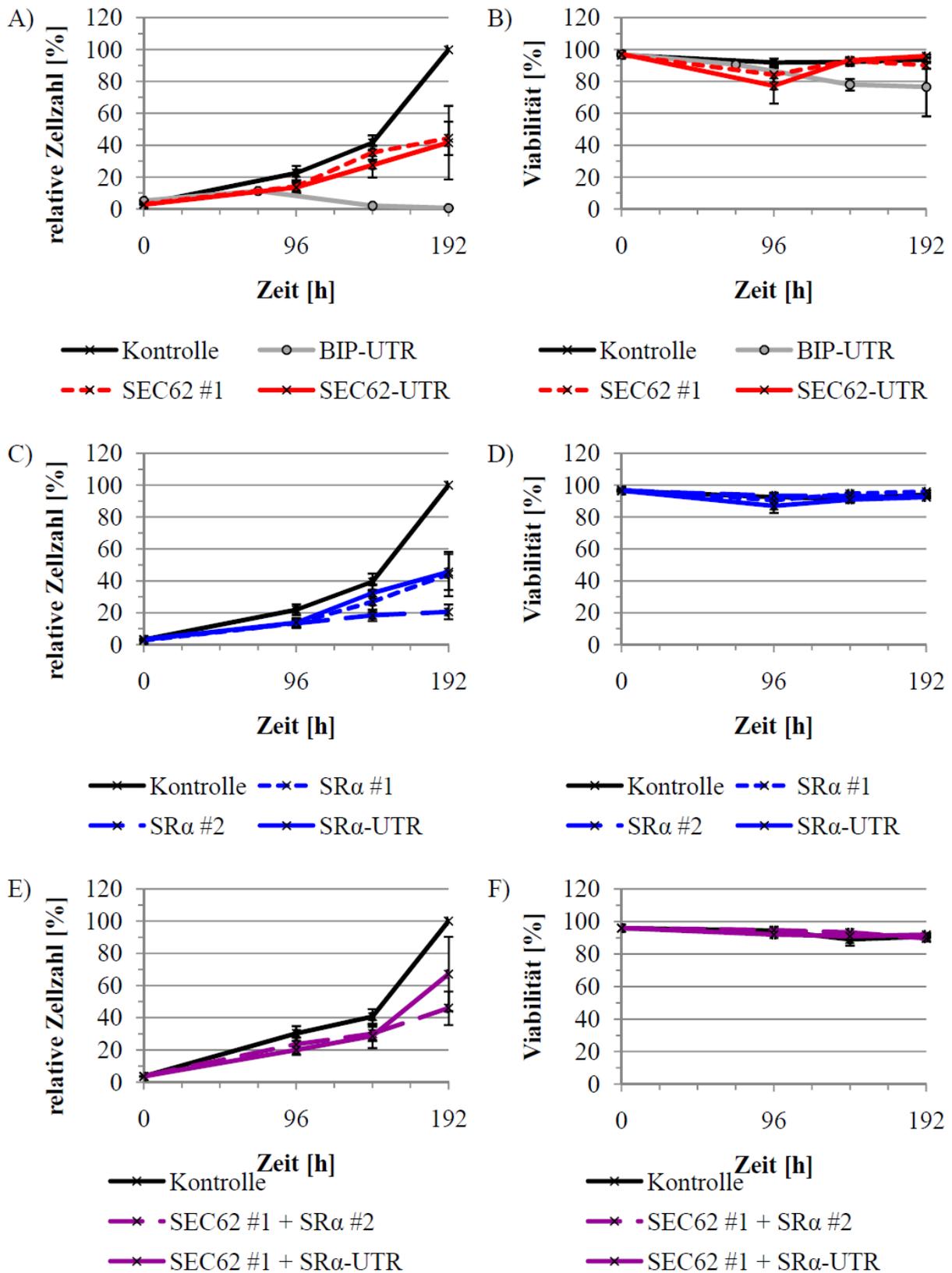


Abbildung 17: Kinetische Analyse der Proliferation und der Viabilität nach siRNA-induzierter Sec62- und/oder SRα- Depletion von HeLa-Zellen über 192 h mit regelmäßiger Nachtransfektion
 HeLa-Zellen wurden mit 15 nM SEC62-siRNA und/oder SRα-siRNA bzw. Kontroll-siRNA oder 35 nM BIP-UTR-siRNA behandelt. Sobald die Zellen 100 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere

Kulturschale umgesetzt, um einen Wachstumsarrest zu vermeiden. Zum jeweiligen Messpunkt wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl (A, C und D) und die Viabilität (B, D, und F) unter Verwendung des *Countess® automated Cell Counter* gemessen. Die Zellzahl der Kontrollzellen bei 192 wurde 100 % gesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler aus biologischen Replikaten (SEC62 #1-siRNA: n= 6 (aus vier Experimenten, eines davon ein biologisches Triplikate); SEC62-UTR-siRNA: n= 3 (aus drei Experimenten); SR α #1: 96 h: n=3; Rest: n=4 (aus drei Experimenten, eines davon teils als Duplikat); SR α #2-siRNA: 144 h: n= 6; Rest: n= 7 (aus vier Experimenten, teils als biologische Duplikate und Triplikate); SR α -UTR-siRNA: 196 h: n= 6; Rest: n=7 (aus vier Experimenten, teils als biologische Duplikate und Triplikate); SEC62-UTR-siRNA + SR α #2-siRNA: n= 3; SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA: 96 h und 144 h: n=3; 192 h: n=2 (aus biologischen Triplikaten/Duplikaten eines Experiments); BIP-UTR-siRNA: n= 3 (biologisches Triplikate eines Experiments)). Die dazugehörigen Proteinmengen sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

Die Depletion von SR α führte zu einem vergleichbaren Proliferationsarrest wie die Entfernung von Sec62 (siehe Abbildung 17C). Nach 96 h beträgt die Zellzahl der SR α -depletierten Zellen 13 % (SR α #1-siRNA und SR α #2-siRNA) bzw. 14 % (SR α -UTR-siRNA) im Vergleich zur Kontrolle mit 22 % ihrer Endzellzahl. Nach 192 h konnten im Falle der SR α #1-siRNA und der SR α -UTR-siRNA ca. 45 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle geerntet werden. Die SR α #2-siRNA hat einen stärkeren Einfluss auf die Zellteilung. Nach 192 h erhöhte sich die Menge an geernteten Zellen lediglich auf 21 %. Da dieser Effekt mit der SR α #1-siRNA und der SR α -UTR-siRNA nicht so stark ausgeprägt war, scheint dies in seiner Stärke für die SR α #2-siRNA spezifisch aufzutreten und nicht generell mit einer SR α -Depletion verknüpft zu sein. Die mit dem *Countess® automated Cell Counter* gemessenen Viabilitäten schwankten zwischen 87 % (96 h; SR α -UTR-siRNA) und 97 % (0 h; Tag des Aussäens und der ersten Transfektion) (siehe Abbildung 17 D). Unter Berücksichtigung aller Daten lässt sich schließen, dass SR α in HeLa-Zellen nicht essentiell ist, aber wie Sec62 eine positive Wirkung auf die Proliferation hat.

Die Depletion beider Proteine hatte keine weitere Auswirkung auf die Zellteilung oder die Viabilität. So konnten nach insgesamt 192stündiger Behandlung der HeLa-Zellen mit SEC62 #1-siRNA und SR α #2-siRNA noch 46 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle geerntet werden und bei einer Transfektion mit SEC62 #1-siRNA und SR α -UTR-siRNA wurde eine Zellzahl von 67 % im Vergleich zur Kontrolle erreicht (siehe Abbildung 17 E). Die Viabilitäten betragen 89 % (144 h; Kontrolle) bis 96 % (0 h; Tag des Aussäens und der ersten Transfektion) (siehe Abbildung 17 F).

Diese Daten demonstrieren, dass sich die Zellen nach siRNA-basierter alleiniger oder gleichzeitiger Reduktion von Sec62 und SR α langsamer teilten. Vergleiche mit dem Zellwachstum nach Reduktion des essentiellen Proteins BiP, wird deutlich, dass vermutlich weder Sec62 noch SR α in HeLa-Zellen essentielle Proteine sind.

IV.3.1.1. Zusätzliche Untersuchung der Viabilität nach RNAi-vermittelter Sec62-Depletion mit Nuclear-ID™-Reagenz

Da sich das System des *Countess® automated Cell Counter* zur Bestimmung der Zellviabilität als suboptimal erwies, sollte unter Verwendung des Nuclear-ID™-Reagenz bestätigt werden, dass Sec62 in HeLa-Zellen nicht essentiell ist. Als Positivkontrolle für ein essentielles Protein diene erneut das Chaperon BiP. Nach Inkubation der Zellen mit Nuclear-ID™-Reagenz werden tote Zellen in der Begutachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop grün dargestellt. Durch DAPI-Färbung der Kerne sind alle Zellen blau dargestellt. Das Verhältnis der beiden Zahlen zueinander liefert letztendlich die Viabilität. Abbildung 18 zeigt, dass nach 192stündiger Depletion von Sec62 kein Unterschied in der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle auftritt (85 ± 0 % bzw. 89 ± 5 % und 84 ± 5 % (n=2; technische Replikate)). Nach Depletion von BiP fällt die Viabilität auf 19 %. Die Mikroskopie-Bildern veranschaulichen ebenfalls, dass nach BiP-Depletion weniger Zellen vorhanden waren, was die verringerte Zellzahl aus Abbildung 17 A bestätigt.

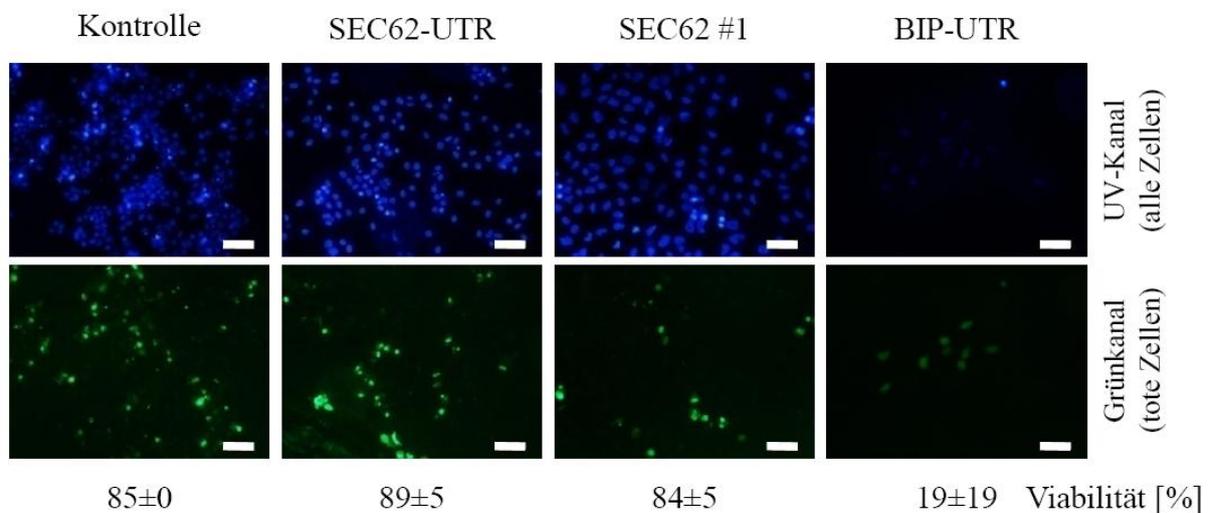


Abbildung 18: Analyse der Viabilität mittels Nuclear-ID™-Reagenz zum Zeitpunkt 192stündiger Sec62-Depletion der HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit 15 nM SEC62-UTR-siRNA, 35 nM BIP-UTR-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Nach 24 h und nach 96 h wurden die Zellen nochmals mit siRNAs nachtransfiziert. Sobald die Zellen 100%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere Kulturschale umgesetzt, um einen Wachstumsarrest zu vermeiden. Nach insgesamt 192stündiger RNAi wurden die Deckgläser in eine Nuclear-ID™-Reagenz enthaltende PBS-Lösung (Endkonzentration 1 μ M) überführt, 30 min inkubiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mit DAPI-Filter (UV-Kanal) und mit GFP-Filter (Grün-Kanal) (Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0,45-Objektiv). Es wurde die Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Zellkerne) und die Zahl der toten Zellen (Grüne-Signale) bestimmt. Die Viabilitäten ($(1 - (\sum_{tot} / \sum_{gesamt}) \times 100)$), welche aus jeweils zwei mikroskopischen Aufnahmen eines Experiments stammen, wurden gemittelt. Weiße Balken entsprechen 50 μ m.

IV.3.1.2. Zusätzliche Untersuchung des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter SR α -Depletion mit dem xCELLigence RTCA System

In Abbildung 17 C wurde bei SR α -Defizit eine verlangsamte Zellteilung auf Grund einer geringeren Menge an geernteten Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Diese Beobachtung sollte daher mit dem xCELLigence RTCA System bestätigt werden. Da in diesem System die Impedanz kontinuierlich bestimmt wird, kann über den durch das Gerät ermittelten dimensionslosen Zellindex das Zellwachstum beobachtet werden. Die Zellen wurden 96 h mit SR α -siRNA bzw. Kontroll-siRNA behandelt, geerntet und anschließend in Triplikaten in die Kavitäten der E-Plate ausgesät. Über weitere 48 h wurde der Zellindex aufgezeichnet und auf die Kontrolle (Kontroll-siRNA + pcDNA3-Neo-IRES-GFP-Plasmid) normalisiert.

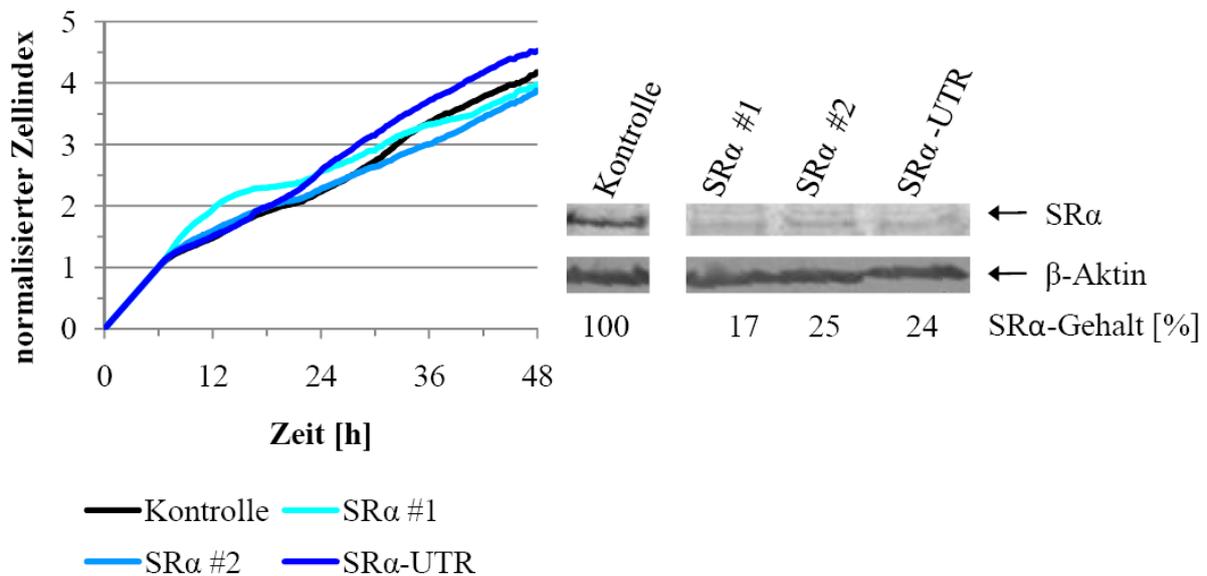


Abbildung 19: Echtzeitanalyse der Auswirkung der SR α -Depletion nach 96 h

HeLa-Zellen wurden 96 h mit 15 nM SR α -siRNA oder 15 nM Kontroll-siRNA und pcDNA3-Neo-IRES-GFP-Plasmid behandelt und geerntet. Davon wurden in Triplikaten je 10000 Zellen in die Kavitäten der 96-Well-E-Plate ausgesät und weitere 48 h kultiviert, um ihr Wachstum zu verfolgen. Die Messung erfolgte alle 15 min. Das Zellindex der depletierten Zellen wurde mittels RTCA 1.2 Software auf den Zellindex der Kontrollzellen normalisiert.

Zu Beginn der Bestimmung des Zellindex betrug der SR α -Proteingehalt nach RNAi 17 % (SR α #1-siRNA) bis 25 % (SR α -UTR-siRNA). Abbildung 19 gibt die Zellindexe der depletierten Zellen normalisiert auf die Kontrollzellen wieder. Der Zellindex stieg mit einer gleichmäßigen Steigung und es war kein Unterschied zwischen dem Verlauf der siRNA-manipulierten Zellen und der Kontrolle zu erkennen.

Wenn man den Anstieg des Zellindex mit dem Zellwachstum einer Zellpopulation gleichsetzt, scheint eine SR α -Depletion keinen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben. Diese Daten stehen demnach in einem gewissen Widerspruch zu den vorherigen Ergebnissen, die nach 96 h eine Zellzahl von 13 %

(SR α #1-siRNA (n= 3) und SR α #2-siRNA (n= 6)) und 14 % (SR α -UTR-siRNA (n= 7)) verglichen zu 22 % der Kontrolle (n= 7) ergaben. Je länger die Kinetik fortschritt, desto deutlicher wurde die Diskrepanz zwischen den Zellpopulationen durch das exponentielle Wachstum der Zellen.

IV.3.2. Proteomanalyse mittels Westernblot nach RNAi-vermittelter Sec62- und/oder SR α -Depletion

Wenn alle bisherigen Daten aus den Analysen der Depletion von Sec62 oder SR α in HeLa-Zellen zusammengefasst werden, zeigt sich, dass weder Sec62 noch SR α essentiell sind bzw. die Zellen mit einem Bruchteil des Normalgehalts des jeweiligen Proteins auszukommen scheinen. Auch ein gleichzeitiger Verlust beider führte zu keinem letalen Phänotyp. Somit ergab sich ein Zeitfenster von 96 h bis 144 h, während dem mittels RNAi das Protein von Interesse effizient aus den Zellen entfernt werden kann. Um eine erneute Transfektion zu umgehen, wurden die folgenden Versuche (Proteomanalysen und Transportstudien) daher nach 96stündiger PTGS durchgeführt.

IV.3.2.1. Proteomanalyse nach Sec62-Depletion

Eine Publikation von Lang et. al zeigte, dass nach siRNA-vermittelter Sec61 α -Depletion auch ein Rückgang an Sec61 β und Sec61 γ beobachtet wurde (Lang *et al.*, 2012). Dies bedeutet, dass durch das Fehlen einer Komponente des Sec61-Komplexes dieser destabilisiert und abgebaut wurde. Bedenkt man den Umstand, dass Sec62 mit dem Sec61-Komplex assoziiert vorliegt und rund ein Drittel aller genomisch kodierten Proteine im Laufe ihrer Biogenese die ER-Proteintranslokase passieren müssen (Kaufman, 1999), wurde daher die Auswirkung einer Sec62-Depletion auf andere Proteine, die in der generellen Proteinbiogenese beteiligt sind, analysiert. Damit sollte sichergestellt werden, dass nach Sec62-Depletion auftretende Phänotypen tatsächlich durch ein Fehlen von Sec62 verursacht werden und nicht auf sekundäre Effekte, z.B. eine Destabilisierung und damit einhergehende Fehlfunktion der Translokase, zurückzuführen sind. Daher wurde nach 96stündiger RNAi die Zellen geerntet, per SDS-PAGE aufgetrennt und die Proben per Westernblot-Analyse und Antikörperdekoratation quantitativ auf Proteine des Ribosoms (Proteinsynthese), der Ansteuerung des ERs durch den RNC (*targeting*), der Translokation und der zellulären Antwort auf fehlgefaltete Proteine (*unfolded protein response*, UPR) getestet. Um siRNA-abhängige, unspezifische Effekte ausschließen zu können, wurden in diesen Experimenten zwei unterschiedliche SEC62-siRNAs eingesetzt.

IV. ERGEBNISSE

Tabelle 50: Relativer Proteingehalt [%] nach 96stündiger SEC62-siRNA-vermittelter RNAi in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 15 nM SEC62-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt, geerntet, in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels Antikörperdekoratation gegen das jeweilige Zielprotein und gegen β -Aktin wurde nach densitometrischer Auswertung der Signale der relative Proteingehalt ermittelt. Dargestellt ist der Proteingehalt der SEC62-siRNA behandelten Zellen, normalisiert auf β -Aktin und bezogen auf die Kontroll-siRNA-behandelten Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Sofern nicht anders aufgeführt, entspricht die in Klammern angegebene Stichprobenzahl auch der Anzahl der unabhängigen Experimente. Bei einer Abweichung ist zusätzlich die Zahl der einzelnen Experimente (E) aufgeführt und die darunter befindliche Häufigkeit von biologischen Duplikaten (D) oder biologischen Triplikaten (T) genannt. Durch (m), (l) und (r) wird verdeutlicht, ob es sich um ein membranständiges (m), ein luminales (l) oder eines ribosomales Proteins (r) handelt. (HRP= Merrettich-Peroxidase)

	SEC62-UTR		SEC62 #1		Zahl der aufgetragenen Zellen, Art des sekundären Antikörpers
SRα^m	197 \pm 34	(7)	178 \pm 20	(17)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
SRβ^m	209 \pm 36	(8)	221 \pm 47	(11)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec61α^m	22	(1)	84 \pm 21	(3)	200000, 2 E (1D) HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec62m	16 \pm 2	(16)	10 \pm 2	(24)	200000, 15 E (1 D) 19 E (1 D, 1 T) Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec63m	126 \pm 15	(10)	151 \pm 19	(10)	300000, 9 E (1 D) 9 E (1D) Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
GRP170l	91 \pm 9	(12)	93 \pm 7	(16)	200000, 11 E (1 D) 15 E (1D) Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
BiPl	117 \pm 14	(9)	160 \pm 18	(12)	200000, 8 E (1 D) 11 E (1 D) Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
GRP94l	100 \pm 9	(2)	97 \pm 4	(3)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
ERj3l	50 \pm 9	(15)	33 \pm 6	(16)	300000, 13 E (2 D) 14 E (2 D) HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPL4r	113 \pm 29	(2)	85 \pm 6	(5)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPL23r	83 \pm 24	(2)	115 \pm 19	(5)	200000, 3 E (1 T) Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPS3r	125 \pm 25	(2)	115 \pm 23	(5)	200000, 3 E (1 T) Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper

Als Schwellenwert, ab der von einem tatsächlichen Einfluss der siRNA auf den Gehalt eines Proteins gesprochen wird, wurde 100 ± 50 % angesetzt. Wie in Tabelle 50 zu sehen ist, führten beide siRNAs zu identischen Ergebnissen: Sec62 ist effektiv depletiert (SEC62-UTR-siRNA: 16 ± 2 % (n= 16); SEC62 #1-siRNA: 10 ± 2 % (n= 24)) und beide untersuchten Komponenten für die ER-Ansteuerung durch den RNC waren deutlich vermehrt (SR α : SEC62-UTR-siRNA: 197 ± 34 % (n= 7); SEC62 #1-siRNA: 178 ± 20 % (n= 17); SR β : SEC62-UTR-siRNA: 209 ± 36 % (n= 8); SEC62 #1-siRNA: 221 ± 47 % (n= 11)). BiP war bei Zellmanipulation durch die SEC62 #1-siRNA auf einen Wert von 160 ± 18 % (n= 12) erhöht. Sec61 α war nach Transfektion mit SEC62-UTR-siRNA auf 22 % reduziert. Dies wurde aber nur einmal analysiert und hat damit keine Aussagekraft. Alle anderen Proteine waren um weniger als 50 % erhöht/reduziert und gelten daher als unbeeinflusst. Sec63 war zwar nach SEC62 #1-siRNA-Behandlung auf 151 ± 19 % (n= 10) erhöht, was aber für diese siRNA ein spezifischer Effekt zu sein scheint, da er bei der SEC62-UTR-siRNA nicht beobachtet wurde. An dieser Stelle sei angemerkt, dass Sec63, obwohl es mit Sec62 im Komplex vorliegt, bei dessen Mangel nicht ebenfalls in seiner Menge abnahm. ERj3 war das einzige Protein, das in reduzierter Menge vorlag. Es handelt sich dabei um ein Cochaperon des ER luminalen Chaperons BiP. Das Glykoprotein ERj3 war im Falle der SEC62-UTR-siRNA auf 50 ± 9 % (n=15) und im Falle der SEC62 #1-siRNA auf 33 ± 6 % (n= 16) reduziert.

Auf Grund der Tatsache, dass der SR α -Gehalt nach Sec62-Depletion durch die SEC62-UTR-siRNA auf 197 ± 34 % (n= 7) bzw. bei Depletion durch die SEC62 #1-siRNA auf 178 ± 20 % (n= 17) anstieg, kam die Frage auf, ob dieser Zustand reversibel ist. Daher wurde getestet, ob durch 24stündige Expression eines SEC62-Plasmids nach 72stündiger RNAi ein normaler SR α -Level wiederhergestellt werden kann.

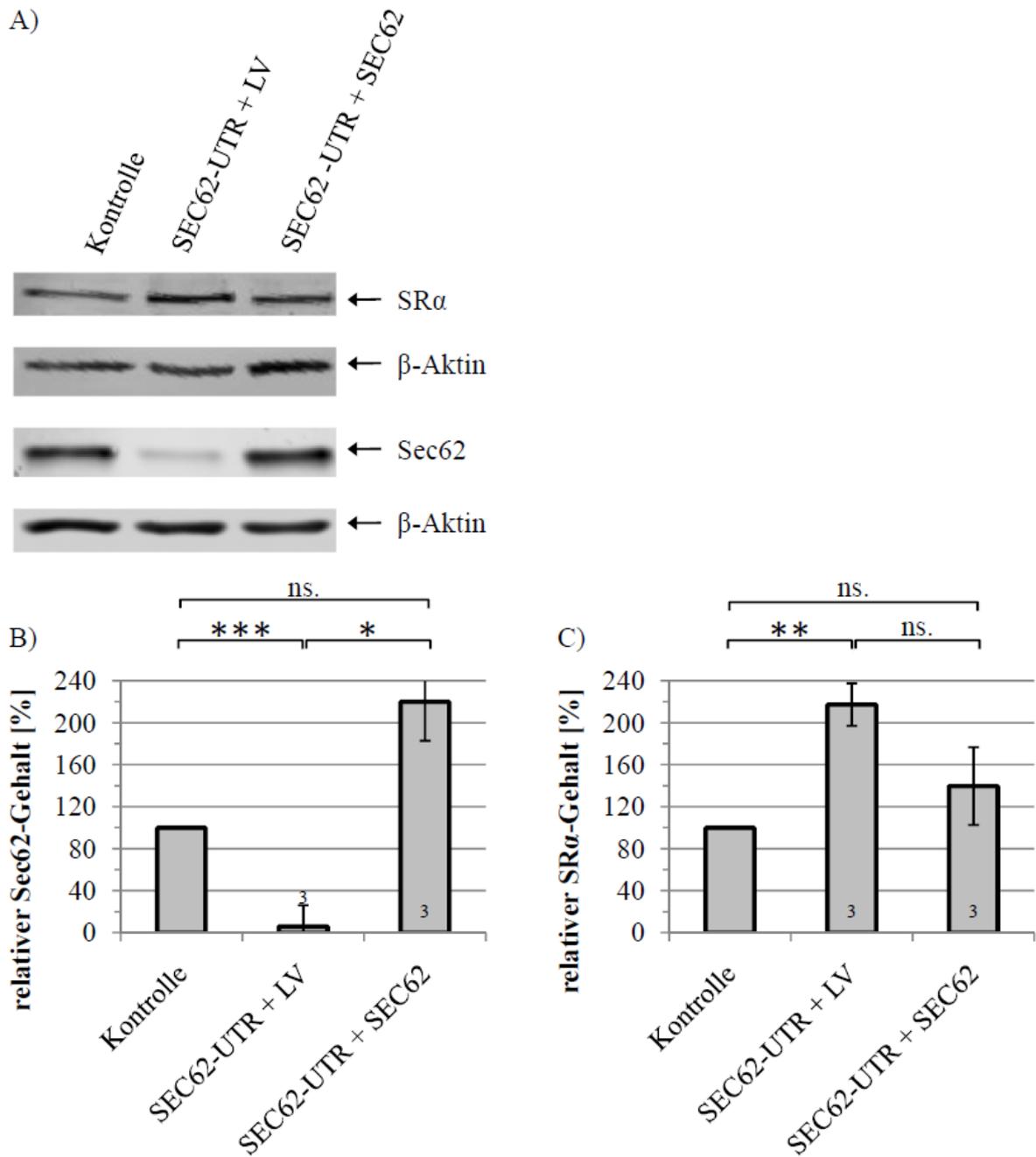


Abbildung 20: Westernblot-Analyse und relativer Proteingehalt nach 96stündiger Sec62-Depletion mit oder ohne 24stündige Expression des Rettungsplasmids

HeLa-Zellen wurden mit 15 nM SEC62-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Nach 72 h wurden die Zellen mit 2 µg des Leervektors (LV) oder dem SEC62-Rettungsplasmids (pcDNA3-Neo-Sec62-IRES-GFP) transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet, in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels Antikörperdekoration gegen das jeweilige Zielprotein und gegen β-Aktin und anschließender densitometrischer Auswertung der Signale konnte der jeweilige relative Proteingehalt ermittelt werden. Für die Analyse von Sec62 wurden 200000 Zellen aufgetragen, für die Analyse von SRα wurden 300000 Zellen aufgetragen. Dargestellt ist der Proteingehalt normalisiert auf β-Aktin und bezogen auf die Kontrollzellen (Kontroll-siRNA und Leervektor behandelt). Teilabbildung A stellt exemplarisch einen der Westernblots dar. Teilabbildung B gibt den relativen Sec62-Proteingehalt an und C zeigt den relativen SRα-Gehalt. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Zahlen an der Basis der Balken geben die Anzahl der Versuche an (n= 3; drei unabhängige Experimente). Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Zellpopulationen erfolgte mit dem t-Test (ns.: nicht signifikant; 0,05 > p > 0,01: *; 0,01 > p > 0,001: **; p > 0,001: ***).

In Abbildung 20 A ist exemplarisch ein Westernblot nach SEC62-Expressionsmodulation abgebildet. Die Mittelungen der Proteinlevel von Sec62 und SR α aus drei biologischen Replikaten inklusive statistischer Auswertung sind in den Teilabbildungen B) und C) dargestellt. Teilabbildung B demonstriert erneut, dass der Sec62-Proteingehalt nach Transfektion mit der SEC62-UTR-siRNA signifikant reduziert wurde und durch Expression des SEC62-Rettungsplasmids signifikant von 6 % (RNAi und Leervektor-Transfektion) auf 220 % (RNAi und Sec62-Rettungsplasmid) angehoben wurde. Zwischen der Kontrolle und den geretteten Zellen hingegen war kein signifikanter Unterschied in den Sec62-Proteinmengen zu verzeichnen. Teilabbildung C verdeutlicht erneut, dass nach Sec62-Depletion der SR α -Gehalt signifikant anstieg. Wenn der Sec62-Gehalt durch die Transfektion mit dem Rettungsplasmid angehoben wurde, ging der SR α -Gehalt auf 140 % zurück. Dieser Effekt war nicht signifikant. Ob die Rettung des Sec62-Gehalts auch den SR β -Level erniedrigt, wurde nicht getestet. Es wurde versucht zu analysieren, ob der ERj3-Gehalt nach der Rettung des Sec62-Gehalts ebenfalls wieder ansteigt. Die zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehende ERj3-Antikörpercharge ermöglichte jedoch keine ERj3-Detektion. Daher konnte diese Frage nicht beantwortet werden.

Folglich lässt sich daraus schließen, dass der SR α -Gehalt mit dem Sec62-Gehalt verbunden ist, da eine Reduktion der Menge an Sec62 eine signifikante Erhöhung der Menge an SR α zur Folge hatte. Die Rettung des Sec62-Gehalts führte zu einer Reduktion an SR α , die jedoch nicht signifikant war. Eine Erklärung könnte sein, dass die Synthese und damit die Rettung vom Sec62-Protein schneller erfolgt als der Abbau des SR α -Proteins durch die in der menschlichen Zelle natürlich vorkommende Protein-Umsetzung. So wie nach RNAi der SR α -Gehalt innerhalb von 24 h kaum abnimmt (siehe Abbildung 21 B), könnte auch in dem Sec62-Rettungsexperiment ein signifikanter Rückgang des SR α -Proteins z.B. erst nach 72 h zu vermerken sein. Diese These müsste in einem weiteren Experiment überprüft werden, bei dem nach 96stündiger PTGS durch SEC62-UTR-siRNA über einen längeren Zeitraum, z.B. 96 h, die Überexpression des SEC62-Rettungsplasmids durchgeführt und parallel der SR α -Gehalt bestimmt würde.

IV.3.2.2. Proteomanalyse nach SR α -Depletion

SR α und SR β bilden zusammen den SRP-Rezeptor und sind an der Direktion des RNCs zum ER involviert. Im Jahre 2004 zeigten Guth et. al durch quantitative Bestimmung des SR α -Proteins nach SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung, dass SR α nur halb so oft in rauen Hundemikrosomen zu finden ist wie cotranslational aktive Translokasen (Guth *et al.*, 2004). Die Konzentration von SR α betrug 0,24 μ M, die von SR β 0,47 μ M und Konzentration von aktiven Translokasen 0,40-0,62 μ M. Die Bestätigung, dass der SRP-Rezeptor in HeLa-Zellen auf Grund seiner geringen Häufigkeit den begrenzenden Faktor in der Synthese sekretorischer Proteine darstellt, wurde 2008 geliefert (Lakkaraju

et al., 2008). Nach Depletion von Sec61 α in HeLa-Zellen gingen auch die Werte für Sec61 β und Sec61 γ zurück, hingegen erhöhten sich die Mengen an SR α und SR β (Lang *et al.*, 2012). Dies wurde vom Autor so gedeutet, dass die Zelle die noch restlichen funktionalen Translokasen so effektiv wie möglich mit den translatierenden Ribosomen anzusteuern versucht. Daher stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob die Depletion von SR α ebenfalls eine Auswirkung auf die Mengen anderer Proteine hat. Eine gestörte Ansteuerung des RNCs zum ER könnte zu einer generellen reduzierten Proteinsynthese von sekretorischen und membranständigen Proteinen führen, was dadurch auch die membranständige Translokase beträfe. Möglich wäre aber auch eine Antwort der Zelle auf die gestörte Proteinsynthese. Ähnliches konnte z.B. in Hefe beobachtet werden, die nach Reduktion des SRP-Levels die Menge an Chaperonen erhöhte und die Biosynthese von ribosomalen Proteinen reduzierte (Mutka und Walter, 2001; Ogg *et al.*, 1992). Ein rapider Abfall an funktionalem SRP, wie z.B. in einer temperatursensitiven Hefemutante, führte hingegen zu einem letalen Phänotyp, da die Hefe keine Möglichkeit zur Adaption an den Mangel an SRP hatte (Stirling *et al.*, 1992). Um dementsprechend in den Transportstudien dieser Arbeit eine Auswirkung der SR α -Depletion auf andere ER-Komponenten und dadurch veränderte Transporteffizienzen ausschließen zu können, wurde das Proteom der HeLa-Zellen auch auf andere Proteine des ERs, der Proteinbiosynthese und der ER-Stressantwort analysiert. Die Daten sind in Tabelle 51 zusammengefasst.

IV. ERGEBNISSE

Tabelle 51: Relativer Proteingehalt [%] nach 96stündiger SR α -siRNA-vermittelter RNAi in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 15 nM SR α -siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt, geerntet, in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels Antikörperdekoration gegen das jeweilige Zielprotein und gegen β -Aktin und anschließender densitometrischer Auswertung der Signale konnte der relative Proteingehalt ermittelt werden. Dargestellt ist der Proteingehalt der SR α -siRNA behandelten Zellen, normalisiert auf β -Aktin und bezogen auf die Kontroll-siRNA-behandelten Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Sofern nicht anders aufgeführt, entspricht die in Klammern angegebene Stichprobenzahl auch der Anzahl der unabhängigen Experimente. Bei einer Abweichung ist zusätzlich die Zahl der einzelnen Experimente (E) aufgeführt und die darunter befindliche Häufigkeit von biologischen Duplikaten (D) oder biologischen Triplikaten (T) genannt. Durch (m), (l) und (r) wird verdeutlicht, ob es sich um ein membranständiges (m), ein luminales (l) oder ribosomales Protein handelt. (HRP= Merrettich-Peroxidase)

	SR α #1	SR α #2	SR α -UTR	Zahl der aufgetragenen Zellen, Art des sekundären Antikörpers
SRα^m	12 \pm 4 (6)	18 \pm 4 (15) 13 E (1 T)	13 \pm 4 (16) 14 E (1 T)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
SRβ^m	68 \pm 12 (6)	115 \pm 16 (12)	93 \pm 10 (13)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec61α^m	63 \pm 51 (2)	77 \pm 14 (5) 4 E (1 D)	96 \pm 18 (5) 4 E (1 D)	200000, HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec62m	117 \pm 11 (5)	108 \pm 10 (14)	101 \pm 10 (15)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec63m	92 (1)	112 \pm 25 (5)	88 \pm 23 (5)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
GRP170l	98 \pm 5 (5)	103 \pm 11 (12)	102 \pm 12 (12)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
BiPl	88 \pm 20 (3)	94 \pm 9 (10)	99 \pm 13 (10)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
GRP94l	86 \pm 7 (4)	91 \pm 16 (5)	94 \pm 15 (5)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
ERj3l	65 \pm 17 (3)	100 \pm 24 (5)	120 \pm 30 (5)	300000, HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPL4r	100 \pm 18 (3)	104 \pm 11 (6) 4 E (1 T)	97 \pm 11 (6) 4 E (1 T)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPL23r	85 \pm 24 (3)	116 \pm 13 (6) 4 E (1 T)	105 \pm 27 (6) 4 E (1 T)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPS3r	121 \pm 27 (3)	179 \pm 33 (6) 4 E (1 T)	112 \pm 26 (6) 4 E (1 T)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper

Tabelle 51 ist zu entnehmen, dass nach 96stündiger RNAi die Menge an SR α auf weniger als 20 % reduziert war (SR α #1-siRNA: 12 ± 4 % (n=6), SR α #2-siRNA: 18 ± 4 % (n= 15), SR α -UTR-siRNA: 13 ± 4 % (n= 16)). Der SR α -Gehalt ist demnach zu einem Zeitpunkt signifikant reduziert, an dem sich die mRNA-Menge schon wieder von der RNAi erholt hat (qRT-PCR-Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache verdeutlicht, dass die Zellmanipulation auf RNA-Ebene einen sehr schnellen transienten Effekt hat, dass die Abnahme des dazugehörigen Proteins durch dessen Umsatz jedoch verzögert eintritt. Alle anderen getesteten Proteine waren in ihrer Menge verglichen zu den Kontrollzellen, im Rahmen einer tolerablen Grenze (100 ± 50 %), wenig verändert. Das einzige Protein, das diesen Grenzwert überschritt, war das ribosomale Protein RPS3 mit einem Wert von 179 ± 33 % für SR α #2-siRNA. Da bei Einsatz der beiden anderen SR α -siRNAs der RPS3-Wert jedoch bei 121 ± 27 % (n=3) bzw. 112 ± 26 % (n=6) lag und auch alle anderen ribosomalen Proteine keine gravierenden Veränderungen in ihren Mengen zeigten, wird davon ausgegangen, dass die Erhöhung von RPS3 ein für die SR α #2-siRNA unspezifischer Effekt ist, der nicht auf eine generelle Erniedrigung des SR α -Levels zurückzuführen ist .

Aus dieser Proteomanalyse lässt sich schließen, dass außer SR α kein weiteres Protein von der RNAi beeinflusst wurde. Es wurden keine Hinweise auf ER-Stress oder kompensatorische Antworten auf die SR α -Depletion gefunden. Selbst SR β , das mit SR α in einem Komplex assoziiert vorliegt, zeigt zu diesem Zeitpunkt keinen Abbau auf Grund von Destabilisierung.

IV.3.2.3. Proteomanalyse nach gleichzeitiger Depletion von Sec62 und SR α

Der SRP-Rezeptor vermittelt mit dem SRP die Direktion des RNCs zum ER (Gilmore *et al.*, 1982; Meyer *et al.*, 1982). Für das menschliche Sec62 wird auf Grund seiner Homologie zum Hefe-Sec62 eine Beteiligung am posttranslationalen Transport und durch die evolutionär gewonnene Ribosomenbindungsstelle (Müller *et al.*, 2009) möglicherweise eine Rolle im cotranslationalen Transport angenommen. Abbildung 17 zur Folge führt eine gleichzeitige Depletion von SR α und Sec62 zu einer reduzierten Zellteilung. Daher stellt sich die Frage, ob die gleichzeitige Depletion auch Veränderungen auf Proteomebene mit sich zieht. Per quantitativem Westernblot wurde daher analysiert, ob bestimmte ER-Proteine, darunter auch Membranproteine, in ihrer Konzentration verändert waren. So sollte in den daraufhin folgenden Studien eine Auswirkung der Depletion auf andere ER-Komponenten und dadurch veränderte Transporteffizienzen ausgeschlossen werden. Tabelle 52 fasst den erhobenen Datensatz zusammen.

IV. ERGEBNISSE

Tabelle 52: Relativer Proteingehalt [%] nach 96stündiger SEC62- und SR α -siRNA-vermittelter RNAi in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden für 96 h mit je 15 nM SEC62- und SR α -siRNA oder 30 nM Kontroll-siRNA behandelt, geerntet, in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels Antikörperdekoration gegen das jeweilige Zielprotein und gegen β -Aktin und anschließender densitometrischer Auswertung der Signale konnte der relative Proteingehalt ermittelt werden. Dargestellt ist der Proteingehalt der SR α -siRNA behandelten Zellen, normalisiert auf β -Aktin und bezogen auf die Kontroll-siRNA-behandelten Zellen. Zeigt sind die Mittelwerte in Prozent inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Sofern nicht anders aufgeführt, entspricht die in Klammern angegebene Stichprobenzahl auch der Anzahl der unabhängigen Experimente. Bei einer Abweichung ist zusätzlich die Zahl der einzelnen Experimente (E) aufgeführt und die darunter befindliche Häufigkeit von biologischen Duplikaten (D) oder biologischen Triplikaten (T) aufgeführt. Durch (m), (l) und (r) wird verdeutlicht, ob es sich um ein membranständiges (m), ein luminales (l) oder ribosomales (r) Protein handelt. (HRP= Merrettich-Peroxidase)

	SEC62 #1 +	SR α #2	SEC62 #1 +	SR α -UTR	Zahl der aufgetragenen Zellen, Art des sekundären Antikörpers
SRα^m	15 \pm 5	(11)	16 \pm 6	(11)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
		9 E (1 T)		9 E (1 T)	
SRβ^m	158 \pm 33	(7)	163 \pm 29	(7)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
Sec61α^m	113 \pm 25	(3)	103 \pm 21	(3)	200000, HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper
		2 E (1 D)		2 E (1 D)	
Sec62^m	10 \pm 2	(11)	14 \pm 4	(11)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
		9 E (1 T)		9 E (1 T)	
Sec63^m	70 \pm 8	(4)	99 \pm 30	(4)	300000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
GRP170^l	94 \pm 15	(8)	97 \pm 16	(8)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
BiP^l	122 \pm 19	(7)	123 \pm 19	(7)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
GRP94^l	143	(1)	126	(1)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
ERj3^l	47 \pm 29	(2)	31 \pm 12	(2)	300000, HRP-gekoppelter sekundärer Antikörper
RPL4^r	87 \pm 16	(3)	79 \pm 23	(3)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
		1 E (1 T)		1 E (1 T)	
RPL23^r	130 \pm 46	(3)	97 \pm 29	(3)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
		1 E (1 T)		1 E (1 T)	
RPS3^r	152 \pm 49	(3)	89 \pm 22	(3)	200000, Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper
		1 E (1 T)		1 E (1 T)	

Es zeigte sich, dass nach 96 stündiger RNAi der Gehalt von sowohl SR α als auch von Sec62 effizient reduziert war, wenn eine Kombination von SR α - und SEC62 #1-siRNA für die Transfektion verwendet wurde. So betrug der SR α -Gehalt 15 % (SEC62 #1-siRNA + SR α #2-siRNA) bzw. 16 % (SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA) und der Sec62-Gehalt 10 % (SEC62 #1-siRNA + SR α #2-siRNA) bzw. 14 % (SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA). Dies spricht dafür, dass die einzelnen siRNA-Strategien gegen Sec62 und SR α auch in Kombination erfolgreich eingesetzt werden können. Die Erhöhung des SR α -Gehalts, die in Tabelle 50 nach siRNA-basierter Sec62-Proteinreduktion zu sehen ist, wurde bei kombinierter RNAi durch den Einsatz der SR α -siRNA kompensiert. Wie schon bei der Depletion von Sec62 alleine, war bei gleichzeitiger Depletion von SR α der SR β -Gehalt auf mehr als 150 % erhöht (SEC62 #1-siRNA + SR α #2-siRNA: 158 ± 33 % (n= 7); (SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA: 163 ± 29 % (n=7)). Wenn die These stimmt, dass eine Erhöhung des SR β -Gehalts (und bei einzelner Sec62-Depletion auch des SR α -Gehalts) durch eine Reduktion des Sec62-Proteinlevels induziert wird, ist es denkbar, dass erst nach Rückgang des PTGS von Sec62 und dessen Rückkehr auf normales Proteinniveau auch SR β wieder auf einen normalen Level absinkt. Und auch für ERj3 wiederholte sich der bekannte Effekt, dass es nach Sec62-Reduktion in seiner Menge abnahm (SEC62 #1-siRNA + SR α #2-siRNA: 47 ± 29 % (n= 2), SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA: 31 ± 12 % (n=2)). Keines der anderen Proteine zeigte eine auffällige Erhöhung oder Erniedrigung in seinem Gehalt.

Die Untersuchung des Proteoms gleichzeitiger Sec62- und SR α -Depletion in HeLa-Zellen erlaubte daher den Rückschluss, dass sich die Zelle weder unter ER-Stress befanden, noch Mechanismen in Gang setzte, um die Depletion zu kompensieren.

IV.3.3. Analyse der RNAi-vermittelten mRNA-Regulation mittels qRT-PCR

Nach Sec62-Depletion wurde eine Abnahme des ERj3-Proteingehalts in den HeLa-Zellen beobachtet (siehe Tabelle 50). Um zu zeigen, dass sich dieser Effekt auf die Proteinebene beschränkt und nicht durch eine verminderte Expressionsrate des ERJ3-Gens (DNAJB11) verursacht wird, wurde eine quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) nach Transfektion der HeLa-Zellen mit SEC62-siRNAs durchgeführt.

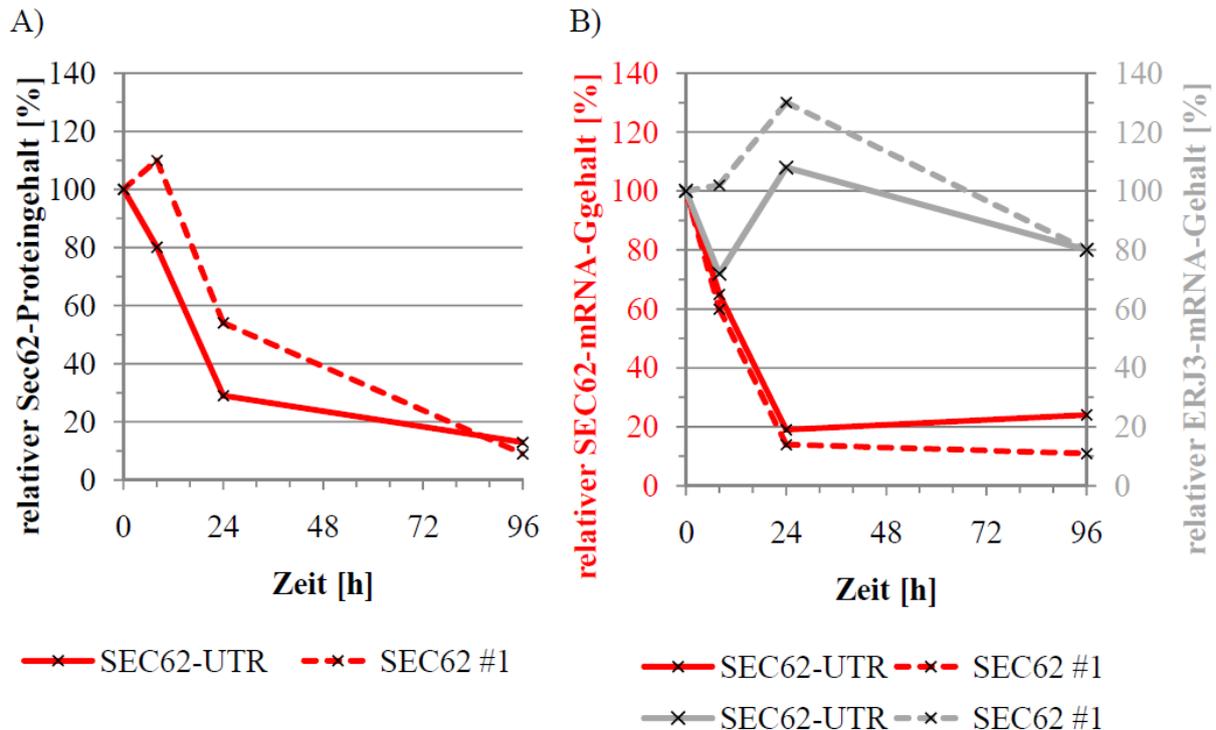


Abbildung 21: Analyse des Sec62- und ERJ3-mRNA-Gehalts durch quantitative *real-time* PCR und Kontrolle des Sec62-Proteingehalts per Westernblot-Analyse

Die HeLa-Zellen wurden mit 15 nM SEC62- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurden die Zellen geerntet und ein Teil der Zellen für die SDS-PAGE und Westernblot-Analyse lysiert. Zur Bestimmung des Sec62-Proteingehalts (A) wurden 200000 Zellen auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte durch Cy5-gekoppelten sekundären Antikörper und die Fluoreszenzsignale wurden mittels des Typhoon Trio™ Scanners digitalisiert. Die RNA der restlichen Zellen wurde mittels des RNeasy Micro-Kits isoliert. Die reverse Transkription erfolgte mit SuperScriptII und Oligo(dT)12-18-Nukleotide. Der TaqMan® Gene Expression Assay diente der quantitativen *real-time* PCR für die im Diagramm angegebenen mRNAs. Für den Vergleich der mRNA-Gehalte von SEC62 und ERJ3 der Kontrollzelllinie und der SEC62-mRNA reduzierten Zelllinien wurden sogenannte $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte gebildet. Dafür wurden für jede Probe je drei Messung für das Zielgen und das Referenzgen *TATA-box binding protein* durchgeführt und deren Quotient auf den der Kontrollprobe normalisiert. Die Werte wurden daraufhin gemittelt (B).

Wie Abbildung 21 verdeutlicht, sanken die SEC62-mRNA-Level innerhalb von 24 h unter 20 % (Teilabbildungen B, rot), wohingegen die Sec62-Proteinmengen verglichen zur Kontrolle verzögert abnahmen (Teilabbildung A). Dies veranschaulicht die Schnelligkeit der siRNA-induzierten mRNA-Degradation in der Zelle. Wenn man nun die mRNA-Gehalte von ERJ3 betrachtet (Teilabbildung B, grau), stellt man fest, dass dieser von der siRNA-basierten Zellmanipulation nicht beeinflusst wurde. Bei Transfektion mit SEC62-UTR-siRNA sank er innerhalb von 8 h auf etwa 70 % ab, um 24 h nach RNAi-Induktion auf etwa 100 % anzusteigen und innerhalb der nächsten 72 h nochmals auf ca. 80 % abzusinken. Bei Transfektion mit SEC62 #1-siRNA blieb der ERJ3-mRNA-Gehalt in den ersten 8 h unverändert, stieg in den nächsten 16 h auf ca. 130 % an und fiel letztendlich zum Zeitpunkt 96 h auf ca. 80 % ab. Auch wenn sich in dieser qRT-PCR besonders bei der zuletzt beschriebenen siRNA Schwankungen im ERJ3-mRNA-Level zeigten, hielten diese sich in dem Toleranzbereich von 100 ± 50 %.

Der ERJ3-mRNA-Gehalt ist folglich unbeeinflusst von der SEC62-mRNA-Degradation und der damit einhergehenden Sec62-Proteindepletion. Dennoch war die Menge an ERj3-Protein in den behandelten Zellen reduziert verglichen zur Kontrolle (siehe Tabelle 50). Daraus lässt sich schließen, dass die Sec62-Proteindepletion spezifisch eine Auswirkung auf die Menge des endogenen ERj3-Proteins hat. Es deutet daraufhin, dass Sec62 für eine reguläre ERj3-Biogenese benötigt wird.

IV.3.4. Auswirkungen der (gleichzeitigen) RNAi-vermittelten SEC62- und/oder SR α -Depletion auf den Proteintransport ins ER

Im Folgenden sollte erstmals die Beteiligung des Sec61-Komplex-assoziierten Sec62-Proteins am Proteintransport in das ER geklärt werden. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Set diverser *in vitro*-Modellsubstrate ins ER transportiert und die Translokationseffizienz durch Abspaltung der Signalsequenz oder Glykosylierung des Proteins betrachtet. Dazu kombinierte man zwei Methoden:

1. Um gezielt nur ein definiertes Modellsubstrat betrachten zu können, wurde es radioaktiv markiert. Dazu wurde Retikulozytenlysat mit der mRNA des Modellsubstrats und radioaktivem [³⁵S]-Methionin versetzt. Im Laufe der Genese der Retikulozyten verlieren diese ihren Zellkern, besitzen jedoch noch alle zur Translation notwendigen cytosolischen Komponenten. Sofern es Nuklease behandelt war, konnte so spezifisch das Modellsubstrat mit radioaktiver Markierung synthetisiert und nach dem Transportversuch durch Autoradiographie nach SDS-PAGE auf seine Prozessierung (Glykosylierung) analysiert werden.
2. Damit das Modellsubstrat das ER einer Zelle erreichen und passieren konnte, wurde deren Plasmamembran porös gemacht. Dies gelangt durch die hohe Spezifität von Digitonin für cholesterolhaltige Membranen. Das ER hingegen blieb in seiner Integrität unbeeinträchtigt. Durch vorhergehende Manipulation der Zellen mit siRNAs oder Plasmiden konnten folglich verschiedene „Typen“ an ER-Membranen gewonnen werden: Kontroll-ER, das nach Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA oder Kontroll-Plasmid gewonnen wurde oder manipuliertes ER, das vor der Präparation an Komponenten depletiert oder (im Rettungsversuch) wieder supplementiert worden war.

So konnte spezifisch die Translokation eines radioaktiv-markierten Substrats nach gezielter Manipulation der Zellen betrachtet und so ein Rückschluss auf die Funktion des depletierten Proteins geschlossen werden.

Prinzipiell konnte man die Modellsubstrate bezüglich ihres Transportmechanismus in raue Hundepankreasmikrosomen unterscheiden. Eine Gruppe bestand aus Proteinen, die länger als ca. 70

Aminosäuren und während ihrer Translokation auf die Bindung des Ribosoms an das ER angewiesen waren. Dies wird als cotranslationaler Transport bezeichnet, da die Synthese des Proteins und die Translokation gekoppelt vonstattengehen. Die Direktion des RNCs zum ER wird durch das SRP und dessen Rezeptor, bestehend aus SR α und SR β vermittelt (Gilmore *et al.*, 1982; Lipp *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1982; Neuhof *et al.*, 1998; Walter und Blobel, 1981; Walter *et al.*, 1981). Daher wird dies auch als SRP-abhängiger Transport bezeichnet. Die andere Gruppe an Modellsubstraten bestand aus Proteinen, die kürzer als 70 Aminosäuren waren. Diese haben einen ATP-abhängigen Transportmechanismus, der jedoch SRP-unabhängig ist (Schlenstedt *et al.*, 1990; Schlenstedt und Zimmermann, 1987; Wiech *et al.*, 1987; Zimmermann *et al.*, 1990b). Aus Hefe ist bekannt, dass diese Proteine eine Sec62-Abhängigkeit in ihrer Translokation zeigen (Müsch *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1996; Rothblatt und Meyer, 1986). Da in diesem Fall die Synthese abgeschlossen ist, bevor das Protein transloziert wird, nennt man diesen Mechanismus posttranslationalen Transport. Diese Unterscheidung ist in Hefe jedoch nicht absolut, da manche Proteine beide Wege gehen können (Ng *et al.*, 1996) oder, bei Fehlen des SRPs, auf das posttranslationale System umsteigen (Hann und Walter, 1991). Ähnliches wurde Ansatzweise für das Säugersystem auch an Hundepankreasmikrosomen beobachtet. Untersuchungen des 64 Aminosäuren lange sekretorische Protein Präprocecropin A (ppcec) zeigten, dass es posttranslational in Hundepankreasmikrosomen importiert wird (Zimmermann *et al.*, 1990a), aber dass die Anwesenheit des SRP-Rezeptors die Transporteffizienz verbesserte. Außerdem wurde eine Interaktion von SRP und ppcec beobachtet. (Schlenstedt *et al.*, 1990). Dies implizierte erstmals für Säugetierzellen, dass ein Substrat sowohl den posttranslationalen als auch den cotranslationalen Mechanismus nutzen kann. Des Weiteren konnten Lakkaraju *et al.* demonstrieren, dass Sec62 im posttranslationalen Transport von Proteinen kürzer als 120 Aminosäuren involviert ist (Lakkaraju *et al.*, 2012). Erneut zeigten sich einige Proteine jedoch erst dann Sec62-abhängig, wenn auch der SRP-abhängige Transportmodus unterbrochen war. Dadurch ergab sich das Problem, dass in den angestrebten Studien unter cotranslationalen Bedingungen zur Sec62-Abhängigkeit eines kurzen Modellsubstrats und der Beteiligung von Sec62 im posttranslationalen Transport, das Substrat auf den SRP-abhängigen Transportport ausweichen könnte und so die Verbindung zu Sec62 verschleiert würde.

Nachdem nun eine Strategie entwickelt worden war, bei der sowohl Sec62 und SR α allein bzw. beide gleichzeitig depletiert werden können, konnten *in vitro*-Transportstudien durchgeführt werden, bei denen die Sec62-Abhängigkeit auch unter cotranslationalen Bedingungen demaskiert werden kann.

Als Vorläuferproteine für den ER-Import wurden ppl, ein typisches Modellsubstrat des cotranslationalen Transports (Jungnickel und Rapoport, 1993; Kurzchalia *et al.*, 1986; Lakkaraju *et al.*, 2008), das Immunglobulin leichte Kette (Ig κ) (Ainger und Meyer, 1986; Lipp *et al.*, 1987) und das Typ II Plasmamembranprotein invariante Kette (inv ch) des Klasse II

Haupthistokompatibilitätskomplexes (Lipp *et al.*, 1987; Martoglio *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 1999) eingesetzt. Alle drei Substrate werden nach ihrer Translokation von der Signalpeptidase (SPase) prozessiert. Dadurch ist per Autoradiographie eine Verkürzung des Polypeptids, sprich eine größere Wanderstrecke in der SDS-PAGE, detektierbar. *Inv ch* wird zusätzlich vom Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST-Komplex) glykosyliert, was wiederum durch einen Anstieg des Molekulargewichts aufgezeigt wird. Das ER-luminale BiP-Cochaperon ERj3 wurde, auf Grund seiner beschriebenen Abhängigkeit vom Sec63-Protein (Lang *et al.*, 2012), ebenfalls untersucht. Es ist 358 Aminosäuren lang und wird ebenfalls vom OST-Komplex glykosyliert. Letztendlich wurde auch das bereits erwähnte *ppcec* in die *in vitro*-Studien miteinbezogen.

IV.3.4.1. Proteintransport ins ER nach SR α -Depletion

Zunächst wurde überprüft, ob mit der erzielten Proteinreduktion des SR α grundsätzlich eine Hemmung des SRP-abhängigen Transports erreicht wird. Dies wurde anhand des Transports von *ppl*, das als klassisches Kontrollsubstrat des cotranslationalen Transports gilt, von *Igk* und *inv ch*, die ebenfalls SRP-abhängig importiert werden (Lipp *et al.*, 1987), getestet. Außerdem stellte sich die Frage, ob ERj3 ebenfalls auf SR α angewiesen ist.

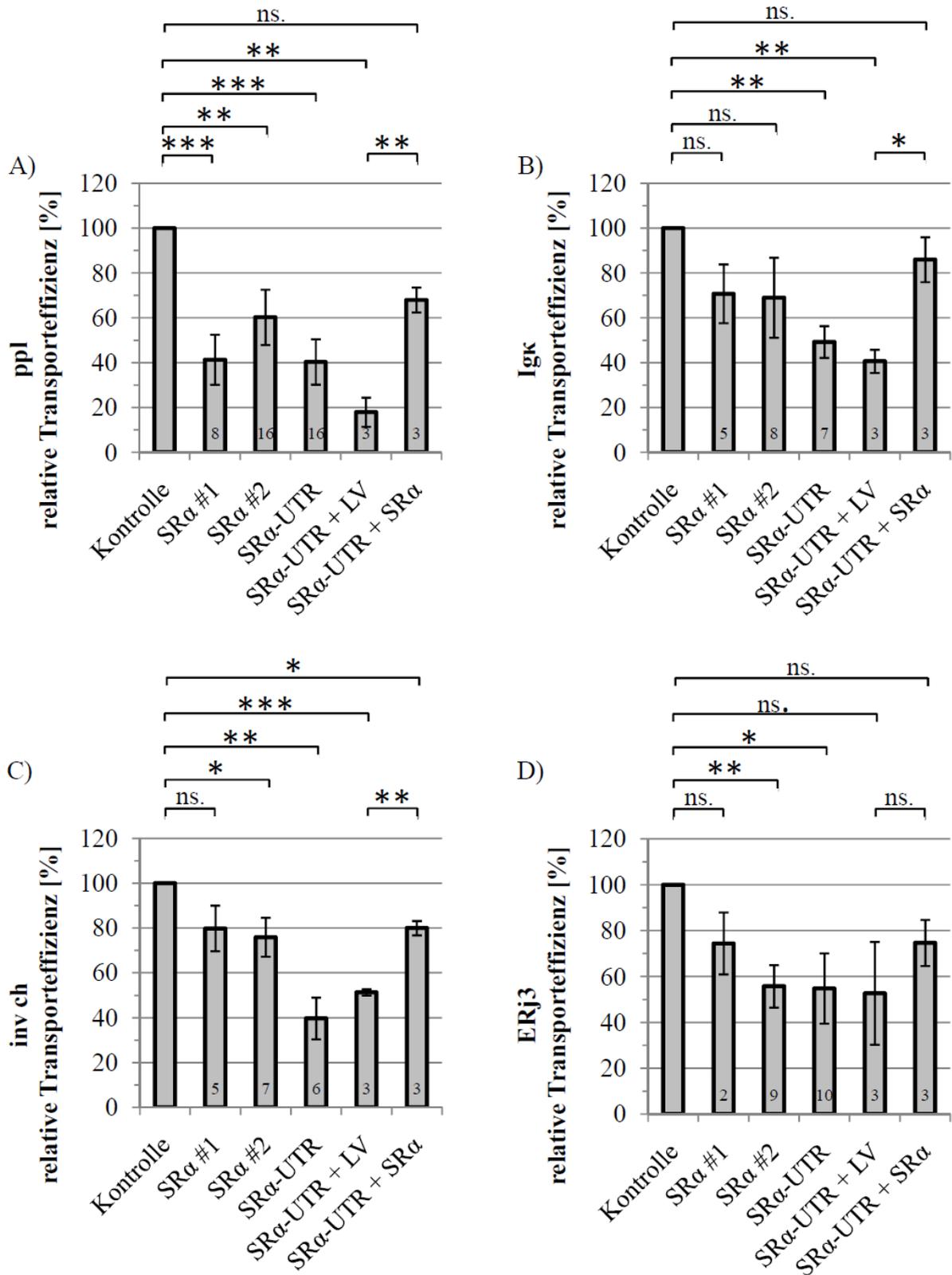


Abbildung 22: Cotranslationale Proteintransporte ins ER nach SRα-Depletion und SRα-Rettung
 HeLa-Zellen wurden 96 h mit 15 nM SRα-siRNA behandelt oder nach 72 h zusätzlich mit 2 µg des pcDNA3-Neo-SRα-IRES-GFP-Rettungsplasmids oder Leervektors (LV) transfiziert. Nach der Ernte erfolgte die Präparation zu semipermeabilisierten Zellen und die angegebenen Vorläuferproteine wurden unter cotranslationalen Bedingungen in die angegebenen ER-Fractionen importiert. Nach der *in vitro*-Synthese des

radioaktiv-markierten Polypeptids unter Anwesenheit der ER-Vesikel, erfolgten SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie der Proben. Dargestellt sind der Anteil des reifen Proteins bezogen auf dessen Gesamtsynthese normalisiert auf die Prozessierungs-/Glykosylierungseffizienz der Kontrolle. Von Präprolactin (ppl) (A) und Immunglobulin leichte Kette (Igk) (B) werden die Signalsequenzen durch die Signalpeptidase abgespalten, invariante Kette (inv ch) (C) und ERj3 (D) werden zusätzlich durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex glykosyliert. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Letztere entsprach gleichzeitig der Anzahl der unabhängigen Experimente, in denen die Daten gewonnen wurden. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Transporteffizienzen erfolgte mit dem t-Test (ns.: nicht signifikant; $0,05 > p > 0,01$: *; $0,01 > p > 0,001$: **; $p > 0,001$: ***). Verglichen wurden die Transportraten der Kontrollzellen und den behandelten Zellen. Dabei wurde jede Form der Manipulation berücksichtigt. Außerdem wurden die Transporteffizienzen der Leervektor-transfizierten Zellen mit denen der Zellen aus dem Rettungsansatzes verglichen.

Abbildung 22 zeigt die Translokationseffizienzen der Transportsubstrate unter cotranslationalen Bedingungen 96 h nach siRNA-Behandlung. Der SR α -Restproteingehalt betrug durchschnittlich 7 % (SR α #1-siRNA) bis 15 % (SR α -UTR-siRNA + LV). In den Datensätzen der Rettungsexperimente betrug die Werte des SR α -Gehalts 15 % bei Expression des Leervektors bzw. 129 % nach Expression des pcDNA3-Neo-SR α -IRES-GFP-Rettungsplasmids. Wenn SR α depletiert worden war, wurde ppl signifikant schlechter in die ER-Vesikel transportiert (40 % bis 60 %). Das Rettungsexperiment bestätigte die Abhängigkeit des ppl-Transports von SR α . Bei einem SR α -Mangel wurden nur noch 18 ± 7 % des ppl prozessiert, was nach Expression des Rettungsplasmids signifikant auf einen Wert von 68 ± 6 % angehoben werden konnte.

Auch im Falle von Igk (Teilabbildung B) und inv ch (Teilabbildung C) wurde bei einem SR α -Defizit eine reduzierte Transporteffizienz beobachtet. Die Behandlung der HeLa-Zellen mit SR α -UTR-siRNA führte zu einer signifikant schlechteren Prozessierung von Igk (49 ± 7 %). Diese Reduktion wurde durch Transfektion mit dem SR α -Rettungsplasmid signifikant aufgehoben: die Prozessierung stieg signifikant von 41 ± 5 % auf 86 ± 10 % an. Im Falle der beiden anderen SR α -siRNAs ließ sich lediglich die Tendenz für einen nicht signifikant schlechteren Transport erkennen. Die inv ch wurde sowohl nach Transfektion mit der SR α #2- als auch mit der SR α -UTR-siRNA signifikant schlechter glykosyliert. Im Falle der SR α -UTR-siRNA war der Transportdefekt am stärksten ausgeprägt und am signifikantesten. Dies spiegelt sich auch in den Rettungsexperimenten wieder. Durch die Rettung des SR α -Gehalts wurde die Glykosylierungseffizienz signifikant von 51 ± 1 % auf 80 ± 3 % verbessert. Auch das luminale Cochaperon ERj3 zeigte eine reduzierte Translokation nach Stilllegung des SR α -Gens (Teilabbildung D). Sie sank in Anwesenheit der SR α -depletierten ER-Fraktionen auf ca. 55 % bis 75 % ab. Im Falle der SR α #2- und der SR α -UTR-siRNA war die Reduktion signifikant. Die Daten des Rettungsexperimentes demonstrieren, dass im Vergleich zur SR α -UTR-siRNA und Leervektor-transfizierten ER-Fraktion durch Anheben des SR α -Gehalts eine verbesserte Transporteffizienz erzielt wurde (53 ± 22 % auf 75 ± 10 %). Der Unterschied war nicht signifikant. In diesen Experimenten war nach Transfektion mit der SR α -UTR-siRNA und dem Leervektor der Transport nicht signifikant schlechter verglichen mit der Kontrolle, wie es hingegen nach alleiniger SR α -UTR-siRNA-Behandlung beobachtet werden konnte. Zudem entspricht die Glykosylierungseffizienz nach Rettung

des SR α -Proteins der Glykosylierungseffizienz der SR α #1-siRNA-behandelten ER-Fraktion. Da das Rettungsexperiment zwar zu einem verbesserten Effekt führte, dieser aber nicht signifikant und die Standardfehler sehr großen waren, konnte nicht eindeutig geschlossen werden, ob ERj3 nun tatsächlich SR α -abhängig transportiert wird.

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekte um generelle Schwankungen der Methode oder durch Unregelmäßigkeiten der Versuchsdurchführung handelt, wurden Transporte mit cyt b5 durchgeführt, das vollkommen SR α -unabhängig transloziert wird (Abell *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 1983). Es handelte sich um ein sogenanntes *tail anchor*-Protein, da es seinem C-Terminus in der ER-Membran verankert ist. Sein luminal lokalisierter C-Terminus besaß einen Opsinhang inklusive einer Glykosylierungsstelle. So konnte eine ER-Membran-Insertion durch eine Glykosylierung und damit einen Anstieg des Molekulargewichts von cyt b5 detektiert werden. Sollten die in Abbildung 22 beobachteten Effekte generelle Schwankungen sein, wären diese auch im Transport des cyt b5 zu erwarten. Träten die Transportdefekte nicht auf, wären die reduzierten Transportraten tatsächlich durch den Mangel an SR α zu erklären. Folglich wären die Substrate SR α -abhängig in ihrem Transport. Abbildung 23 legt die Translokation des cyt b5 nach SR α -Reduktion dar. Die Glykosylierungseffizienz betrug zwischen 92 % (SR α -UTR-siRNA) und 105 % (SR α #2-siRNA). Die Unterschiede zur Kontrolle waren nicht signifikant. Es handelte sich hierbei um wesentlich kleinere Veränderungen der Transportrate verglichen mit der Kontroll-Vesikel-Fraktion als in der zuvor gezeigten Abbildung 22. Daraus lässt sich schließen, dass die in den Transportstudien beobachteten Änderungen der Transporteffizienzen tatsächlich durch die Manipulation der ER-Membranen hervorgerufen wurden und nicht auf experimentellen Schwankungen oder unspezifischen Membraneffekten beruhen.

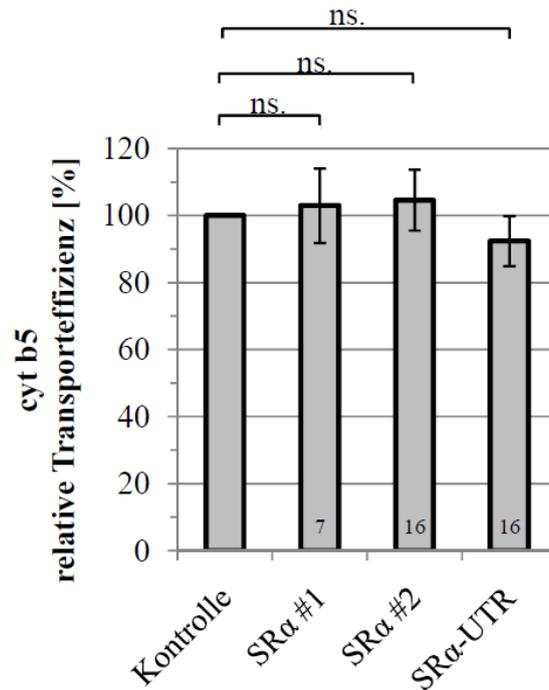


Abbildung 23: Posttranslationaler Proteintransport von cyt b5 ins ER nach SR α -Depletion

HeLa-Zellen wurden 96 h mit 15 nM SR α -siRNA behandelt. Nach der Ernte erfolgte die Präparation zu semi-permeabilisierten Zellen und das cyt b5 wurde unter posttranslationalen Bedingungen in die angegebenen ER-Fractionen importiert. Nach 15 min *in vitro*-Synthese des Vorläuferproteins wurde dieses 30 min mit den ER-Vesikeln inkubiert. Letztendlich erfolgten SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie der Proben. Dargestellt sind der Anteil des reifen Proteins bezogen auf dessen Gesamtsynthese normalisiert auf die Glykosylierungseffizienz der Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Letztere entsprach gleichzeitig der Anzahl der unabhängigen Experimente, in denen die Daten gewonnen wurden. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Transporteffizienzen erfolgte mit dem t-Test (ns.: nicht signifikant; $0,05 > p > 0,01$: *; $0,01 > p > 0,001$: **; $p > 0,001$: ***). Verglichen wurden die Transportraten der Kontrollzellen und den siRNA-manipulierten Zellen.

Zusammengefasst zeigten alle vier getesteten Vorläuferproteine eine mehr oder weniger ausgeprägte Abhängigkeit ihrer Translokation vom Proteinlevel von SR α . Der größte Effekt war bei den Versuchen zum Kontrollsubstrat des cotranslationalen Transports, ppl, zu erkennen. Dennoch schien hier, genauso wie bei Igk und inv ch, für die die SRP-Abhängigkeit ebenfalls aus früheren Publikationen bekannt ist, das restliche SR α auszureichen, um eine gewisse Menge an funktionsfähigem SRP-Rezeptor zu stellen und einen Teil des synthetisierten Vorläuferpeptids zu translozieren. Das Glykoprotein ERj3 scheint ebenfalls in einem gewissen Grad auf den SRP-Weg angewiesen zu sein.

IV.3.4.2. Proteintransport ins ER nach Sec62-Depletion

Nachdem eine Beeinträchtigung des cotranslationalen Transports nach Reduktion des SR α -Levels bestätigt werden konnte, sollten ppl und ERj3 auch in Sec62-depletierte ER-Vesikel transportiert werden. Dies hatte zum einen den Grund, dass ppl als typisches cotranslationales Vorläuferprotein unter der Prämisse, dass Sec62 tatsächlich nur am posttranslationalen Transport beteiligt ist, keine Abhängigkeit zu Sec62 zeigen sollte. Da Sec62 jedoch während der Evolution eine

Ribosomenbindungsstelle dazugewonnen hat (Müller *et al.*, 2009), konnte aber eine Rolle im cotranslationalen Transport nicht ausgeschlossen werden. Das luminaire Glykoprotein ERj3 wurde in die Untersuchungen nach Sec62-Depletion mit eingeschlossen, da 2012 in *in vitro*-Transporten gezeigt wurde, dass ERj3 in seiner Biogenese auf die Anwesenheit von Sec63 angewiesen ist (Lang *et al.*, 2012). Daher war es von Interesse zu überprüfen, ob ERj3 möglicherweise auch Sec62 benötigt, da es auch im Säuger im Komplex mit Sec63 vorliegt (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000).

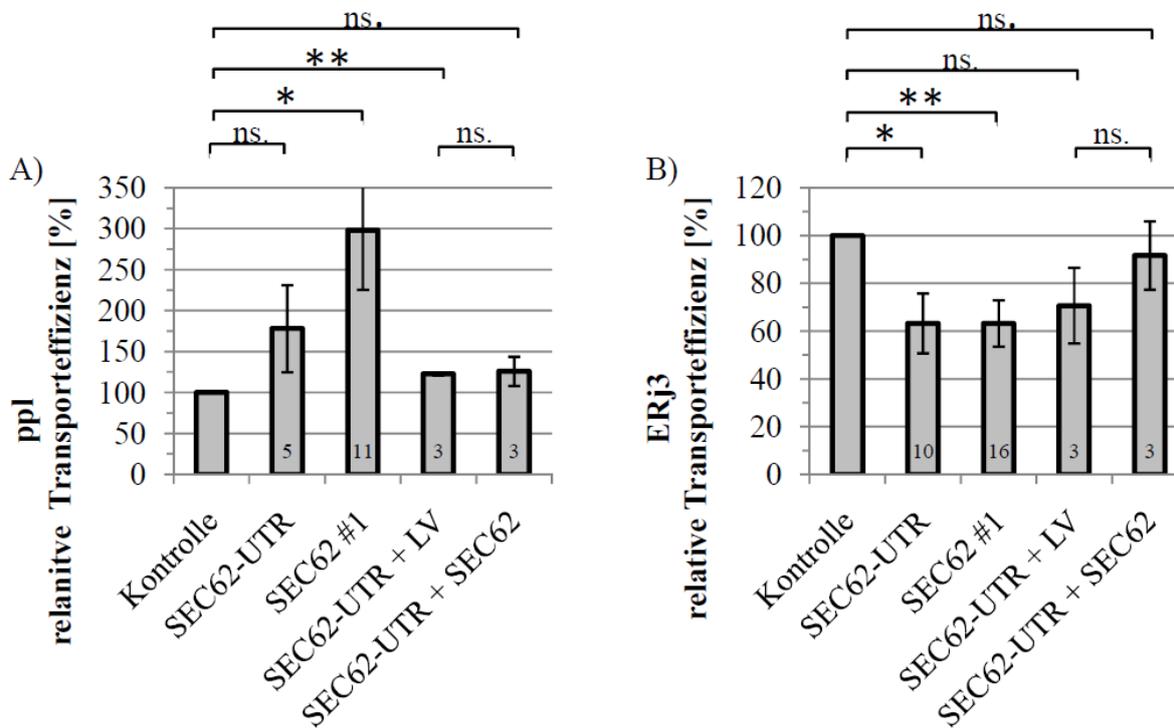


Abbildung 24: Cotranslationale Proteintransporte ins ER nach Sec62-Depletion und Sec62-Rettung

HeLa-Zellen wurden 96 h mit 15 nM Sec62-siRNA behandelt oder nach 72 h zusätzlich mit 2 µg des pcDNA3-Neo-SEC62-IRES-GFP-Rettungsplasmids oder Leervektors (LV) transfiziert. Nach der Ernte erfolgte die Präparation zu semipermeabilisierten Zellen und die angegebenen Vorläuferproteine wurden unter posttranslationalen Bedingungen in die angegebenen ER-Frakturen importiert. Nach 15 min *in vitro*-Synthese des Vorläuferproteins wurde dieses 30 min mit den ER-Vesikeln inkubiert. Letztendlich erfolgten SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie der Proben. Dargestellt sind der Anteil des reifen Proteins bezogen auf dessen Gesamtsynthese normalisiert auf die Prozessierungs-/Glykosylierungseffizienz der Kontrolle. Von Präprolactin (ppl) wird die Signalsequenzen durch die Signalpeptidase abgespalten (A). ERj3 wird zusätzlich durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex glykosyliert (B). Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Letztere entsprach gleichzeitig der Anzahl der unabhängigen Experimente, in denen die Daten gewonnen wurden. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Transporteffizienzen erfolgte mit dem t-Test (ns.: nicht signifikant; 0,05 > p > 0,01: *; 0,01 > p > 0,001: **). Verglichen wurden die Transportraten der Kontrollzellen und den behandelten Zellen. Dabei wurde jede Form der Manipulation berücksichtigt. Außerdem wurden die Transporteffizienzen der Levektor-transfizierten Zellen mit denen der Zellen aus dem Rettungsansatzes verglichen.

Das ppl wurde nach Sec62-Depletion wesentlich besser prozessiert verglichen zur Kontrolle. Dies wurde sowohl für die SEC62-UTR-siRNA (178 ± 53 % (n= 5)) als auch für die SEC62 #1-siRNA (298 ± 73 % (n= 11)) transfizierten SPCs beobachtet, wobei der Sec62-Gehalt unter 14 % lag. Im

letzteren Fall war die Prozessierung signifikant verbessert. Wenn die Zellen nach Sec62-Proteinreduktion zusätzlich mit einem Kontrollplasmid transfiziert worden waren, betrug die Transportrate nur noch 123 %, war aber ebenfalls signifikant verbessert. Nach Transfektion mit dem Sec62-Rettungsplasmid betrug die Prozessierung 126 %. Der Unterschied zwischen den Leervektor-transfizierten Zellen und den Sec62-geretteten Zellen war nicht signifikant. Für das lösliche ERj3 zeigte sich nach Sec62-Depletion eine signifikante Verschlechterung der Translokation in das ER-Lumen auf 63 %. Bei zusätzlicher Transfektion mit dem Kontrollplasmid 24 h vor der Präparation der SPCs wurden 71 % des ERj3 glykosyliert, jedoch war der Unterschied zur Kontroll-ER-Fraktion nicht mehr signifikant. Nach 24stündiger Plasmid-vermittelter Erhöhung des Sec62-Gehalts (14 % auf 220 %) stieg die Glykosylierung auf 92 %. Weder im Vergleich zur Kontroll- noch zu der Leervektor-transfizierten Membran-Fraktion war die Transportrate signifikant verändert. Jedoch konnte auch in diesen Experimenten die Tendenz einer schlechteren Translokation von ERj3 in das ER-Lumen bei Sec62-Mangel und die Aufhebung dieses Effekts durch Rettung des Sec62-Proteins gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach alleiniger Sec62-Depletion ohne jegliche Plasmid-Transfektion der Transport von ppl in das ER signifikant verbessert war, was auf den vorher beobachteten Effekt einer SR α -Proteingehalterhöhung nach Sec62-Depletion zurückzuführen seinkönnte (vergleiche mit Tabelle 50 und Abbildung 20). Die Prozedur des Rettungsexperiments vermindert diesen Effekt. Eine Erklärung hierfür könnte die 24stündige Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsreagenz (FuGENE HD) vor der Zellernte sein. Der SR α -Gehalt war zu dem Zeitpunkt noch auf 140 % erhöht. Mit dem Protein ERj3 konnte hiermit erstmals ein Substrat beschrieben werden, dass über 200 Aminosäuren lang, aber in Abhängigkeit von Sec62 transportiert wurde.

IV.3.4.3. Proteintransport ins ER nach (gleichzeitiger) Sec62- und/oder SR α -Depletion

Im nächsten Schritt wurden Transportstudien in SPCs durchgeführt, aus deren Membranen sowohl Sec62 als auch SR α depletiert wurden.

Damit sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Agiert Sec62 im klassischen cotranslationalen Transportweg oder stellt Sec62 eine parallele Strategie zum SRP-abhängigen Mechanismus in der Biogenese von ERj3 dar? Im letzteren Fall müsste eine gleichzeitige Depletion von Sec62 und SR α zu einem additiven Effekt führen.
2. Ist Sec62 am posttranslationalen Transport von ppcec beteiligt, einem klassischen posttranslationalen Transportsubstrat? Dann müsste im Fall von ppcec unter diesen

Bedingungen ein Transportdefekt zu verzeichnen sein, der durch gleichzeitige Stilllegung des SR α -Gens nicht verstärkt wird.

Nach der gleichzeitigen Limitierung von Sec62 und SR α war die Prozessierung des ppl zum reifen Protein verglichen mit der Kontrolle auf 35 % (SEC62 #1-siRNA + SR α #2-siRNA) bzw. 25 % (SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA) reduziert. Das heißt, die verbesserte Prozessierung des ppl-Proteins nach Sec62-Depletion, welche in Abbildung 24 beobachtet wurde, wird durch die gleichzeitige Limitierung von SR α aufgehoben. Dies ist ein signifikanter Effekt bezogen auf die alleinige Entfernung von Sec62. Wenn man die Werte mit denen der alleinigen SR α -Depletion vergleicht, ist der Unterschied nicht signifikant. Das bedeutet, dass der Transport von ppl wesentlich von SR α abhängt. Zudem sind Sec62 und SR α nicht in der gleichen Transportkaskade involviert.

Das lösliche ER-luminale ERj3 wird nach einzelner RNAi gegen SEC62 oder SR α zu durchschnittlich 55 % glykosyliert (SEC62 #1-siRNA: 55 %, SR α #2-siRNA: 61 %, SR α -UTR-siRNA: 61 %). Sobald beide Proteine wegfielen, sank parallel auch die Prozessierungseffizienz auf etwa 25 %. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der kombinierten Depletion und der einzelnen Transfektion mit der SR α #2-siRNA beobachtet. Der Unterschied zur alleinigen Transfektion mit der SR α -UTR-siRNA ist nicht signifikant, aber die Tendenz, dass eine kombinierte RNAi eine verschlechterte ERj3-Glykosylierung zur Folge hat, ist dennoch zu erkennen. Im Vergleich zur alleinigen Sec62-Depletion führt die kombinierte RNAi generell zu einem reduzierten Transport. Jedoch nur im Vergleich der Transportexperimente mit SEC62 #1-siRNA bzw. SEC62 #1-siRNA + SR α -UTR-siRNA behandelten Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Transportraten. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass durch die gleichzeitige Depletion von SR α und Sec62 tendenziell weniger ERj3 transportiert wird, als wenn nur eines der beiden Proteine fehlt. Folglich handelt es sich dabei um einen additiven Effekt. Dies lässt folgende Schlüsse zu:

1. Sec62 kann den Transport von mehr als 160 Aminosäuren langen Substraten vermitteln.
2. Sec62 agiert in einem SRP-unabhängigen Transportweg, da bei einer Beteiligung in der gleichen Transportkaskade die zusätzliche Wegnahme von SR α keinen additiven Effekt zur Folge hätte.

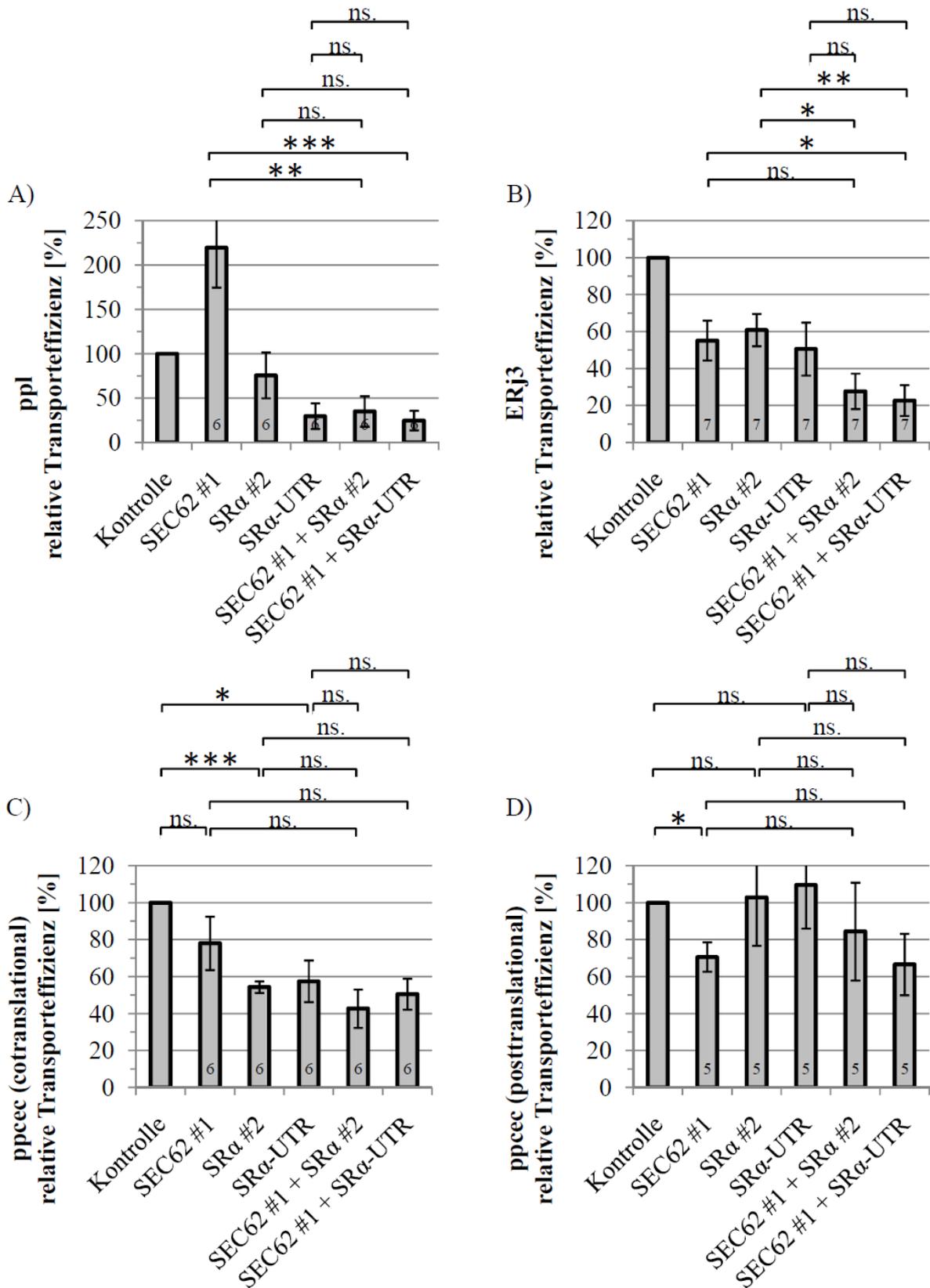


Abbildung 25: Proteintransporte nach gleichzeitiger Sec62- und SRα-Depletion

HeLa-Zellen wurden 96 h mit 15 nM Sec62-siRNA oder 15 nM SRα-siRNA oder einer Kombination beider bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach der Ernte erfolgte die Präparation zu semipermeabilisierten Zellen. Die

angegebenen Vorläuferproteine wurden unter cotranslationalen (A, B, C) oder posttranslationalen (D) Bedingungen in die angegebenen ER-Fractionen importiert. A), B), C) Die *in vitro*-Synthese des radioaktiv-markierten Polypeptids fand unter Anwesenheit der ER-Vesikel statt. D) Nach 15 min *in vitro*-Synthese des Vorläuferproteins wurde dieses 30 min mit den ER-Vesikeln inkubiert. Letztendlich erfolgten SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie der Proben. Dargestellt sind der Anteil des reifen Proteins bezogen auf dessen Gesamtsynthese normalisiert auf die Prozessierungs-/Glykosylierungseffizienz der Kontrolle. Von Präprolactin (ppl) (A) wird die Signalsequenz durch die Signalpeptidase abgespalten, ERj3 (D) und preprocecropin (ppcec) (C und D) werden zusätzlich durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex glykosyliert. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Letztere entsprach gleichzeitig der Anzahl der unabhängigen Experimente, in denen die Daten gewonnen wurden. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Transporteffizienzen erfolgte mit dem t-Test (ns.: nicht signifikant; $0,05 > p > 0,01$: *; $0,01 > p > 0,001$: **; $p > 0,001$: ***). Verglichen wurden die Transportraten der Kontrolle mit denen der mit einer einzelnen siRNA transfizierten Zellen (C und D) bzw. der mit einer einzelnen siRNA behandelten Zellen mit den Transportraten der mit zwei siRNAs manipulierten Zellen (A-D).

Wie verhält es sich nun mit ppcec-Transport unter co- und posttranslationalen Bedingungen? Unter cotranslationalen Bedingungen können sowohl der co- als auch der posttranslationale Transport stattfinden. Bei diesen Bedingungen wurde nach der Reduktion von SR α eine signifikant schlechtere Prozessierung von ppcec gemessen (54 % bzw. 58 %). Ein Mangel an Sec62 führte zu einem nicht signifikant reduzierten Transport von 78 % des ppcec-Proteins. Nach gleichzeitiger Reduktion von SR α und Sec62 wurde eine Prozessierung von 43 % bzw. 51 % gemessen. Dies entspricht in etwa der Transportrate von SR α -depletierten ER-Membranen und ist zu diesen nicht signifikant unterschiedlich. Das heißt, es ist kein signifikanter Unterschied in der Transportfähigkeit zwischen beider Proteine depletierten und nur SR α -depletierten SPCs zu beobachten. Unter posttranslationalen Bedingungen kann nur der posttranslationale Transport stattfinden. Die Depletion von Sec62 reduzierte den ppcec-Transport um ca. 30 %. Verglichen mit der Kontrolle war dieser Defekt signifikant. Die Reduktion von SR α führte zu keiner Beeinflussung der Translokationskompetenz. Eine gleichzeitige Entfernung beider Proteine führte zu einer nicht signifikanten schlechteren Prozessierung des ppcec-Proteins. Keine der beobachteten Translokationseffizienzen war signifikant unterschiedlich zu jenen der beider Proteine depletierten ER-Membranen.

Die Ergebnisse zum Import von ppcec und dessen Maturierung zum reifen Protein durch Abspaltung der Signalsequenz und anschließender Glykosylierung zeigten zum einen, dass ppcec unter cotranslationalen Bedingungen hauptsächlich SR α -abhängig transportiert wird. Zum anderen wurde bewiesen, dass ppcec über einen Sec62-abhängigen, posttranslationalen Transportweg in das ER transloziert wird.

IV.3.5. Zellkulturstudien zum Transport von ERj3 nach RNAi-vermittelter SEC62-Depletion

Das Glykoprotein ERj3 ist ein ER luminales Protein mit einer J-Domäne (Yu *et al.*, 2000), über welches es an das Chaperon BiP binden kann (Bies *et al.*, 2004). Zusätzlich kann es jedoch auch direkt mit Substratproteinen interagieren (Shen und Hendershot, 2005), welche mit Hilfe von BiP während ihrer Translokation ins ER gefaltet werden. Es übt dadurch seine Funktion als Cochaperon von BiP aus und wird ebenso während ER-Stress in seiner Synthese hochreguliert (Nakanishi *et al.*, 2004). Die Proteomstudien aus Tabelle 50 zeigte eine Abnahme des endogenen ERj3-Proteingehalts in der Zelle nach SEC62-siRNA induzierter PTGS. Auch in 240stündigen Kinetiken wurde eine Abnahme des zellulären ERj3-Proteingehalts nach PTGS gegen Sec62 gemessen. Die Minima der ERj3-Proteinmengen traten nach 192 h auf (SEC62-UTR-siRNA: $50 \pm 9\%$ (n= 8); SEC62 #1-siRNA: $33 \pm 6\%$ (n= 7)) (Daten nicht gezeigt). Durch *in vitro*-Transportstudien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Sec62-Protein und der Glykosylierung von ERj3 hergestellt werden (siehe Abbildung 24). Letztendlich sollte auch durch Methoden der Zellkultur bestätigt werden, dass Sec62 am Transport von ERj3 beteiligt ist.

Dazu wurde ERj3 durch RNAi gegen SEC62 über 176 h depletiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit einem Leervektor oder einem ERJ3-codierenden Expressionsplasmid transfiziert und weitere 16 h später wurde das Medium mit 10 μ M MG132 supplementiert. Un- oder fehlgefaltete Proteine werden in der Zelle unter physiologischen Bedingungen durch das Proteasom degradiert (Werner *et al.*, 1996). Da MG132 die proteolytische Aktivität des 26S-Proteasomenkomplexes blockiert (Lee und Goldberg, 1998), führt bei einem blockierten oder reduzierten Transport in das ER der Einsatz von MG132 zur Akkumulation von Vorläuferproteinen im Cytosol. In dem folgenden Versuch wurde untersucht, ob nach Sec62-Depletion mislokalisierter ERj3-Vorläufer detektiert werden kann. Von Interesse war dabei das Verhältnis an auftretendem Vorläufer in der Kontrolle und den Sec62-defizienten Zellen.

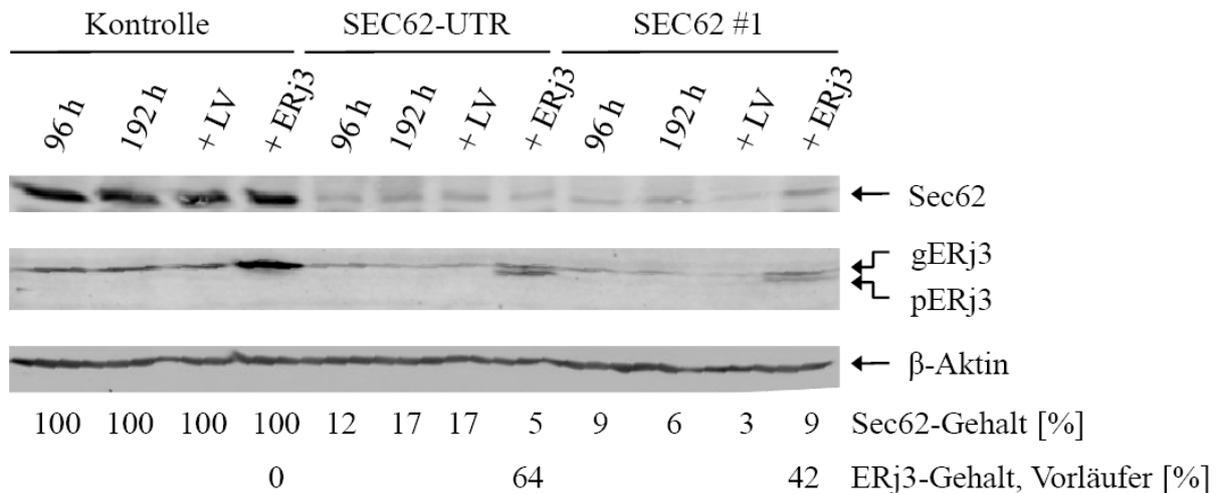


Abbildung 26: Westernblot-Analyse einer ERj3-Überexpression mit anschließender Proteasomeninhibitor-Behandlung nach siRNA-induzierter Sec62-Depletion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit 15 nM SEC62-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Nach 24 h und nach 96 h wurden die Zellen nochmals mit siRNAs nachtransfiziert. Sobald die Zellen 100ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in eine größere Kulturschale umgesetzt, um einen Wachstumsarrest zu vermeiden. Nach 92 h und 192 h wurden Ansätze jeder Zellpopulation geerntet, um eine stete Depletion über den gesamten Versuchsverlauf nachweisen zu können. Die restlichen Ansätze wurden nach insgesamt 176 h RNAi mit einem pcDNA3-Neo-ERj3-IRES-GFP bzw. dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. Weitere 16 h später wurde das Medium mit 10 µM MG132, das in DMSO gelöst war, supplementiert. Nach insgesamt 200 h wurden die Zellen geerntet, in Laemmli-Puffer lysiert, die Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Antikörperdekoration und Fluoreszenzscan wurden die Proteinsignale digitalisiert. Nach densitometrischer Auswertung erfolgte der Abgleich der Sec62-Proteinmenge an β-Aktin und die Normalisierung auf die Kontrollzellen. ERj3 ist als die Menge des akkumulierten Proteins in Bezug auf die Gesamtmenge angegeben. (gERj3: glykosyliertes ERj3; pERj3: Vorläuferform des ERj3 (*precursor*))

Abbildung 26 demonstriert, dass die PTGS über den kompletten Zeitraum des Versuchs zu einer Reduktion des Proteinlevels auf weniger als 18 % für die SEC62-UTR-siRNA und weniger als 10 % für die SEC62 #1-siRNA führte. Parallel ging eine Abnahme der Menge an glykosyliertem, reifem ERj3-Protein einher (gERj3). Nach Transfektion der Kontrolle und der Sec62-depletierten Zellen mit dem Kontrollplasmid (LV), führte dies zu keiner Veränderung der ERj3-Signale (Spuren 3, 7 und 11). Wenn die Zellen mit dem ERj3-Expressionsplasmid transfiziert wurden, erhöhte sich die Menge an reifem ERj3 in der Kontrolle. Auch in den Sec62-defizienten Zellen stieg die Menge an reifem ERj3 leicht an. Jedoch erscheint zusätzlich auch ein ERj3-Signal, das in der Gelelektrophorese unter dem glykosylierten ERj3 läuft. Dies spricht dafür, dass diese Bande zu einer ERj3-Form gehört, die ein kleineres Molekulargewicht als das reife, glykosylierte ERj3 besitzt (pERj3). Durch die Zugabe des MG132 könnte es sich dabei um die nicht translozierte Vorläuferform des ERj3-Proteins gehandelt haben. Im Falle der SEC62-UTR-transfizierten HeLa-Zellen gehörten 64 % der leichteren ERj3-Form an und im Falle der Zellen, die mit SEC62 #1-siRNA-transfiziert worden waren, waren 42 % des ERj3 unglykosyliert. Diese Daten konnten mittlerweile nach 96stündiger RNAi mehrfach von Stefan Schorr bestätigt werden (Universität des Saarlandes, persönliche Mitteilung). Zudem konnte er zeigen, dass nach zusätzlicher Expression eines SEC62-Rettungsplasmids die Menge an akkumuliertem Vorläufer weniger wurde (persönliche Mitteilung).

Zum ersten Mal wurde somit in ganzen humanen Zellen gezeigt, dass eine Depletion des Sec62-Proteins zu einer Mislokalisierung eines Proteins im Cytosol führt. Somit wurden die Daten aus den *in vitro*-Studien experimentell untermauert. Zusammenfassend wurde bestätigt, dass Sec62 auch am Transport großer Proteine beteiligt ist.

IV.4. Untersuchungen der stabil SEC63-shRNA-transfizierten Zelllinien

Nun, da eine Beteiligung von Sec62 am Transport von Proteinen in das ER bestätigt werden konnte, war von Interesse, es zusammen mit Sec63 auszuschalten. Die Begründung ist folgende: Sec62 und Sec63 bilden zusammen mit Sec61 α einen Komplex und kommen im ER in stöchiometrischen Mengen vor (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Dabei könnte während der Proteinsynthese über den Sec62/Sec63-Komplex eine Kommunikation vom Cytosol zum ER-Lumen erfolgen, indem die Information der Ribosombindung an Sec62 über Sec63 an das Chaperon BiP weitergegeben wird. Im Gegensatz zur vorherigen Strategie, bei der zwei unterschiedliche siRNAs kombiniert eingesetzt wurden, wurde nun ein System angestrebt, in dem das Sec63-Protein durch stabile Transfektion mit shRNA-codierenden Plasmiden (*short hairpinRNA*-Plasmide) runterreguliert ist. Auch hier wird die SEC63-mRNA durch den RISC-Komplex degradiert und eine durch den natürlich vorkommenden Umsatz des Proteins hervorgerufene Depletion des Sec63-Proteins aus der Zelle tritt ein. Dies hat den Vorteil, dass vor dem eigentlichen Versuch auf die Transfektion mit siRNAs verzichtet werden kann, da zu jedem angestrebten Zeitpunkt Sec63-depletierte Zellen zur Verfügung stehen. Folglich bestünden definiertere Bedingungen für die geplanten Versuche und eine kostengünstigere Alternative zur RNAi mittels synthetischer siRNAs. Dazu wurden die HeLa-Zellen mit shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert, die eine RNA-Interferenz gegen SEC63 ermöglichten. Zusätzlich befand sich auf dem Plasmid auch ein konstitutiv exprimiertes GFP-Gen, durch welches eine Transfektion der Zellen kontrolliert werden konnte. Es wurden drei monoklonale Zelllinien gewonnen, die mit dem Plasmid #77 transfiziert worden waren (siehe III.2.7.5.1) und in der Fluoreszenzmikroskopie ein deutliches GFP-Signal zeigten. Die Selektion dieser Zellen erfolgte durch Kultivierung in Anwesenheit von 1,5 μ g/ml Puromycin im Kulturmedium.

Die Zelllinien wurden anschließend auf eine erfolgreiche RNAi getestet. Dies erfolgte auf zwei Arten:

1. durch qRT-PCR zum Nachweis einer mRNA-Reduktion
2. durch semiquantitativen Westernblot zum Nachweis einer Proteindepletion

IV.4.1. Analyse des mRNA-Gehalts mittels qRT-PCR der drei stabil SEC63-shRNA-tranfzierten Zelllinien

Die Effektivität der shRNA-vermittelten RNAi gegen SEC63 wurde mittels qRT-PCR analysiert. Diese wurde in der Klinik für Urologie des Uniklinikums des Saarlandes in Zusammenarbeit mit Birgit Klemmer durchgeführt. Außerdem wurden zusätzlich die Mengen weiterer Proteine des Endoplasmatischen Retikulums analysiert, um auszuschließen, dass die shRNA unspezifische oder sekundäre Effekte auf die Translokationskompetenz des ER hat.

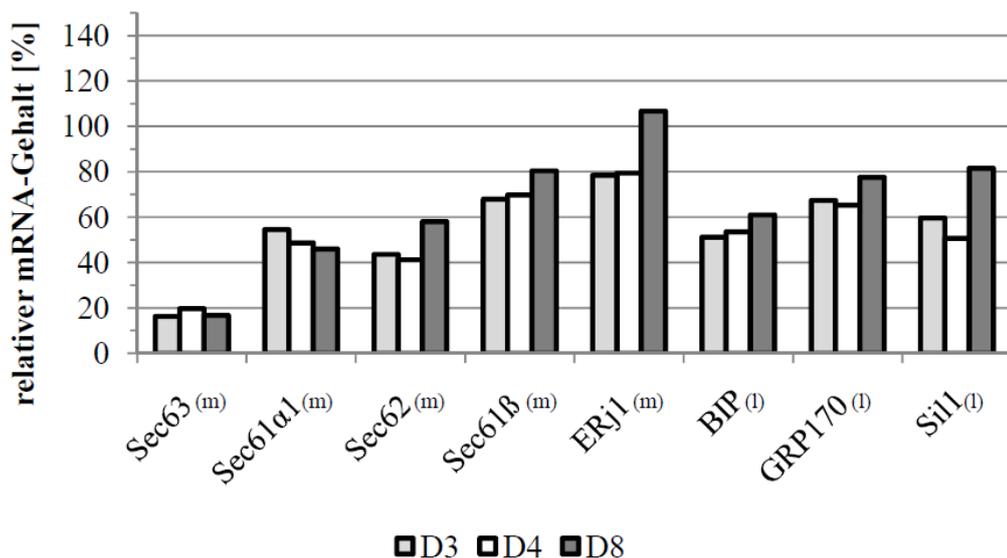


Abbildung 27: Quantitative *real-time* PCR-Analyse der mit shRNA-Plasmiden stabil transfizierten HeLa-Zelllinien zum Nachweis der shRNA-induzierten SEC63-mRNA-Reduktion

Die HeLa-Zellen wurden mit gegen SEC63-mRNA gerichtetem HusH shRNA-Plasmid #77 bzw. dem entsprechenden Leervektor transfiziert und in mit 1,5 µg/ml Puromycin supplementierten Medium kultiviert. Die so selektierten Zellen wurden vereinzelt in Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät und kultiviert, bis genügend Zellen für eine qRT-PCR-Analyse zur Verfügung standen. Auf diese Art entstanden die drei Zelllinien D3, D4 und D8 und die mit dem Leervektor transfizierte Kontrollzelllinie. Die Zellen wurden geerntet und deren RNA mittels des RNeasy Micro-Kits isoliert. Die reverse Transkription erfolgte mit SuperScriptII und Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Nukleotide. Der TaqMan® Gene Expression Assay diente der quantitativen *real-time* PCR für die im Diagramm angegebenen mRNAs. Für den Vergleich der mRNA-Gehalte der Kontrollzelllinie und der stabil SEC63-mRNA reduzierten Zelllinien wurden sogenannte $\Delta\Delta C_T$ -Werte gebildet. Dafür wurden für jede Probe je drei Messung für das Zielgen und das Referenzgen *TATA-box binding protein* durchgeführt und deren Quotient auf den der Kontrollprobe normalisiert. Die Werte wurden daraufhin gemittelt. Durch (m) und (l) wird verdeutlicht, ob die Translation der entsprechenden mRNA zur Synthese eines membranständigen Proteins (m) oder eines luminalen Proteins (l) führt.

Abbildung 27 zeigt die Analyse der mRNA-Gehalte der stabil mit SEC63-shRNA-Plasmiden transfizierten HeLa-Zelllinien in Bezug auf den mRNA-Gehalt der mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzelllinie. Die durch die shRNAs induzierte RNAi führte zu einer Degradation der SEC63-mRNA von mehr als 80 %. Wenig beeinflusst durch die shRNA-Plasmid-Transfektion, bzw. im Rahmen tolerabler Grenzen der qRT-PCR (100 ± 50 %), waren die mRNA-Gehalte der

membranständigen Proteine Sec61 β und ERj1 und der ER-luminalen Proteine BiP, GRP170 und Sil. Grenzwertig erwiesen sich die mRNA-Level der Membranproteine Sec61 α und Sec62. Sie waren in allen drei Zelllinien auf 41 % bis 54 % reduziert und schwankten folglich um den Toleranzwert des mRNA-Gehalts von 50 %.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die durch Transfektion mit dem SEC63-shRNA-Plasmid #77 erhaltenen stabilen Zelllinien effiziente SEC63-mRNA-Degradation aufwiesen. Die mRNA-Level von Sec62 und Sec61 α wiesen eine grenzwertige Regulation und daher nicht zu beurteilende Veränderung auf. Daher war es von Interesse, ob man diese Regulation auch auf Proteinebene beobachten kann. Alle anderen untersuchten mRNAs waren unbeeinflusst.

IV.4.2. Proteomanalyse mittels Westernblot der drei stabil SEC63-shRNA-tranfizierten Zelllinien

Aus den Daten der qRT-PCR-Analyse resultierte die Frage, ob sich auch auf Proteinebene eine Depletion des Sec63-Proteingehalts verzeichnen lässt. Daher wurde per Westernblot-Analyse der relative Sec63-Proteingehalt der stabilen Zelllinien bestimmt.

Analog zur Reduktion des SEC63-mRNA-Gehalts in den SEC63-shRNA-tranfizierten Zellen zeigte sich, bezogen auf die Kontrolle, eine signifikante Reduktion des Sec63-Proteingehalts auf ca. 20 % (siehe Abbildung 28).

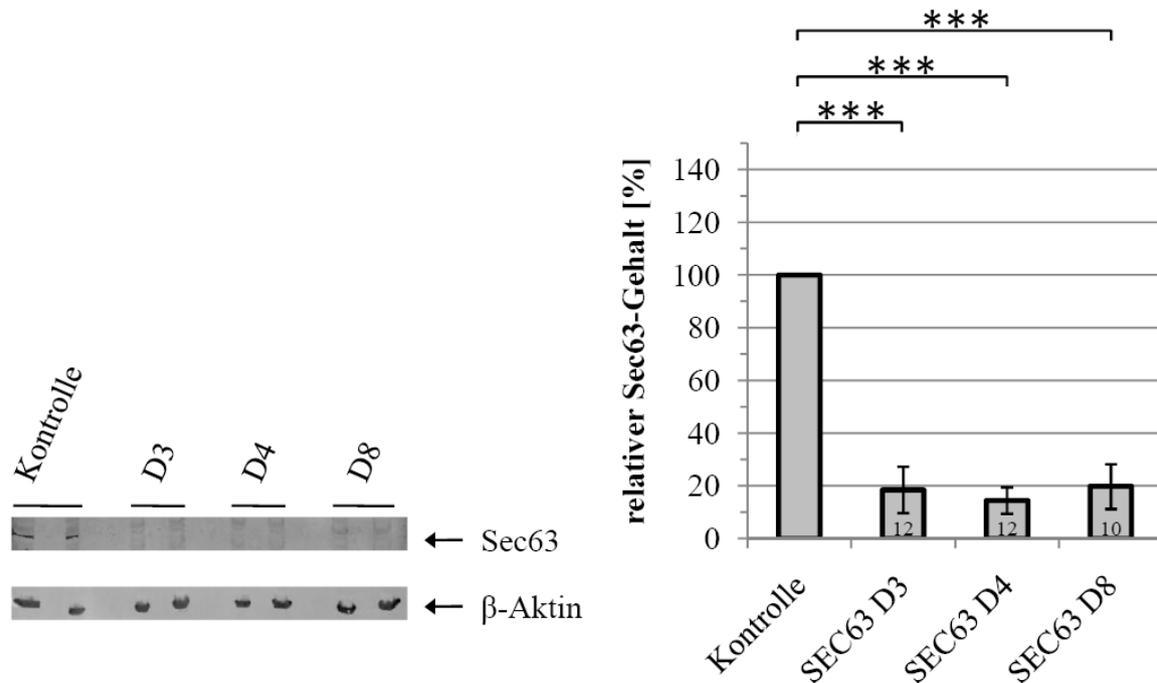


Abbildung 28: Westernblot-Analyse und relativer Proteingehalt der mit shRNA-Plasmiden stabil transfizierten HeLa-Zelllinien zum Nachweis der Sec63-Proteindepletion

Die HeLa-Zellen wurden mit gegen SEC63-mRNA gerichtetem HusH shRNA-Plasmid #77 bzw. dem entsprechenden Leervektor transfiziert und in mit 1,5 µg/ml Puromycin supplementiertem Medium kultiviert. Die so selektierten Zellen wurden vereinzelt in Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät und kultiviert, bis genügend Zellen für eine Westernblot-Analyse zur Verfügung standen. Auf diese Art entstanden die drei Zelllinien D3, D4 und D8 und die mit dem Leervektor transfizierte Kontrollzelllinie. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und nach SDS-PAGE und Westernblot mit Antikörpern gegen Sec63 und β-Aktin dekoriert. Links ist beispielhaft einer der Blots abgebildet. Nach der densitometrischen Auswertung erfolgte ein Abgleich des Sec63-Gehalts auf β-Aktin und eine Normalisierung auf die Kontrollzelllinie. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Zahlen an der Basis der Balken geben die Anzahl der Versuche an (D3 und D4: drei Duplikate und ein Triplikat, D8: zwei Duplikate und ein Triplikat). Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten (p) eines signifikanten Unterschieds zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen erfolgte mit dem t-Test ($p > 0,001$: ***).

Es war ebenfalls von Interesse, ob der Sec62- oder der Sec61α-Proteingehalt verändert ist. Dies wäre nicht auszuschließen, da alle drei Proteine Teil der Translokase sind und somit der Abbau des einen Proteins zu einer Destabilisierung der kompletten Translokase und zum Abbau aller Komplexpartner führen könnte. Zudem zeigte die qRT-PCR aus Abbildung 27 Reduktionen der SEC62- und SEC61α-mRNA-Mengen, die genau den Grenzwert einer Regulation erreichten. Daher wurde ebenfalls eine Westernblot-Analyse auf weitere endoplasmatische und ribosomale Proteine durchgeführt, darunter auch Sec62 und Sec61α.

Tabelle 53: Relativer Proteingehalt [%] der mit shRNA-Plasmiden stabil transfizierten HeLa-Zelllinien zur Bestimmung des relativen Proteingehalts

Die HeLa-Zellen wurden mit gegen SEC63-mRNA gerichtetem HusH shRNA-Plasmid #77 bzw. dem entsprechenden Leervektor transfiziert und in mit 1,5 µg/ml Puromycin supplementiertem Medium kultiviert. Die so selektierten Zellen wurden vereinzelt in Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät und kultiviert, bis genügend Zellen für eine Westernblot-Analyse zur Verfügung standen. Auf diese Art entstanden die drei Zelllinien D3, D4 und D8 und die mit dem Leervektor transfizierte Kontrollzelllinie. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und nach SDS-PAGE und Westernblot mit Antikörpern gegen das Zielprotein und β-Aktin dekoriert.

IV. ERGEBNISSE

Nach der densitometrischen Auswertung erfolgte ein Abgleich des Proteingehalts auf β -Aktin und eine Normalisierung auf die Kontrollzelllinie. Gezeigt sind die Mittelwerte in Prozent inklusive Standardfehler und die Stichprobenzahl. Zahlen an der Basis der Balken geben die Anzahl der Werte an Sofern nicht anders angegeben, entspricht die in Klammern angegeben Stichprobenzahl auch der Anzahl der unabhängigen Experimente. Bei einer Abweichung ist zusätzlich die Zahl der einzelnen Experimente (E) aufgeführt und die darunter befindliche Häufigkeit von technischen Duplikaten (D), technischen Triplikaten (T) oder sechsfachem technischem Replikat (S) genannt. Durch (m) und (l) wird verdeutlicht, ob das Protein membranständig (m), luminal (l) oder ribosomal (r) ist.

	D3		D4		D8		Zahl der aufgetragenen Zellen, Art des sekundären Antikörpers
Sec63^m	19 ± 9	(12) 4 E (3 D, 1 T)	14 ± 5	(12) 4 E (3 D, 1 T)	20 ± 9	(10) 4 E (2 D, 1 T)	300000, Cy5-gekoppelter sAntikörper
Sec61α^m	136 ± 14	(10) 3 E (2 D, 1 S)	145 ± 32	(10) 3 E (2 D, 1 S)	139 ± 26	(8) 2 E (1 D, 1 S)	200000, HRP-gekoppelter Antikörper
Sec62^m	79 ± 10	(12) 4 E (3 D, 1 S)	82 ± 15	(12) 4 E (3 D, 1 S)	98 ± 14	(10) 3 E (2 D, 1 S)	200000, Cy5-gekoppelter Antikörper
SRα^m	87 ± 20	(8) 2 E (1 D, 1 S)	184 ± 17	(8) 2 E (1 D, 1 S)	114 ± 6	(8) 2 E (1 D, 1 S)	300000, Cy5-gekoppelter Antikörper
SRβ^m	110 ± 9	(2) 1 E (1 D)	196 ± 20	(2) 1 E (1 D)	266 ± 30	(2) 1 E (1 D)	300000, Cy5-gekoppelter Antikörper
GRP170^l	104 ± 12	(7) 2 E (1 D; 1 Q)	165 ± 31	(7) 2 E (1 D; 1 Q)	167 ± 34	(7) 2 E (1 D; 1 Q)	200000, Cy5-gekoppelter Antikörper
ERj3^l	94 ± 30	(5) 2 E (1 D, 1 T)	232 ± 75	(5) 2 E (1 D, 1 T)	121 ± 16	(5) 2 E (1 D, 1 T)	300000, HRP-gekoppelter Antikörper
RPL4^r	99 ± 10	(8) 2 E (1 D, 1 S)	110 ± 8	(8) 2 E (1 D, 1 S)	97 ± 8	(8) 2 E (1 D, 1 S)	200000, Cy5-gekoppelter Antikörper

Es wurde untersucht, ob die Transfektion mit SEC63-shRNA-Plasmiden nicht nur zu einer Sec63-Proteindepletion führt, sondern sich unspezifisch oder über sekundäre Effekte auch auf den Gehalt anderer Proteine auswirkt. In Tabelle 53 sind die Westernblot-Analysen der drei stabilen Zelllinien für weitere Proteine, die an der generellen Proteinsynthese der Zelle beteiligt sind, dargestellt. Auch im Westernblot wurde die Schwelle, ab der man von einer Regulation des Proteingehalts spricht, auf $100 \pm 50 \%$ gesetzt. Die Zelllinie D3 zeigte keine deutliche Veränderung auf Proteomebene für die untersuchten Proteine. In den Zelllinien D4 und D8 wurden eine Erhöhung des mit der Translokation und UPR assoziierten Proteins GRP170 (D4: $165 \pm 31 \%$ (n= 7); D8: $167 \pm 34 \%$ (n= 7)) und des Proteins SR β (D4: $196 \pm 20 \%$ (n= 2); D8: $266 \pm 30 \%$ (n= 2)) verzeichnet. SR β vermittelt zusammen mit SR α und dem SRP den RNC zur Translokase im ER. Es sollte beachtet werden, dass für SR β nur zwei Datensätze in die Auswertung mit eingingen. Des Weiteren erhöhten sich in der Zelllinie D4 SR α auf 184% ($\pm 17 \%$ (n= 8)) und ERj3 auf 232% ($\pm 75 \%$ (n= 5)). SR α und ERj3 sind genauso wie SR β und GRP170 ebenfalls in der Ansteuerung des Translokons durch den RNC bzw. in der UPR involviert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transfektion mit den SEC63-shRNA-Plasmiden nicht nur den mRNA-Level von SEC63 reduzierte (siehe Abbildung 27), sondern in einem ähnlichen Ausmaß auch den Proteinlevel senkte. Die Zelllinien D4 und D8 zeigten Anstiege der Proteine der Ansteuerungsmaschinerie bzw. von Proteinen, die in der UPR involviert sind. Die Zelllinie D3 zeigte für keines der weiteren untersuchten Proteine eine Veränderung der Level. Somit steht nun eine Zelllinie bereit, in der man eine gleichzeitige Proteindepletion von Sec62 und Sec63 betrachten kann, wobei nur noch eine Behandlung mit Sec62-siRNA notwendig ist. Dies ist von besonderem Interesse, da zwar eine murine Sec63-*knockout*-Zelllinie vorhanden ist, diese sich jedoch nur sehr schwer transfizieren lässt, sei es mit siRNAs oder mit Plasmiden. Nun jedoch konnte diese Zelllinie imitiert werden, wobei man diese gewonnen stabilen HeLa-Zellen nach dem gewohnten Protokoll mit Sec62-siRNAs bzw. gegebenenfalls auch mit dem Sec62-Rettungsplasmid transfizieren kann. Im Vergleich zu den *Knockout*-Zellen darf man jedoch den restlichen Sec63-Proteingehalt von 20 % nicht vergessen. Somit eröffnen sich nun die Möglichkeit, den Transport von Modells substraten unter gleichzeitiger Reduktion beider Proteine zu betrachten. Zuerst sollte aber auch hier getestet werden, ob sich die Viabilität oder das Proteom der Zellen verändert, wenn man zusätzlich Sec62 entfernt. Interessant wäre es auch, den Proteingehalt anderer ERj-Proteine, wie z.B. ERj1, zu analysieren. ERj1 vereint beide Charakteristika des Sec62/Sec63-Komplexes: es besitzt eine Ribosomenbindestelle wie Sec62 und eine J-Domäne wie Sec63 (Müller *et al.*, 2009). Wie auch für Sec62 beschrieben, inhibiert ERj1 bei Bindung des Ribosoms die Proteinsynthese, wenn BiP ungebunden ist (Benedix *et al.*, 2010). So wird eine Koordinierung der Synthese und der Faltung im Lumen bewerkstelligt. Dies ist besonders für solche Ribosomen sinnvoll, die nach vollständiger Proteinsynthese nicht vom ER dissoziieren und folglich rasch eine erneute Proteinsynthese starten können (Potter und Nicchitta,

2000). Auf Grund der Ähnlichkeiten wäre vorstellbar, dass ERj1 die Funktion des Sec62/Sec63-Komplexes übernimmt und seine Proteinmenge nach deren gleichzeitiger Reduktion erhöht wird. Dies könnte auch erklären, warum ein Funktionsverlust von Sec63 durch Mutation im Menschen zu polycystischer Lebererkrankung führt jedoch nicht zum letalen Phänotyp aus Hefe (Davila *et al.*, 2004; Sadler *et al.*, 1989; Young *et al.*, 2001). Aber auch der Anstieg anderer Proteine, die eine J-Domäne besitzen wäre denkbar. Diese Fragen gilt es zukünftig zu klären, wobei die erstellte Zelllinie attraktive Möglichkeiten aufbietet.

V. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion des Sec62-Proteins im Säuger analysiert. Dazu wurden unterschiedliche Depletionsstrategien etabliert. Nachdem das SEC62-Gen, das SR α -Gen oder beide gleichzeitig effizient stillgelegt wurden, wurden die so manipulierten Zellen auf ihre Zellteilung, ihre Viabilität und ihre Proteostase untersucht. Daraufhin wurden unterschiedliche Modellsubstrate in *in vitro*-Studien auf ihre Translokationseffizienz in das ER der manipulierten Zellen analysiert. In einer differentiellen Proteomanalyse sollten Proteine identifiziert werden, die nach Sec62-Depletion von PC3-Zellen reduziert vorliegen. Außerdem wurde in einer Komplementationsstudie getestet, ob das humane Sec62 die Funktion seines Hefeorthologs Sec62p ausüben kann. Die gewonnenen Daten werden im Folgenden diskutiert.

V.1. Depletion von SR α mittels RNAi in HeLa-Zellen

Auf Grund seiner Homologie zum Hefe-Sec62p wird für das Säuger-Äquivalent ebenfalls eine Beteiligung im posttranslationalen Transport postuliert. In *in vitro*-Translokationsstudien können posttranslationale Transportbedingungen artifiziell hergestellt werden, indem man das Transportsubstrat erst nach vollständiger Beendigung der Synthese zu den ER-Membranen hinzugibt. In Zellkulturversuchen ist dies jedoch nicht möglich. Um die Funktion von Sec62 auch im Säuger näher definieren zu können, war ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, Sec62 durch Methoden der Zellkultur an humanen Zelllinien zu analysieren. Daher wurde eine siRNA-vermittelte Strategie etabliert, durch die der cotranslationale Transport in den HeLa-Zellen möglichst effizient unterbrochen wird. Zunächst wurde die Effizienz des PTGS auf Proteinebene quantifiziert. Anschließend wurden die Mengen anderer Proteine analysiert, um Nebeneffekte der SR α -Reduktion ausschließen zu können. Es folgten die phänotypische Zellcharakterisierung bezüglich Zellviabilität und Zellwachstum. Letztendlich wurde verifiziert, ob die Depletion von SR α tatsächlich den cotranslationalen Transport unterbinden konnte.

V.1.1. Etablierung einer effizienten RNAi-Strategie gegen SR α

Nach 96stündiger Behandlung mit einer der drei siRNAs gegen die mRNA von SR α war der Proteingehalt der HeLa-Zellen auf 15 % bis 18 % verglichen mit Kontrollzellen reduziert (siehe Tabelle 51). In diesen Experimenten wurde darauf geachtet, dass die generellen Standards der Verwendung von siRNAs in Zellkulturexperimenten, welche schon in der ersten Publikation bezüglich RNAi in Säugerzellen eingeführt wurden, eingehalten werden (Elbashir *et al.*, 2001a). Dazu gehörte zum Einen, dass die Kontrollzellen ebenfalls einer siRNA-Behandlung unterzogen wurden, um

unspezifische Effekte auf Grund der Transfektionsprozedur ausschließen zu können. Zum anderen wurde darauf geachtet, dass mehrere siRNAs gegen SR α getestet wurden, um auch hier sicherzustellen, dass beobachtete Phänotypen durch mehrere siRNAs verifiziert werden. Sollte der Phänotyp nur unter Verwendung einer der siRNAs auftreten, wäre dies ein unspezifischer Effekt auf Grund der jeweiligen siRNA-Sequenz. Zudem wurden unterschiedliche siRNA-Konzentrationen ausgetestet, um eine möglichst geringe Konzentration zu ermitteln, die bereits eine zufriedenstellende Depletion der HeLa-Zellen einleitet (15 nM). Dies ist insofern wichtig, da hingegen der früheren Meinung auch kurze, 21 Nukleotide lange siRNAs durchaus eine Immunantwort in den Zellen auslösen können. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig (Fedorov *et al.*, 2006; Kariko *et al.*, 2004; Persengiev *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2006). Es stellte sich heraus, dass nach 96 h RNAi ein relativer Restproteingehalt von weniger als 20 % erreicht wurde. Diese Werte reihen sich somit in die Erfahrungen früherer siRNA-Strategien der Arbeitsgruppe Zimmermann ein. So hat sich für die Depletion der ER-Membranproteine Sec63 (3 TMDs) und Sec61 α (10 TMDs) eine siRNA-Konzentration von 10 nM bzw. 20 nM bei einer Behandlungszeit von 96 h als ausreichend erwiesen (Lang *et al.*, 2012). Der Anstieg des Proteingehalts in Abbildung 16 B demonstriert die transiente Wirkweise der RNAi. Daher ist es von großer Bedeutung, bei längeren Beobachtungszeiträumen die Zellen regelmäßig erneut mit synthetischen siRNAs zu transfizieren.

Weiterhin wurde ein Konstrukt erstellt, durch das der SR α -Gehalt gerettet werden konnte. Nach 24stündiger Expression des Rettungsplasmids pcDNA3-Neo-SR α -IRES-GFP konnte der Proteingehalt von 15 % (SR α -UTR-siRNA + Leervektor) auf 129 % angehoben werden (siehe Abbildung 7). Auch dies stellt eine elementare Kontrolle für die Spezifität von Depletionsstudien dar. Ein Phänotyp lässt sich nur dann 100 %ig auf den Verlust eines speziellen Proteins zurückführen, wenn man den Phänotyp im Zuge eines Rettungsexperiments aufheben kann.

V.1.2. Die Depletion von SR α reduziert das Zellwachstum, ist jedoch nicht letal

Nachdem bestätigt wurde, dass die gewählte siRNA-Strategie die gewünschte SR α -Depletion zur Folge hat, wurden die HeLa-Zellen auf Phänotypen untersucht. Da 20 % bis 40 % des eukaryotischen Genoms für Proteine codiert, die in das ER transloziert werden müssen (Chen *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2010; Kaufman, 1999; Wallin und von Heijne, 1998), war von Interesse, ob in HeLa-Zellen das SR α -Protein als zentraler Teil des cotranslationalen Transports essentiell ist. Als einer der ersten verfolgte Harborth per PTGS in humanen Zellen die Frage, ob ein Protein essentiell ist (Harborth *et al.*, 2001). In Anlehnung an jene Publikation, wurde auch in dieser Arbeit als Kriterium dafür, ob SR α essentiell ist, unter anderem das Zellwachstum in einer 192stündigen Kinetik beobachtet (siehe Abbildung 17).

Während anfänglich die Zellzahl der depletierten Zellen vergleichbar mit jener der Kontrolle war, wurde mit der Zeit eine wesentliche Diskrepanz ersichtlich. Letztendlich konnten nach 192 h weniger als 50 % im Vergleich zur Kontrolle geerntet werden. Im Falle der SR α #2-siRNA war der Effekt noch deutlicher ausgeprägt. Aus diesem Grund wurde das Zellwachstum zusätzlich mit dem xCELLigence-System einer Echtzeitanalyse unterzogen. Diese Daten zeigten hingegen keinen Wachstumsarrest (siehe Abbildung 19).

Eine Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass sich der SR α -Gehalt im Laufe der Echtzeitanalyse wieder regeneriert hat und die Wachstumsreduktion aufgehoben wurde. Dies ist wahrscheinlich, da die Bestimmung des Zellindex nach insgesamt 96stündiger siRNA-Behandlung begann und für weitere 48 h erfolgte, die RNAi also insgesamt 144 h umfasste, ohne dass die Zellen erneut transfiziert wurden. Unterstützt wird diese Theorie durch Abbildung 12 und Abbildung 16 B, die zeigen, dass sich bei fehlender Nachtransfektion die Mengen an Sec62 oder SR α wieder regenerieren. Ein reduziertes Zellwachstum würde sich daraufhin ebenfalls wieder erholen.

Diese These könnte man testen, indem man eine Echtzeitanalyse durchführt, nachdem die Zellen nach 96stündiger RNAi erneut mit SR α -siRNA transfiziert wurden. So würde gewährleistet, dass der SR α -Gehalt während der Zellindexbestimmung durchgehend minimiert ist. Sinnvoll wäre auch ein Rettungsexperiment, in dem nach erneuter SR α -siRNA-Transfektion die Zellen mit einem SR α -Expressionsplasmid transfiziert würden, um daraufhin über 96 h den Zellindex zu bestimmen. Sollte sich zeigen, dass der Zellindex bei SR α -Mangel weniger schnell ansteigt als in der Kontrolle und dieser Effekt durch Expression des Rettungsplasmids aufgehoben werden, würde dies auf elegante Weise und mit großer Zuverlässigkeit nochmals die Abhängigkeit der Zellteilung auf das SR α -Protein demonstrieren.

Weitere Daten, die in dieser Arbeit nicht gezeigt wurden, bestätigen, dass SR α für eine ungehinderte Zellteilung nötig ist. So wurde in sechs Experimenten einer Endzeitbestimmung nach 96stündigem PTGS eine reduzierte Zellteilung bei SR α -Mangel beobachtet. In diesen Experimenten war das Wachstum der SR α #2-siRNA und der SR α -UTR-siRNA behandelten Zellen signifikant auf 65 % bzw. 70 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Diese Beobachtung wird durch Experimente eines Kollegen, in der die Zellzahl nach 96stündiger SR α -Depletion der HeLa-Zellen mit SR α -UTR-siRNA bestimmt wurde, gestützt (Stefan Schorr, Universität des Saarlandes, persönliche Mitteilung).

Im letzten Jahr wurden zwei weitere im cotranslationalen Transport involvierten Proteine darauf untersucht, ob sie in HeLa-Zellen essentiell sind (Lang *et al.*, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Lang konzentrierte sich auf das Sec61 α -Protein auf Grund dessen zentraler Stellung im Proteintransport (Lang, 2012; Lang *et al.*, 2012). In diesem Fall konnte innerhalb der ersten 72 h der Kinetik ebenfalls kaum ein Unterschied im Wachstum der Kontroll-siRNA behandelten Zellen und der Zellen mit

Sec61 α -Mangel beobachtet werden. Danach jedoch ging die Zellzahl der depletierten Zellen zurück, was für ein Absterben der Zellen sprach. Zusätzlich nahm bei reduziertem Sec61 α -Gehalt die Viabilität, welche ebenfalls mit dem *Countess® automated Cell Counter* bestimmt wurde, nach 96 h auf durchschnittlich 75 % ab. Cappel und Schäuble untersuchten das Chaperon BiP auf dessen essentiellen Charakter. Auch hier wurde in HeLa-Zellen beobachtet, dass es nach 48stündiger BiP-Depletion zu einem Proliferationsarrest kommt und die Zellen mit der Zeit sterben (Schäuble *et al.*, 2012). Sowohl für Sec61 α als auch für BiP wurde daraus geschlussfolgert, dass diese Proteine in HeLa-Zellen essentiell sind. Verglichen damit sprechen die in dieser Arbeit nach SR α -Depletion erhobenen Daten nicht dafür, dass SR α ein essentielles Protein in HeLa-Zellen ist, da die Zellzahl zwar weniger stark anstieg verglichen zur Kontrolle, jedoch nicht ab einem gewissen Zeitpunkt zurückging.

Diese Beobachtung reiht sich in die Daten früherer Publikationen ein. In einigen Organismen sind Komponenten des cotranslationalen Proteintransports essentiell. Dies gilt z.B. für die SRP54-Homologe der Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Yarrowia lipolytica* (Althoff *et al.*, 1994; He *et al.*, 1990) und für das SRP54-Homolog in *E. coli*, Ffh (Phillips und Silhavy, 1992). Für SRP54 in *S. cerevisiae* oder Proteine des cotranslationalen Transports in Säugerzellen scheint dies jedoch nicht zuzutreffen (Aza-Blanc *et al.*, 2003; Lakkaraju *et al.*, 2007; Lakkaraju *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2004). Die Hefe *S. cerevisiae* kann trotz der Deletion von SRP54 weiterhin wachsen, wenn auch reduziert (Amaya und Nakano, 1991; Hann und Walter, 1991). Eine wichtige Voraussetzung für den nicht letalen Phänotyp in *S. cerevisiae* ist, dass die Zellen genügend Zeit haben, um an den SRP-Mangel adaptieren zu können (Mutka und Walter, 2001; Ogg *et al.*, 1992). Bei abruptem Abfall der SRP-Konzentration führt dies daher zu einem letalen Phänotyp (Ogg und Walter, 1995; Stirling *et al.*, 1992). Grund für die Adaption bei SRP54-Mangel ist, dass *S. cerevisiae* durch eine erhöhte Expression an Hsp-Chaperonen und eine reduzierte Synthese von ribosomalen Proteinen das eigentliche Problem, nämlich die Mislokalisierung und Akkumulation neusynthetisierter Proteine, beheben kann. Durch die Chaperone werden vorerst mislokalisierte Proteine in einem translokationskompetenten Zustand gehalten, bis die generelle Proteinsynthese sich soweit reduziert hat, dass trotz geringem cotranslationalem Transport, die neusynthetisierten und die mislokalisierten Proteine in das ER transloziert werden können. HeLa-Zellen zeigen bei stabiler Depletion von SRP14, SRP54 oder SRP72 keine Wachstumsdefekte (Lakkaraju *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2004). Dass es bei Depletion von SR α jedoch zu einem reduzierten Wachstum führt, könnte dadurch erklärt werden, dass die Verfügbarkeit von SR α der limitierende Faktor der Direktion vom RNC zur ER-Membran darstellt (Lakkaraju *et al.*, 2008). Folglich könnte die Depletion von SR α eine größere Auswirkung auf das Zellwachstum haben, als die Depletion der Komponenten des SRPs.

In 2012 wurde eine ähnliche RNAi-Studie bezüglich SR α von Lakkaraju *et al.* veröffentlicht (Lakkaraju *et al.*, 2012). Der Unterschied bestand jedoch darin, dass die HeLa-Zellen nicht mit synthetischen siRNAs transfiziert wurden, sondern mit plasmidcodierten shRNAs. Somit exprimierten die Zellen während der Analyse kontinuierlich die shRNA. Um auf die transfizierten Zellen selektieren zu können, wurden nach 24stündiger Transfektion die HeLa-Zellen mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin inkubiert. Nach insgesamt 72stündiger shRNA-Expression wurden die Zellen geerntet und per Westernblot-Analyse die SR α -Menge sichtbar gemacht. Auf Grund der Abbildungen wird gefolgert, dass der Proteingehalt in etwa dem der Experimente dieser Arbeit entsprach. Dementsprechend scheint das Maß der SR α -Reduktion dieser Arbeit in dem experimentell erreichbaren Rahmen zu liegen und eine weitere Reduktion nicht zu erreichen zu sein.

V.1.3. Die Depletion von SR α hat keinen Einfluss auf die Mengen anderer Proteine, die in der Proteinbiogenese beteiligt sind

Wie bereits in V.1.2 erwähnt, kommt es in *S. cerevisiae* nach Depletion des SRPs zu einer Adaption, die eine Veränderung verschiedener Proteinlevel zur Folge hat (Arnold und Wittrup, 1994; Mutka und Walter, 2001). So wurden z.B. Proteine der Proteinsynthese (wie die Disulfidisomerase), des Energiestoffwechsels, des Metabolismus, der Transkription und der DNA-Replikation mehrheitlich als reduziert gefunden, wohingegen von 31 untersuchten Chaperonen 30 in ihrer Menge erhöht waren. So stiegen nach SRP54-Inaktivierung in einer temperatursensitive *S. cerevisiae*-Mutante die Mengen an Hsp70p sehr rasch an, aber auch Hsp82p, Hsp104p und Kar2p wurden nach ca. 5 h vermehrt gefunden (Arnold und Wittrup, 1994) Auch Proteine der Proteindegradation waren in ihren Proteinleveln erhöht (Mutka und Walter, 2001).

Daher war es ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob eine ähnliche Adaption auf die reduzierte Proteintranslokation auch nach SR α -Depletion auftritt. Ausserdem musste ausgeschlossen werden, dass weitere membranständige oder luminal ER-Proteine bei SR α -Mangel in ihren Mengen abnehmen. Dies hätte möglicherweise indirekte Effekte zur Folge, die fälschlicherweise direkt auf den SR α -Mangel zurückgeführt werden würden. So wäre z.B. eine Reduktion des Sec61 α -Gehalts denkbar, da Sec61 α als integrales Membranprotein auf SR α in seiner Biogenese angewiesen sein könnte. Wenn dies der Fall wäre, wären weitere Membranproteine und ER-luminale Proteine in ihrer Biogenese beeinflusst, da diese Sec61 α für ihre Membranintegration und Translokation in das ER-Lumen benötigen (Lang, 2012; Lang *et al.*, 2012). Somit würde fälschlicherweise geschlussfolgert, dass diese Proteine auf SR α angewiesen wären, obwohl sie eigentlich Sec61 α benötigen, das durch den SR α -Mangel vermindert vorläge. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass keines der untersuchten Proteine nach 96stündiger siRNA-Manipulation beeinflusst war (siehe Tabelle 51).

Darunter befanden sich Proteine der Translokase, ER-Stress induzierte Proteine und ribosomale Proteine der großen und der kleinen Untereinheit. Daten nach 72stündiger shRNA-Behandlung gegen SR α von Lakkaraju *et al.* bestätigen diese Ergebnisse bezüglich Sec61 α und Sec62 (Lakkaraju *et al.*, 2012). Dies befürwortet eine 96stündige RNAi vor Beginn von Translokationsstudien, seien sie nun *in vitro* an semipermeabilisierten HeLa-Zellen oder durch Experimente der Zellkultur, wie z.B. Akkumulationsstudien von Vorläuferproteinen oder Analysen sezernierter Proteine in das Kulturmedium.

V.1.4. Die Depletion von SR α reduziert den Transport cotranslationaler Modellsubstrate

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Transporte wurde überprüft, ob die erreichte SR α -Depletion einen Effekt auf den cotranslationalen Transport hat. Dies war in sofern wichtig, da die Depletion von SR α zukünftig auch in Zellkulturversuchen genutzt werden soll, um dort die cotranslationale Translokation zu unterbinden. Dazu wurden drei Modellsubstrate eingesetzt, für die die SRP-Abhängigkeit bereits bekannt war: ppl, ein typisches Modellssubstrat des cotranslationalen Transports (Jungnickel und Rapoport, 1993; Kurzchalia *et al.*, 1986; Lakkaraju *et al.*, 2008), das Typ II Plasmamembranprotein invariante Kette (inv ch) des Klasse II Haupthistokompatibilitätskomplexes (Lipp *et al.*, 1987; Martoglio *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 1999) und das Immunglobulin leichte Kette (Ig κ) (Ainger und Meyer, 1986; Lipp *et al.*, 1987). In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigten alle drei getesteten Vorläuferproteine eine Abhängigkeit in ihrer Translokation vom Proteinlevel von SR α . Die Rettungsexperimente bestätigen, dass durch die Depletion von SR α der cotranslationale Transport beeinträchtigt wurde. Jedoch war der Translokationsdefekt bei SR α -Defizit nicht absolut. Unabhängig von den experimentellen Bedingungen oder der Strategie der SR α -Reduktion beträgt die Effizienz der ppl-Prozessierung 40 % bis 60 % nach SR α -Reduktion verglichen zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen (je nach eingesetzter SR α -siRNA), denn auch Lakkaraju *et al.* verzeichneten nach SR α -Depletion noch eine 55 %ige Prozessierung von ppl (Lakkaraju *et al.*, 2012). In diesen Experimenten wurde der SR α -Gehalt in HeLa-Zellen durch Transfektion mit shRNA-Plasmiden reduziert (restlicher Proteingehalt nicht genannt). Folglich gibt es für diese Substrate entweder einen alternativen, wenn auch weniger effizienten, SR α -unabhängigen Transportweg oder der vorhandene geringe Level an SR α reicht aus, um gewisse Mengen an ppl, inv ch und Ig κ zu translozieren. Dies steht wieder im Kontext dazu, dass der SR α -Gehalt der limitierende Faktor des cotranslationalen Transports ist (Lakkaraju *et al.*, 2008).

V.2. Untersuchungen zur Funktion von Sec62

V.2.1. Das humane Sec62-Protein kann in *Saccharomyces cerevisiae* die Funktion des Hefeorthologs Sec62p übernehmen

Mit Hilfe einer Komplementationstudie in einer temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Mutante (Deshaies und Schekman, 1990) galt es zu klären, ob das Sec62-Protein des Säugers in Hefe die gleiche Funktion ausüben kann wie sein Hefeortholog Sec62p. Auf Grund eines Proteintranslokationsdefekts kann die Hefemutante bei Kultivierung bei der nicht-permissiven Temperatur von 37 °C nicht wachsen. Den letalen Phänotyp konnte in einer früheren Studie schon das Sec62-Protein aus *Drosophila melanogaster* komplementieren (Noel und Cartwright, 1994). Nachdem die Synthese des humanen Sec62-Proteins durch die Zugabe von Galaktose induziert worden war, konnte die Hefemutante ebenfalls bei 37 °C wachsen (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Dies impliziert, dass das humane Sec62-Protein in *S. cerevisiae* die Funktion des Hefeorthologs ausüben kann. Folglich hindern die zusätzlichen, positiv geladenen Oligopeptide in seinem N-Terminus das humane Sec62 nicht daran, auch den posttranslationalen Transport zu vermitteln. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Daten von Lakkaraju *et al.*, welche zeigten, dass das Sec62 in HeLa-Zellen den posttranslationalen Transport in das ER bewerkstelligt (Lakkaraju *et al.*, 2012). Neben dem Beweis, dass das humane Sec62 den posttranslationalen Transport vermitteln kann, wäre nun von Bedeutung zu überprüfen, ob das humane Sec62 wie auch sein Hefeortholog die Signalsequenz des Transportsubstrats bindet. Dementsprechend wären Quervernetzungsstudien oder Split-Ubiquitin-Experimente an HeLa-Zellen sinnvoll, wie sie bereits für den Nachweis der Signalsequenzinteraktion mit dem Hefeortholog Sec62p durchgeführt wurden (Dünnwald *et al.*, 1999; Müsch *et al.*, 1992; Plath *et al.*, 1998).

V.2.2. Die Depletion von Sec62 reduziert das Zellwachstum der HeLa-Zellen, ist jedoch nicht letal

Nach den in V.1.2 beschriebenen Kriterien wurde auch nach Sec62-Depletion die Zellviabilität und das Zellwachstum betrachtet, um eine Aussage darüber treffen zu können, ob SEC62 ein essentielles Gen ist. Diese Frage war von besonderem Interesse, da das Hefeortholog Sec62p in *S. cerevisiae* essentiell ist. Zudem konnten Lakkaraju *et al.* zeigen, dass Sec62 in HeLa-Zellen ebenfalls am posttranslationalen Transport beteiligt ist (Lakkaraju *et al.*, 2012). Von daher war nicht auszuschließen, dass HeLa-Zellen ebenfalls das Sec62-Protein zum Überleben benötigen. Parallel dazu wurde ebenfalls das Chaperon BiP depletiert, da dieses bereits als essentiell in HeLa- und PC3-

Zellen beschrieben wurde (Cappel, 2011; Schäuble *et al.*, 2012). Es diente folglich als positive Kontrolle.

In einer 192stündigen Kinetik stellte sich heraus, dass HeLa-Zellen entweder mit einem Bruchteil der eigentlichen Menge an Sec62 überlebensfähig sind oder das Sec62-Protein in diesen Zellen nicht essentiell ist. Dennoch war bei Sec62-Mangel das Wachstum der Zellen wesentlich reduziert (ca. 40 % der finalen Zellzahl der Kontrolle, siehe Abbildung 17 A). Somit bewegt sich der Wachstumsdefekt nach Sec62-Depletion in einem ähnlichen Bereich wie der nach SR α -Depletion (siehe Abbildung 17 C). Die Viabilität war hingegen von dem Sec62-Mangel vollkommen unbeeinflusst. Dies wurde zum einen mit dem *Countess® automated Cell Counter* gemessen (siehe Abbildung 17 B), als auch unter Einsatz eines Färbereagens, der eine Diskriminierung zwischen toten und lebenden Zellen zulässt, bestätigt (siehe Abbildung 18). Der Einsatz des *Countess® automated Cell Counter* scheint rückblickend eher ungeeignet, um nach Depletion eines Proteins analysieren zu können, ob dieses in der untersuchten Zelllinie essentiell ist. Diese Schlussfolgerung wurde gezogen, da auch für die BiP-depletierten Zellen die so ermittelte Viabilität kaum unter 80 % lag (siehe Abbildung 17 B). Das Nuclear-IDTM-Reagenz erwies sich hingegen als geeignet, da diese Methode schnell und unkompliziert verlässliche Daten zur Viabilität liefert. Im Vergleich zur Lebendzellzahl, die mit Hilfe des Nuclear-IDTM-Reagenz ermittelt wurde, und zur Wachstumskurve nach PTGS gegen BiP scheint Sec62 in HeLa-Zellen nicht essentiell zu sein. Der Wachstumsarrest wurde ebenfalls von Lakkaraju beobachtet, wenn er den Sec62-Gehalt über 120 h durch die Expression von shRNAs reduzierte (Lakkaraju *et al.*, 2012). Dementsprechend scheint der Verlust des Sec62-Proteins eine Auswirkung auf die Zellteilung der Zellen zu haben.

V.2.3. Die Depletion von Sec62 führt zu einer vermehrten Synthese der Untereinheiten des SRP-Rezeptors

Rund ein Drittel aller eukaryotischen Proteine müssen im Zuge ihrer Biogenese die Translokase des ERs passieren (Kaufman, 1999). Da das Sec62-Protein mit dem Sec61-Komplex assoziiert ist (Meyer *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2009; Wang und Johnsson, 2005) und sowohl in der Hefe (Deshaies *et al.*, 1991; Deshaies und Schekman, 1989) als auch im Säuger am posttranslationalen Transport beteiligt ist (Lakkaraju *et al.*, 2012), stellte sich die Frage, ob dessen Depletion in HeLa-Zellen zu Veränderungen der Proteinhomöostase führt, insbesondere was andere Proteine der Proteinbiogenese betrifft. Dies war von Interesse, da Transportstudien nach Sec62-Depletion durchgeführt wurden. Daher wurden nach Sec62-Depletion per Westernblot-Analyse die relativen Mengen verschiedener Proteine des ERs, der ER-Stressantwort und des Ribosoms verglichen zu Kontrollzellen bestimmt (siehe Tabelle 50).

Wie sich herausstellte, waren Sec61 α und Sec63 in ihrem Level unverändert. Daher war sichergestellt, dass die Translokase an sich durch den Mangel an Sec62 nicht destabilisiert und anschließend degradiert wird. Dieser Effekt wurde zum Beispiel nach RNAi gegen SEC61 α beobachtet. Lang *et al.* zeigten, dass nach siRNA-vermittelter Sec61 α -Depletion auch ein Rückgang an Sec61 β und Sec61 γ beobachtet wurde (Lang *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde bei Mangel an Sec62-Protein ein Anstieg der Untereinheiten des SRP-Rezeptors festgestellt. Der Gehalt von SR α war unter Verwendung beider siRNAs auf fast 190 % erhöht, der Gehalt von SR β sogar auf über 200 %. Somit führt der Mangel an Sec62 zu einer vermehrten Synthese von Komponenten des SRP-abhängigen, cotranslationalen Transportweges. Da die Mengen an SR α (wenn auch nur langsam) zurückgingen, wenn der Sec62-Gehalt wieder hergestellt wurde, scheint ein gewisser Regelkreis zwischen den Mengen an Sec62 und SR α zu bestehen. Die Zelle könnte bei Störung des Sec62-abhängigen Transports versuchen, den SRP-abhängigen Transport als Kompensierung hochzufahren. Lakkaraju *et al.* konnten zeigen, dass der SRP-Rezeptor, vornehmlich dessen Untereinheit SR α , den limitierende Faktor im SRP-abhängigen Transportweg darstellt (Lakkaraju *et al.*, 2008). Ferner beobachteten Lang *et al.* einen Anstieg der Untereinheiten des SRP-Rezeptors und des Ribosoms, wenn das Sec61 α -Protein in seinen Mengen reduziert wurde (Lang, 2012). Zusammengefasst scheint die Zelle also die Zielsteuerung zur Translokase so effektiv wie möglich gestalten zu wollen, wenn die Translokase plötzlich den limitierenden Faktor in der Proteinsynthese darstellt. Gleiches wäre durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten im Falle eines Sec62-Mangels denkbar. Dies wäre jedoch nur dann von Belang, wenn die posttranslationalen Sec62-Transportsubstrate auch einen SRP-abhängigen Transportweg durchlaufen könnten (Abbildung 29). Für ppcec konnte dies bereits in Transportstudien in raue Hundepankreas-RMs beobachtet werden (Schlenstedt *et al.*, 1990; Zimmermann *et al.*, 1990a) und die Daten dieser Arbeit deuten daraufhin, dass unter cotranslationalen Bedingungen der Transport von ppcec in semipermeabilisierte HeLa-Zellen SR α -abhängig ist (siehe V.3.2). Ferner konnte auch für die posttranslational zur ER-Membran transportierten TA-Proteine Synaptobrevin und Sec61 β , welche unabhängig vom Sec61-Komplex in die ER-Membran inseriert werden, eine Interaktion mit SRP nachgewiesen werden (Abell *et al.*, 2004). Dies zeigt erneut, dass die posttranslationale Direktion zum ER SRP und dessen Rezeptor nutzen kann (Borgese und Righi, 2010; Lang, 2012; Lang *et al.*, 2012).

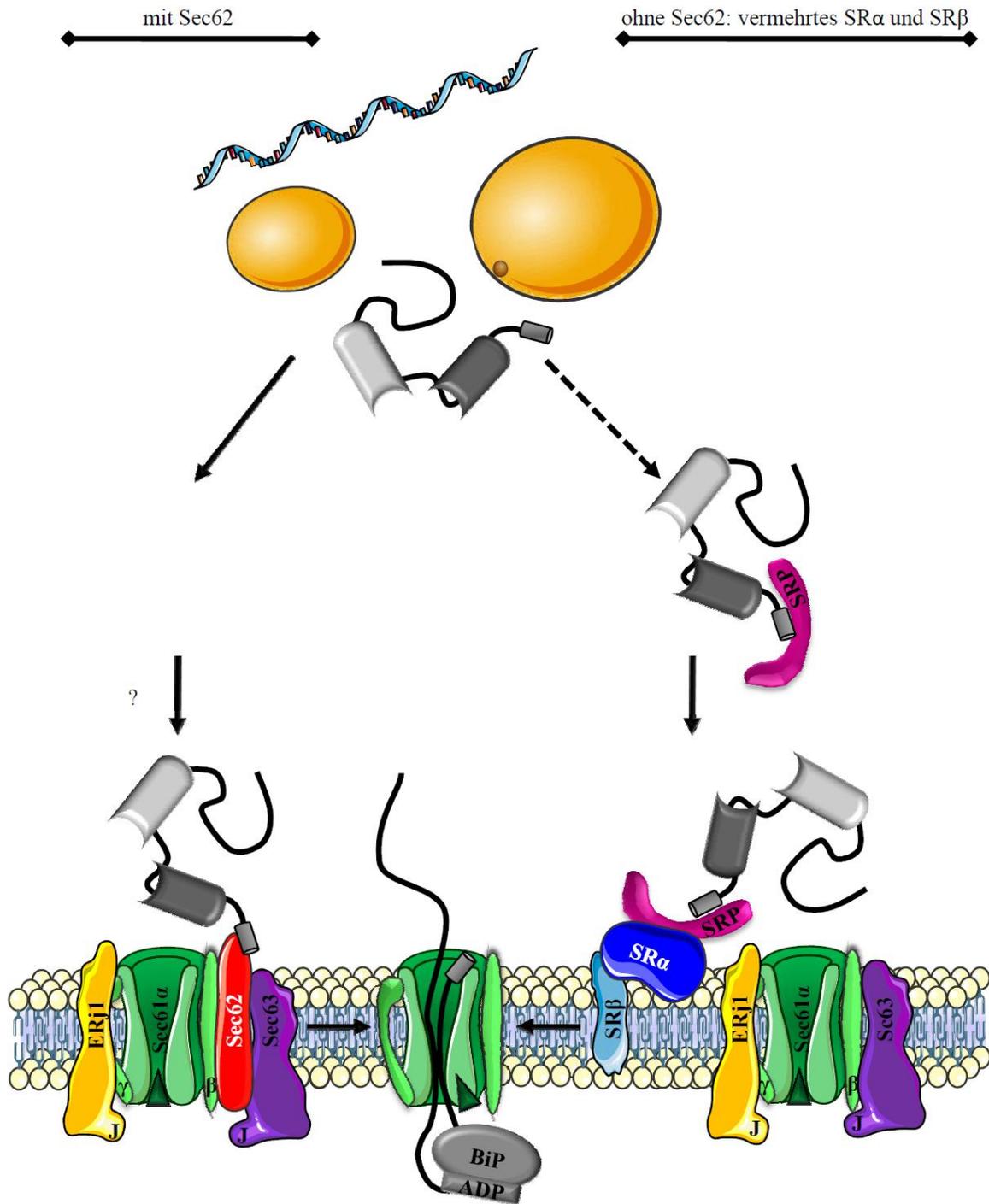


Abbildung 29: Modell eines kompensatorischen Transportweges über SRP und seinen Rezeptor bei Mangel von Sec62

Laut diesem Modell werden die posttranslationalen Sec62-Substrate über einen noch unbekanntem Weg (?) zum ER dirigiert und an die Translokase übergeben. Unter Sec62-Mangel ist dieser Weg verhindert. Die Zelle erhöht bei Sec62-Mangel die Synthese des SRP-Rezeptors, um einen unter physiologischen Bedingungen ungenutzten SRP-abhängigen Transportweg (daher gestrichelt dargestellt) in seiner Effizienz zu erhöhen.

Daher ist es sinnvoll, in Zukunft strikt zwischen SRP-abhängigen und cotranslationalem Weg zu unterscheiden. Denn auch wenn ein Substrat, wie z.B. Sec61 β , mit SRP interagiert und durch die Interaktion von SRP und dem SRP-Rezeptor zur Membran dirigiert wird, wird dieses nicht

unweigerlich auch cotranslational in die ER-Membran inseriert. Da das Sec62-Protein im Säuger durch seine zwei positiven Oligopeptide zudem mit Ribosomen interagieren kann (Müller *et al.*, 2009), wäre ebenso möglich, dass eine Untergruppe der Sec62-Transportsubstrate SRP-abhängig, cotranslational transportiert wird und dass daher bei Sec62-Mangel der SRP-Rezeptor vermehrt synthetisiert wird.

Lakkaraju *et al.* haben nach shRNA-vermittelter Sec62-Depletion ebenfalls die Level von translokations-assoziierten Proteinen analysiert (Lakkaraju *et al.*, 2012). Dazu zählten ebenfalls Sec63, Sec61 α , SR α , SR β und BiP. Keines der genannten Proteine war in seiner Menge verändert. Dies mag daran liegen, dass sie bereits nach 72stündiger RNAi die Proteomanalyse durchgeführt haben. Daher wäre es sinnvoll, eine Kinetik der Sec62-Depletion durchzuführen und parallel den SR α - bzw. SR β -Level zu bestimmen. Von Interesse wäre, ab welchem Punkt die SR α und SR β -Mengen zunehmen. Genauso interessant wäre es, nach Sec62-Rettung die zeitliche Abnahme von SR α und SR β zu betrachten. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Westernblot-Analyse des Rettungsexperiments grundsätzlich 24 h nach Transfektion mit dem Rettungsplasmid. Dies erklärt auch, warum der SR α -Gehalt nach Sec62-Rettung zwar abnimmt, aber nicht sein Ausgangsniveau erreicht: Das Zeitfenster von 24 h ist schlicht nicht lang genug, dass durch den natürlichen Umsatz der Level des SR α -Proteins wieder auf 100 % sinken kann (Chu und Doyle, 1985). Daher wäre es sinnvoll, den SR α -Gehalt über 96 h nach Sec62-Rettung kontinuierlich zu betrachten.

Letztendlich konnte beobachtet werden, dass ERj3 bei reduziertem Sec62-Gehalt ebenfalls in seinen Mengen zurückging. Folglich scheint es auf Sec62 in seiner Biogenese angewiesen zu sein. Diese Beobachtung wird später unter Berücksichtigung der weiteren Daten zur ERj3-Biogenese in einem eigenen Kapitel (siehe V.2.6) behandelt.

V.2.4. Die Depletion von Sec62 verbessert den Transport von ppl

Nach Depletion von Sec62 wurde ein verbesserter Transport von ppl beobachtet (siehe Abbildung 24 A). Ppl interagiert über seine sehr effiziente Signalsequenz (Kang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2002) mit SRP54 und ist als klassisches cotranslationales, SRP-abhängiges Transportsubstrat beschrieben (Krieg *et al.*, 1986; Kurzchalia *et al.*, 1986). Daher wäre als Modell möglich, dass von dem Anstieg an SR α und SR β , der nach Depletion von Sec62 beobachtet wurde (siehe Tabelle 50) unbeabsichtigt der Transport von ppl besonders stark profitiert. Diese These könnte mit zwei Methoden geprüft werden:

1. Auch für andere cotranslationale Substrate, wie inv ch und Ig κ , sollte getestet werden, ob diese vermehrt prozessiert/glykosyliert werden, wenn die Sec62-Menge reduziert ist.

2. Nach artifizieller Erhöhung der SRP-Rezeptor-Menge in HeLa-Zellen sollte analysiert werden, ob ppl erneut effizienter transloziert wird. Wichtig ist in diesem Ansatz, dass nicht nur SR α vermehrt zur Verfügung gestellt wird. Lakkaraju *et al.* konnten zeigen, dass nur die gleichzeitige Erhöhung des SR α - und SR β -Levels zu einer Verbesserung der Sekretion führt (Lakkaraju *et al.*, 2008). Daher könnte ein durch Irmi Sinning zur Verfügung gestelltes pET16b-Plasmid eingesetzt werden (Schlenker *et al.*, 2006). Dieses codiert das humane SR α (Aminosäuren 1 bis 130) und das murine SR β (Aminosäuren 58 bis 269, die N-terminale TMD fehlt) als Fusionsprotein.

Auf den ersten Blick scheint es, als sei die vermehrte Prozessierung von ppl aufzuheben, wenn die Zellen nach der Sec62-Depletion zusätzlich mit einem Sec62-Expressionsplasmid transfiziert wurden. Man beachte jedoch, dass verglichen zur alleinigen Transfektion mit Sec62-siRNAs die ppl-Prozessierung auch nach Sec62-Depletion und anschließender Transfektion mit einem Kontrollplasmid reduziert ist, obwohl auch in diesem Fall der relative SR α -Gehalt auf 217 % erhöht ist. Wie bereits in IV.3.4.2 erwähnt, scheint die 24stündige Inkubation der HeLa-Zellen mit dem Transfektionsreagenz FuGENE HD die vermehrte Prozessierung von ppl zu stören. Schon häufiger wurde beobachtet, dass FuGENE HD unspezifische Effekte auf die Zellen ausübt. Zum Beispiel wurde nach Sec62-Depletion ein erhöhter Calciumefflux aus dem ER gemessen. Dieser Effekt konnte jedoch in keinem Rettungsexperiment untersucht werden, da schon allein die Inkubation mit FuGENE HD nach Sec62-Depletion den Calciumausstrom reduzierte (Stefan Schorr, Universität des Saarlandes, persönliche Mitteilung). Neben den oben bereits genannten Methoden, um den Zusammenhang zwischen dem Sec62-Mangel und der vermehrten ppl-Translokation zu bestätigen, sollte auch das Sec62-Rettungsexperiment wiederholt werden. Jedoch müsste die Transfektionsmethode geändert werden. Zum einen könnten andere Transfektionsreagenzien, wie z.B. Lipofectamin, getestet werden, zum anderen könnten aber auch andere Transfektionsmethoden eingesetzt werden, wie die Calciumphosphat-Methode oder das Elektroporieren. Dadurch bestünde die Hoffnung, dass die ppl-Prozessierung ähnlich wie bei mit Sec62-siRNA manipulierten Zellen auch nach Sec62-Depletion und Kontrollvektor-Transfektion eine vermehrte ppl-Prozessierung zeigt und daraufhin ein größerer Unterschied zwischen Sec62-Depletion und Sec62-Rettung beobachtet werden kann.

V.2.5. Interpretation der Proteomanalyse nach Sec62-Depletion mittels 2D-DIGE

Mittels der differentiellen 2D-Gelelektrophorese (2D-DIGE) sollten im Rahmen dieser Arbeit Proteine gefunden werden, die in ihrer Biogenese auf Sec62 angewiesen sind. Damit die potentiellen Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Proteomen möglichst ausgeprägt waren, wurden PC3-Zellen bei regelmäßiger Nachtransfektion für 240 h in Kultur gehalten. Wie schon für die HeLa-Zellen

beschrieben, zeigte sich auch für die PC3-Zellen, dass sie sich bei Sec62-Mangel weniger häufig teilten, die Zellen aber nicht starben (siehe Abbildung 13). Folglich ist Sec62 auch in PC3-Zellen kein essentielles Protein.

Da es sich bei der 2D-DIGE um eine sehr komplexe Technik handelt, wird zunächst die Qualität des analysierten 2D-Gels diskutiert. In dem durchgeführten Experiment konnten auf einem 26 cm auf 20 cm (520 cm²) großen 2D-Gel mindestens 2713 Fluoreszenzsignale detektiert werden, je nachdem welches der sechs Gele man betrachtete. Wittman-Liebold postuliert, dass man auf einem 40 cm auf 30 cm (1200 cm²) großen 2D-Gel 5000 bis 10000 Proteine (*spots*) auftrennen kann (Wittmann-Liebold *et al.*, 2006). Dies entspricht 4,2 bis 8,3 Proteine pro cm² Gel. Somit liegt die Signaldichte des durchgeführten 2D-DIGE-Gels mit 5,2 Proteinen pro cm² Gel genau in dem zu erwartenden Spektrum. Durch die Zusammenfassung der Anzahl detektierter Proteine aus den letzten sechs 2D-Veröffentlichungen in den Fachzeitschriften *Proteomics* und *Journal of Proteomics* fand Moritz heraus, dass zwischen 549 und 1755 Signale gezählt werden konnten, wobei es sich um unterschiedliche Arten der Proteindetektion handelte (Moritz, 2012). Wie zu erwarten war die sensitivste Methode die Fluoreszenzdetektion der DIGE und enthielt, mit den bereits erwähnten 1755 Signalen, die meisten detektierten Proteine. In dieser Arbeit konnten fast 1000 Signale mehr gemessen werden, was für eine hohe technische Qualität des eigenen Experiments spricht.

Wie verhält es sich mit der Vertrauenswürdigkeit der als reguliert gefundenen Proteine? Es handelte sich exklusiv um Proteine, die mit dem Cytoskelett in Verbindung gebracht werden können. Dies ist insofern zu beachten, da in den Westernblot-Analysen die Quantifizierung der relativen Proteinmengen ausschließlich über den Abgleich der Aktinmengen erfolgte, auch in den Westernblot-Analysen, in denen Sec62 quantifiziert werden sollte. Relativiert wird diese Beobachtung dadurch, dass weder im Rahmen dieser Arbeit noch anderen Kollegen in Westernblot-Analysen nach Sec62-Depletion von PC3 oder HeLa-Zellen eine Abnahme des Aktinsignals aufgefallen ist, die die Regulation um -1,7 in den DIGE-Gelen bestätigen würde. Zudem wurde auf Grund des beschriebenen Zusammenhangs zwischen Migrations- und Invasionsfähigkeit von PC3- und HEK-Zellen und ihrem Sec62-Proteingehalt (Greiner *et al.*, 2011a; Linxweiler *et al.*, 2012) bereits durch Markus Greiner das Cytoskelett nach Sec62-Depletion analysiert. Laut den betrachteten Mikroskopiebildern nach FITC-Phalloidin-Färbung ist eine Veränderung des Aktincytoskeletts unwahrscheinlich. Es stellt sich daher weiterhin die Frage, warum gerade diese Proteine als reguliert identifiziert worden waren, obwohl zumindest für Aktin die Regulation nicht durch die RNAi gegen Sec62 hervorgerufen wurde. Es wurde in Betracht gezogen, dass es Proteine geben könnte, die in differentiellen 2D-Proteomanalysen häufiger falsch-positiv als reguliert gefunden werden. Diese Hypothese wird durch eine Übersichtspublikation mit dem ungewöhnlichen Titel „*Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed protein*“ unterstützt. Petrak *et al.* fassten alle 2D-DIGE-

Analysen an humanem, Ratten- und Mausegewebe aus den Ausgaben 4 bis 6 (2004 bis 2006) der Fachzeitschrift *Proteomics* zusammen und erstellten eine Liste der vorrangig als differentiell vorgefundenen Proteine. Die in Tabelle 49 aufgeführten Proteine fallen in eben diese Kategorie. In 40 % der analysierten Studien an humanem Gewebe wurden Annexine als reguliert identifiziert und rangieren daher auf Platz 2 der am häufigsten gefundenen Proteinfamilien. Auf Platz 4, und in knapp einem Drittel aller betrachteten Studien als reguliert beschrieben, ist Aktin zu finden. Ferner wurden besonders häufig Hsp-Chaperone in regulierten Mengen gefunden, wodurch auch die Regulation des mitochondrialen Hsp60 erklärt werden kann. Somit ist auszuschließen, dass der Verlust des Sec62-Proteins tatsächlich zu einer Umstrukturierung des Cytoskeletts führt, obwohl eine Verbindung des Sec62-Gehalts und der Regulation des Cytoskeletts andererseits eine attraktive Erklärung bieten würde, warum die SEC62-überexprimierenden Tumorzellen eine erhöhte Aggressivität in ihrem Migrations- und Invasionsverhalten aufweisen (Greiner *et al.*, 2011a).

Letztendlich bleibt die Frage zu klären, warum per 2D-DIGE kein mögliches Sec62-Translokationssubstrat identifiziert wurde. Besonders interessante Kandidaten wären hierbei membranständige, ER-luminale und sekretorische Proteine. Bis zum heutigen Zeitpunkt liefert die 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) die größte Auftrennung unter den gelbasierten elektrophoretischen Separationsmethoden. Auch die Kombination mit einer Fluoreszenzmarkierung der Proteine zur parallelen Auftrennung zweier Proteome auf einem Gel (Unlü *et al.*, 1997) hat die Möglichkeiten und Detektionsgrenzen weiterhin verbessert (Corthals *et al.*, 2000; Lilley *et al.*, 2002; Rabilloud *et al.*, 1990; Viswanathan *et al.*, 2006). So können weniger als 1 fmol eines Proteins detektiert werden, während der lineare Messbereich enorm groß ist. Dennoch birgt die 2D-PAGE eine gravierende Limitierung in der Analyse von hydrophoben Proteinen (Rabilloud, 2009; Santoni *et al.*, 2000; Wilkins *et al.*, 1998). Der isoelektrische Punkt (pI) hydrophober Proteine liegt meist im basischen Bereich (Wilkins *et al.*, 1998), aber gerade bei einem pH von mehr als 8 wird die 2D-PAGE unscharf (Görg *et al.*, 1997). Zudem besitzen die zwitterionischen und nicht-ionischen Detergenzien, welche während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) eingesetzt werden, generell eine geringe Solubilisierungseigenschaft und gerade am pI ist die Löslichkeit von Proteinen in einer wässrigen Lösung am geringsten (Santoni *et al.*, 2000; Zahedi *et al.*, 2005). Folglich tendieren besonders die hydrophoben Membranproteine während der IEF dazu auszufallen und können nur suboptimal von der 1. auf die 2. Dimension überführt werden. Die Konsequenz ist, dass die Membranproteine in den 2D-Gelen stark unterrepräsentiert sind (Eravci *et al.*, 2008). Es ist folglich nicht verwunderlich, dass in den analysierten Gelstückchen keine Membranproteine gefunden wurden, obwohl man erhoffte, gerade solche reguliert vorzufinden. Die Tatsache, dass das Sec62-Protein nicht detektiert werden konnte, verdeutlicht nochmals die Problematik der Membranproteinanalyse per 2D-PAGE. Allein auf Grund des Fakts, dass Sec62 durch die vorherige RNAi auf durchschnittlich 9 % in jeweils einem der Proteome pro Gel reduziert worden war, hätte dessen Fluoreszenzsignal als signifikant reguliert

vorgefunden und durch die massenspektrometrische Analyse identifiziert werden müssen. Dies spricht dafür, dass Sec62 wahrscheinlich nicht in die 2. Dimension überführt worden war. Nun mag die Frage aufkommen, warum dann nicht ER-luminale Proteine, wie z.B. BiP vorgefunden wurden. Die Proteomanalyse per Westernblot in Tabelle 50 ergab keine Regulation des BiP-Proteingehalts nach Sec62-Depletion, auch wenn dieser quantitative Vergleich an HeLa- und nicht an PC3-Zellen durchgeführt worden war. Jedoch erklärt dies nicht, warum ERj3 in der 2D-DIGE-Analyse nicht reduziert vorgefunden worden war.

Auf Grund der Probleme, die die Membranproteine in der 2D-PAGE mit sich bringen, wurde eine abgewandelte 2D-Methode entwickelt, welche sich als starkes Werkzeug in der Membranproteinanalyse herausstellte (Macfarlane, 1989). Während die 2. Dimension weiterhin eine SDS-PAGE beinhaltet, wird die IEF durch eine gelbasierte, elektrophoretische Auftrennung der Probe unter Anwesenheit des kationischen Detergenz Benzyltrimethyl-N-hexadecylammonium-chlorid (BAC) ersetzt. Durch die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Proteine bei Lösung in verschiedenen Detergenzien kommt es so zu einer diagonalen Verteilung der Proteine auf dem 2D-BAC/SDS-Gel. In dieser Arbeit wurde versucht, die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der zu vergleichenden Proteome mit der Technik der 2D-BAC/SDS-PAGE zu kombinieren und damit eine differentielle 2D-BAC/SDS-PAGE zu entwickeln. Jedoch führten technische Schwierigkeiten zu einer unbefriedigenden Auftrennung (Daten nicht gezeigt).

Letztendlich wurde entschieden, die Suche nach unterrepräsentierten Proteinen nach Sec62-Depletion mittels stabiler Isotopenmarkierung durch Aminosäuren (*stable isotope labeling with amino acids*, SILAC) anzugehen (Ong *et al.*, 2002). Der Vorteil des SILAC-Verfahrens ist, dass bereits etablierte Methoden eingesetzt werden können, die unterschiedlich siRNA-behandelten Zellen (Kontroll-siRNA bzw. SEC62-siRNA) lediglich in Medien kultiviert werden müssen, die mit den unterschiedlichen Isotopen einer Aminosäure versetzt worden sind. Beide Proteome können anschließend zusammen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die angefärbten Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert werden. Somit entstehen Massenspektren, die auf Grund der unterschiedlichen Isotopenmarkierung eine definierte Massenverschiebung aufweisen. Der Vergleich der Signalintensitäten der Spektren gibt einen Hinweis auf die Abundanz des jeweiligen Proteins in dem dazugehörigen Proteom. So können Proteine identifiziert werden, die nach Sec62-Depletion verringert vorzufinden sind und dementsprechend Transportsubstrate von Sec62 sein könnten. In ersten Versuchen mit der SILAC-Technik wurde ERj3 in verringerten Mengen aufgefunden, während die Mengen von SR α und SR β nach PTGS gegen SEC62 anstiegen (Markus Greiner, persönliche Mitteilung). Somit konnte er ERj3 ebenfalls als Sec62-abhängig identifizieren und einen Zusammenhang zwischen dem Sec62-Gehalt dem Level an SR α bzw. SR β herstellen (siehe V.2.6), was die Daten dieser Arbeit mit einer zusätzlichen Methode stützt.

V.2.6. Die Biogenese von ERj3 ist abhängig von Sec62, bei dessen Mangel weicht die ERj3-Biogenese auf einen SR α -abhängigen Weg aus

Die Translokationsstudien nach SR α -Depletion implizieren eine Beteiligung von SR α in der Biogenese des Glykoproteins ERj3 (siehe Abbildung 22). Jedoch ist nach 96stündigem PTGS keine Abnahme des endogenen ERj3-Gehalts zu verzeichnen (siehe Tabelle 51). Somit spricht der eine experimentelle Ansatz für eine SR α -abhängige Biogenese von ERj3 und die andere experimentelle Vorgehensweise gegen eine SR α -Abhängigkeit. Die Daten der Proteomanalysen werden jedoch zusätzlich von weiteren Zellkulturmethoden gestützt (Daten nicht gezeigt).

1. In HeLa-Zellen war nach SR α -Depletion, Transfektion mit einem ERj3-Expressionsplasmids und anschließender Inhibition des Proteasoms keine Akkumulation des ERj3-Vorläufers zu beobachten (eigene Daten nicht gezeigt und Stefan Schorr, persönliche Mitteilung). Nur die glykosylierte Form wurde detektiert. Folglich konnte der ERj3-Vorläufer trotz SR α -Depletion effizient in das ER-Lumen transloziert, prozessiert und glykosyliert werden.
2. Viele ER-Chaperone werden während ER-Stress in ihrer Transkription hochreguliert (Lee *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 1997; Rutkowski und Kaufman, 2004). Unter anderem kann für ERj3 eine erhöhte mRNA-Menge und eine vermehrte Synthese beobachtet werden (Shen und Hendershot, 2005). Daher wurde in HeLa-Zellen unter SR α -Mangel der ERj3-Proteingehalt nach 24stündiger ER-Stressinduktion analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass trotz SR α -Depletion nach ER-Stress (1 μ M Thapsigargin) der ERj3-Gehalt weiterhin auf mehr als das 3fache anstieg (Daten nicht gezeigt).

Wie ist also die Diskrepanz zu den Transportstudien zu erklären? Warum scheint der ERj3-Transport, beobachtet durch die Glykosylierungseffizienz, in den *in vitro*-Translokationsstudien eine gewisse Abhängigkeit von SR α zu haben? Die Erklärung muss in den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen liegen. Zwei Möglichkeiten werden im Folgenden aufgezeigt.

Während die gängige Theorie besagt, dass die Ribosomen nach Beendigung der Proteinsynthese von der ER-Membran dissoziieren, um im Cytosol einen neuen Translationszyklus zu beginnen, bis sie durch das SRP wieder zur ER-Membran dirigiert werden (sofern ein sekretorisches oder membranständiges Protein synthetisiert wird), hat Nicchitta eine Alternative aufgezeigt. Seine Studien belegen, dass Ribosomen auch nach der Translokation an der ER-Membran assoziiert bleiben können und dort unabhängig vom SRP-Rezeptor die Synthese beginnen und das Protein in das ER translozieren können (Nicchitta, 2002; Potter und Nicchitta, 2000; Potter *et al.*, 2001; Seiser und Nicchitta, 2000). Erst durch die Synthese eines cytosolischen Proteins dissoziiert das Ribosom von der ER-Membran. Es wäre theoretisch denkbar, dass das ERj3-Protein präferentiell von solchen

membrangebundenen Ribosomen synthetisiert wird, diese sich jedoch auf Grund der Semipermeabilisierung der HeLa-Zellen zu einem gewissen Teil von der ER-Membran lösen. Folglich stünde in den Transportstudien ein Teil der Synthesemaschinerie nicht zur Verfügung und die Ribosomen des Lysats müssten vermittelt durch die SRP-SR α -Interaktion zum ER dirigiert werden. Unter dieser Annahme würde die ERj3-Biogenese SR α -abhängig. Da in den Zellkulturversuchen die HeLa-Zellen während des eigentlichen Experiments adhärent in den Kavitäten sitzen bleiben, bliebe das Verhältnis von membranassoziierten und gelösten Ribosomen unverändert. Daher könnte ERj3 SR α -unabhängig an den gebundenen Ribosomen synthetisiert und direkt ins ER-Lumen transloziert werden. Dem widersprechen aber die Daten von Lang und Pfeffer (Lang, 2012) (Stefan Pfeffer, Max-Planck Institut für Biochemie, Martinsried, persönlich Mitteilung). An Hand ihrer Daten konnte ein quantitativer Vergleich der Ribosomenzahl pro μM ER-Membran aus Elektronenmikroskopie- (Lang, 2012) und Kryoelektronentomographiebildern (Pfeffer) vollzogen werden. Während der Gewinnung der ER-Vesikel für die Kryoelektronentomographie werden mehrere harsche Zentrifugationsschritte durchgeführt. Demnach wirkt diese Methode aggressiver auf die Interaktion von Membran und Ribosom als die Präparation der semipermeablen Zellen. Während Lang per Elektronenmikroskopie 17 Ribosomen pro μM ER-Membran zählte, errechnete Pfeffer im Durchschnitt 33 Ribosomen pro μM Membranquerschnitt. Trotz der Zentrifugationsschritte wurden also mehr Ribosomen in der Tomographie verzeichnet. Dies ist durch die unterschiedlichen Bedingungen begründet. So konnte Lang nur dünne Schnitte analysieren, wodurch sein Fokus auf einer einzelnen Ebene lag, während Pfeffer die vollständige Elektronendichte der gesamten Probe messen konnte. Es wird daher nicht davon ausgegangen, dass sich während der Präparation von ER-Vesikeln für die Kryoelektronentomographie die Ribosomen von der ER-Membran lösen. Die Präparation der semipermeablen Zellen ist sogar schonender für die Zellen. Somit ist die Theorie, dass sich die Ribosomen durch die Zentrifugationsschritte während der Permeabilisierung der HeLa-Zellen von der ER-Membran lösen, sehr unwahrscheinlich. Sollte ERj3 präferentiell von membrangebundenen Ribosomen synthetisiert werden, würde die ERj3-mRNA ein Charakteristikum benötigen, damit sie zu den membranbegundenen Ribosomen dirigiert werden könnte. In der Literatur wird die 3'UTR-Region als ein solcher Direktionsfaktor beschrieben (Aragon *et al.*, 2009; Loya *et al.*, 2008; Nicchitta, 2002). Gerade diese Region jedoch fehlt in den Akkumulationsexperimenten in der Sequenz des ERj3-Expressionsplasmids. Folglich spricht vieles gegen die Theorie, dass das ERj3-Protein präferentiell von membrangebundenen Ribosomen synthetisiert wird und bei einer vermehrten Ablösung jener SR α -abhängig wird.

Daher wird eine zweite Hypothese für die Diskrepanz der Daten vorgeschlagen: in den Transportstudien könnte der eigentliche Transportmechanismus von ERj3 in das ER-Lumen nicht zur Verfügung stehen und ERj3 daher auf den SRP-abhängigen Transportweg ausweichen, wenn auch nicht sehr effizient. Das Ausweichen eines Substrats auf einen anderen Transportweg konnte schon in

früheren *in vitro*-Studien beobachtet werden. So können in *S. cerevisiae* manche Proteine bei Fehlen des SRPs auf das posttranslationale System umsteigen (Hann und Walter, 1991). Ähnliches wurde auch in Transportstudien in Säuger-RMs beobachtet: Präprocecropin A (ppcec) kann posttranslational in RMs importiert werden (Zimmermann *et al.*, 1990a), aber die Anwesenheit des SRP-Rezeptors verbessert die Transporteffizienz. Ferner wird Chemokin CC2 erst dann ineffizient prozessiert, wenn sowohl Sec62 als auch SRP14 depletiert waren (Lakkaraju *et al.*, 2012). Folglich wäre denkbar, dass der eigentliche Direktionsfaktor im Retikulozytenlysat nicht funktional ist und die ERj3-Zielsteuerung daraufhin auf den SR α -abhängigen Mechanismus umsteigt. Als Kandidat wäre somit Calmodulin denkbar, dass auf Grund der EGTA-Behandlung des eingesetzten Retikulozytenlysats eine reduzierte Affinität zu seinen Substraten besitzt. Eben dieses Phänomen wurde schon von Shao und Hegde in Translokationsstudien von ppcec in raue Mikrosomen beobachtet (Shao und Hegde, 2011a). Erst als sie ein nicht EGTA-behandeltes Lysat einsetzten, konnten sie eine effiziente Prozessierung von ppcec und die signalsequenzabhängige Interaktion mit Calmodulin nachweisen. Ein wichtiges Kriterium war die physiologische Calciumkonzentration, da sowohl eine Chelatierung des Calciums durch EGTA als auch eine Calciumkonzentration von mehr als 10 μ M die ppcec-Translokation reduzierten. Denkbar wäre folglich, dass die Signalsequenz von ERj3 von Calmodulin erkannt und gebunden werden kann. Frühere Studien demonstrieren, dass Calmodulin in der Lage ist Signalsequenzen zu binden (Martoglio *et al.*, 1997). Dies wird durch eine Methionin-reiche Substratbindestelle bewerkstelligt, die sich auf Grund von hydrophoben, flexiblen Seitenketten einem großen Spektrum an hydrophoben Substraten anpassen kann. Eine ähnlich Bindestelle besitzen auch die Transmembrandomänenbindestelle von Get3 (Mateja *et al.*, 2009) und die Signalsequenzbindestelle des SRPs (Keenan *et al.*, 1998). Calmodulin könnte somit die Fehlfaltung des ERj3-Proteins vermeiden, indem es die hydrophoben Bereiche der ERj3-Signalsequenz vom Cytosol abschirmt.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass ERj3 Sec62 für seine Biogenese benötigt:

1. Nach Depletion von Sec62 nahm parallel auch die endogene relative ERj3-Menge ab (SEC62-UTR-siRNA: 50 %; SEC62 #1-siRNA: 33 %) (siehe Tabelle 50), obwohl der ERj3-mRNA-Gehalt gleich blieb (siehe Abbildung 21).
2. Nach Depletion von Sec62 wurde ERj3 signifikant schlechter glykosyliert (63 % verglichen mit der Kontrolle, siehe Abbildung 24 B).
3. Nach Depletion von Sec62, vermehrter Synthese von ERj3 durch Transfektion mit einem Expressionsplasmid und anschließender Inhibierung des Proteasoms akkumulierte die unglykosylierte ERj3-Form (siehe Abbildung 26).

Dadurch kann das Modell aufgestellt werden, dass der ERj3-Calmodulin-Komplex durch einen noch unbekanntem Weg zur ER-Membran dirigiert wird, dort an ein IQ-Motif (Isoleucin-Glutamin-Calmodulin-binde-Motif) bindet und ERj3 an Sec62 übergibt. Ob Calmodulin direkt mit Sec62 interagiert, ist fraglich, da in Sec62 keine Calmodulin-Bindestelle bekannt ist. Ausgeschlossen werden kann es jedoch nicht. Eine Assoziation mit dem IQ-Motif im cytosolischen N-Terminus von Sec61 α wäre hingegen denkbar (Erdmann *et al.*, 2011), woraufhin ERj3 in direkter Nähe zu Sec62 wäre. Demnach wäre die Biogenese von ERj3 gestört, sobald einer dieser Faktoren fehlt, sei es durch siRNA-vermittelte Depletion von Sec62 oder durch die Chelatierung von Calmodulin durch EGTA. Dieser Weg wäre demnach ein posttranslationaler Sec62-abhängiger Transportmechanismus, der bisher für solch große Proteine (über 300 Aminosäuren) noch nicht beschrieben wurde.

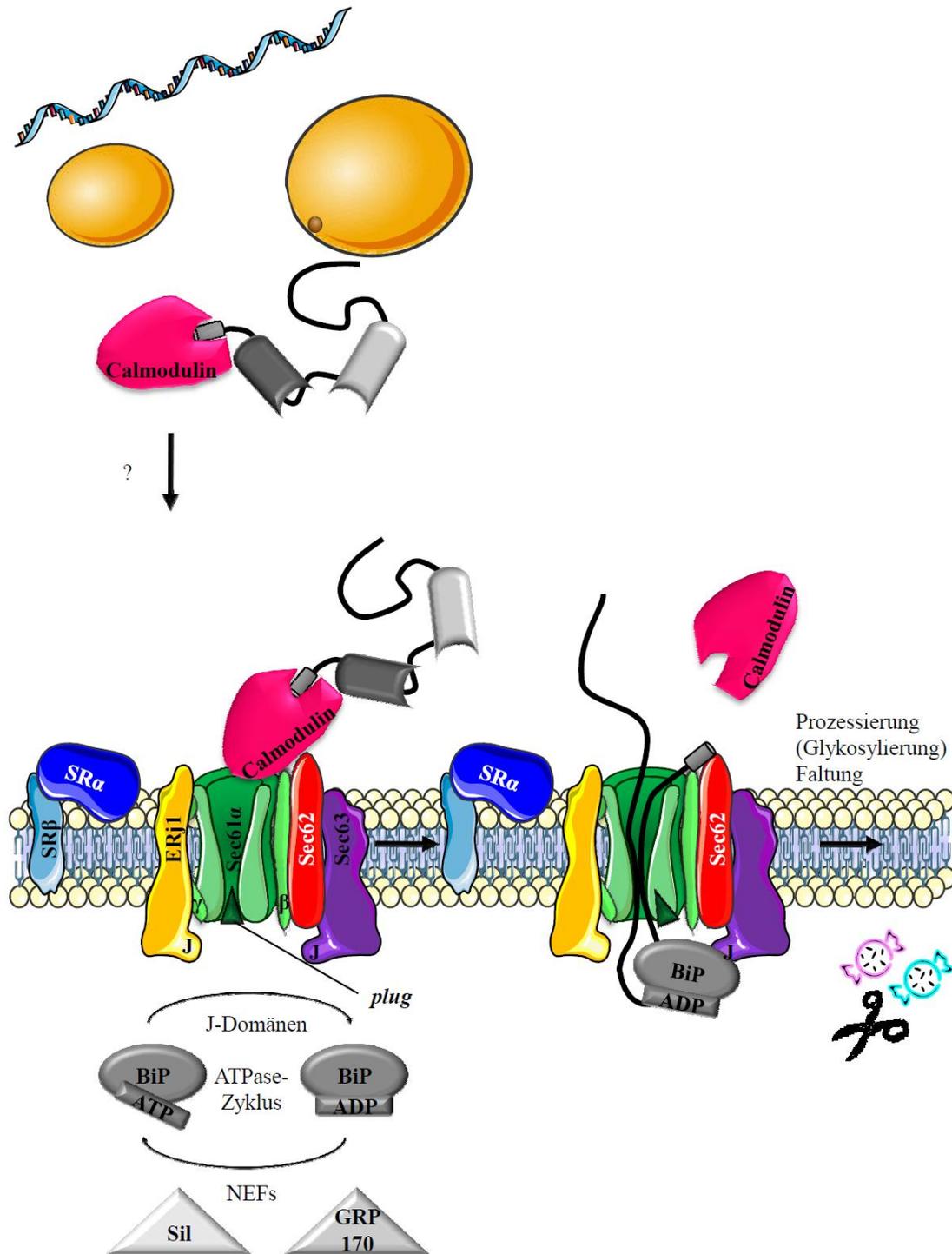


Abbildung 30: Modell des Sec62- und Calmodulin-abhängigen Transports von ERj3 in das ER-Lumen
 Calmodulin bindet an die Signalsequenz von ERj3. Über einen noch unbekanntem Weg (?) dirigiert es das durch Chaperone in ungefaltetem Zustand gehaltene ERj3-Protein zur ER-Membran und übergibt es an Sec62. Auf luminaler Seite kann das Hsp70 BiP unter ATP-Verbrauch die naszierende Kette binden. Die ATPase-Aktivität des Hsp70 wird durch die J-Domänen (J) von z.B. ERj1 und Sec63 stimuliert. Der Austausch von ADP zu ATP erfolgt durch die Nukleotid austauschfaktoren (NEFs) Sil und GRP170. Nach Abschluss der Synthese wird das Protein durch die Signalpeptidase prozessiert, gegebenenfalls durch den Oligosaccharyl-Komplex glykosyliert und kann seine reife Konformation einnehmen. Integrale Membranproteine werden schon während der Synthese lateral aus dem Sec61-Komplex in die ER-Membran entlassen.

Sofern ein Sec62-Mangel vorliegt, wäre denkbar, dass ERj3 auf einen SR α -abhängigen Transportweg ausweicht, in dem Calmodulin ebenfalls involviert ist. So konnten in einer Immunpräzipitationsstudie Zhu *et al.* demonstrieren, dass Calmodulin in *S. cerevisiae* an das SR α -Homolog (Srp101p) binden kann (Zhu *et al.*, 2001). Dieser zum Sec62-abhängigen Weg alternative Calmodulin-SR α -vermittelte Transport (siehe Abbildung 31) wäre in den Transportstudien durch das EGTA ebenfalls nicht möglich. Dass SR α und Sec62 in unterschiedlichen Transportwegen involviert sind, wird durch Abbildung 25 gestützt. Die gleichzeitige Depletion von Sec62 und SR α führte zu einem noch schlechteren Transport von ERj3 als das Fehlen einer der beiden Proteine alleine. Sollte der SR α -vermittelte Transport als Alternative nur ineffizient genutzt werden können, würde dies auch erklären, warum in den Zellkulturversuchen nach Sec62-Depletion dennoch eine Akkumulation von ERj3-Vorläuferprotein im Cytosol bzw. eine Abnahme des endogenen ERj3-Gehalts zu verzeichnen war. Auch dieser SR α -abhängige Transport, der ebenfalls Calmodulin mit einbindet, könnte posttranslational ablaufen. Die posttranslationale Funktion von SR α wird neben den Erkenntnissen aus den Transportstudien mit TA-Proteinen auch durch Studien an chloroplastidärem SRP immer offensichtlicher: Das chloroplastidäre SRP54 ist zusammen mit dem SRP34 am posttranslationalen Transport von Membranproteinen, wie dem LHCP, beteiligt (Grudnik *et al.*, 2009; Li *et al.*, 1995).

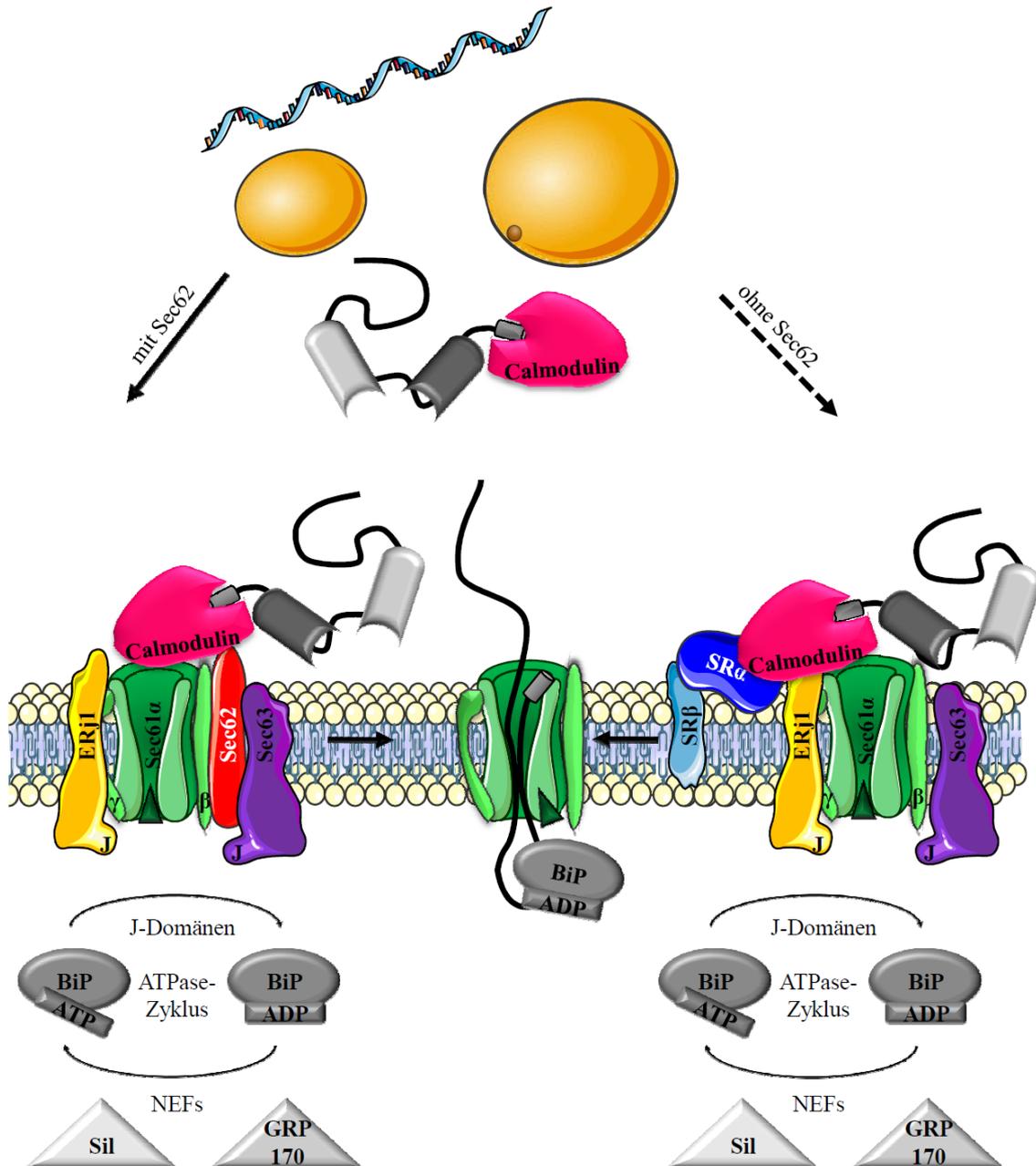


Abbildung 31: Modell des Calmodulin-abhängigen Transports in das ER-Lumen bei Gegenwart oder Mangel von Sec62

Bei Gegenwart von Sec62 wird das von Calmodulin gebundene ERj3 über Sec62 zum ER dirigiert und durch den Sec61-Komplex in das ER-Lumen transloziert. Bei Mangel von Sec62 erfolgt die Direktion des ERj3-Calmodulinkomplexes zum ER über eine Assoziation an SR α .

Um die Abhängigkeit der ERj3-Translokation von Calmodulin zu verifizieren, könnten analoge Translokationsstudien mit unbehandeltem Retikulozytenlysat durchgeführt werden. Die Chelatierung des Calciums sollte zu einer verminderten Glykosylierungseffizienz führen. Ferner könnte man analog zu den Transportstudien von Haßdenteufel *et al.* die Translokation von ERj3 in Anwesenheit des Calmodulin-Antagonisten Trifluoperazin durchführen (Haßdenteufel *et al.*, 2011), welches die Substratbindung inhibiert. Interessant wäre zudem, Quervernetzungsstudien durchzuführen, um die

Interaktion von ERj3 und Calmodulin zu prüfen. Sollte die Calmodulinabhängigkeit bestätigt werden, wäre zu klären, wie die Direktion des Substrat-Calmodulin-Komplexes zur ER-Membran bewerkstelligt wird bzw. ob Sec62 tatsächlich als Calmodulin-Rezeptor in Frage kommt oder ob Calmodulin an das IQ-Motif von Sec61 α bindet, wie es schon von Erdmann *et al.* beschrieben wurde (Erdmann *et al.*, 2011) und dadurch die nötige räumliche Nähe für eine Interaktion von ERj3 und Sec62 vermittelt.

Das Modell aus Abbildung 30 und Abbildung 31 beschreibt einen posttranslationalen Transportweg für ERj3. Auf Grund seiner Größe erscheint ERj3 als 358 Aminosäuren großes Protein kein klassisches posttranslationales Substrat zu sein. Ob es nun tatsächlich co- oder posttranslational transportiert wird, kann mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten nicht final geklärt werden. Mit ERj3 konnte in dieser Arbeit aber ein Protein beschrieben werden, das nicht der von Lakkaraju *et al.* aufgestellten Regel entspricht, welche besagt, dass nur Proteine mit weniger als 120 Aminosäuren über einen Sec62-abhängigen Weg transportiert werden (Lakkaraju *et al.*, 2012). Um zu stützen, dass Sec62 auch für die Biogenese von über 160 Aminosäuren langen Proteinen beteiligt ist, wäre es von Nöten, weitere größere Transportsubstrate zu finden. Da ERj3 eine 22 Aminosäuren lange, apolare Signalsequenz besitzt (Lang *et al.*, 2012), wären besonders Proteine mit ähnlichen Eigenschaften, wie z.B. das Prionprotein, zu testen. Ob allein die Signalsequenz die Sec62-Abhängigkeit definiert, oder aber auch die Kombination von Signalsequenz und dem nachfolgenden reifen Protein von Bedeutung ist (Kim *et al.*, 2002), wäre durch Austausch der Signalsequenzen zu testen. Da Aquaporin II auf Sec63 (Lang *et al.*, 2012), aber nicht auf Sec62 angewiesen ist, könnte man testen, ob das chimäre Protein aus der ERj3-Signalsequenz und dem reifen Aquaporin II-Protein (ERj3-AQP II) anschließend eine Sec62-Abhängigkeit aufweist. Genauso interessant wäre, ob chimäre Proteine aus ppl und ERj3 eine Sec62-Abhängigkeit erlangen (ERj3-ppl) bzw. die Sec62-Abhängigkeit verlieren (ppl-ERj3). Ebenso wichtig wäre zu testen, ob Sec62 möglicherweise als Signalsequenzrezeptor dient. Daher wäre es sinnvoll, Quervernetzungsstudien durchzuführen. Sollte tatsächlich ein Quervernetzungsprodukt aus ERj3 und Sec62 nachgewiesen werden können, kann ausgeschlossen werden, dass der ERj3-Transportdefekt lediglich auf einer fehlenden Modulation des Sec63-Proteins durch Sec62 begründet ist. Stattdessen wäre dies ein weiterer Hinweis, dass ERj3 Sec62 direkt für seine Biogenese benötigt.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass für ERj3 auch eine Abhängigkeit von Sec61 α (Lang *et al.*, 2012), von BiP und eine Abhängigkeit von der Interaktion von BiP mit dem Sec61 α -Protein über die Schleife 7 beobachtet wurde (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Dementsprechend scheinen diese Faktoren gemeinsam eine essentielle Komponente in der Translokation des ERj3-Proteins zu bilden. Sec62 und Sec63 stellen einen Mediator zwischen dem Cytosol und dem ER-Lumen, genauer gesagt zwischen dem Ribosom und BiP, dar und vereinen somit die Funktionen von ERj1 (Benedix *et al.*,

2010). Sec62 kann nicht gleichzeitig mit Sec63 und dem Ribosom interagieren (Müller *et al.*, 2009). Ferner ist bekannt, dass Sec62 auf Ebene der Initiation die Translation hemmt (Müller *et al.*, 2009). Demnach ist für die Funktion von Sec62 im Proteintransport auch folgendes Modell denkbar: die Assoziation von BiP mit der J-Domäne des Sec63-Proteins könnte die Interaktion von Sec62 und Sec63 fördern. Daraufhin könnte der RNC-Komplex von Sec62 an den Sec61-Komplex überreicht und die Translation wieder aktiviert werden. Ähnliches ist auch für die Interaktion des RNC mit SRP bekannt (Halic *et al.*, 2004; Pool *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2004). So würde sichergestellt, dass bei Fortsetzen der Synthese BiP auf luminaler Seite zugegen wäre, um als Ratsche den vektorialen Transport und als Chaperon die Faltung des translozierten Proteins zu unterstützen. Zudem wird in der Literatur spekuliert, dass die Bindung von BiP an Schleife 7 von Sec61 α zusätzlich die Porenöffnung der Translokase modulieren kann (Schäuble *et al.*, 2012) und somit ebenfalls die Translokation bestimmter Substrate wie ERj3 beeinflusst. Durch Quervernetzungsstudien und Split-Ubiquitin-Experimente konnte die Signalsequenzinteraktion mit dem Hefe-Sec62p nachgewiesen werden (Dünnwald *et al.*, 1999; Müsch *et al.*, 1992; Plath *et al.*, 1998). Ob das humane Sec62 diese Funktion ebenso erfüllt, gilt es noch zu überprüfen. Wenn dies der Fall wäre, wäre denkbar, dass Sec62 möglicherweise die Signalsequenzen auf bestimmte Faktoren überprüft. So ist aus Transportstudien von Kang *et al.* bekannt, dass es neben der Regulation der DNA-Transkription, der mRNA-Translation, der Proteinsynthese und der Proteindegradation auch auf Translokationsebene eine Regulation gibt (Kang *et al.*, 2006). Ausgangspunkt war die Frage, warum es solch eine große Varianz in den Signalsequenzen gibt bzw. warum es einerseits starke Signalsequenzen (Präprolaktin und Osteopontin) gibt, andererseits aber auch schwache Signalsequenzen und warum daher manche Proteine für ihren Transport noch weitere akzessorische Proteine wie TRAM (*translocating chain-associating membrane protein*) (Voigt *et al.*, 1996) und TRAP (*translocon-associated protein complex*) (Fons *et al.*, 2003) benötigen. Wie sich herausstellte, können über die Signalsequenzen bei ER-Stress die Proteine differenziert und ein Teil der Substrate im Cytosol zurückgehalten werden (Kang *et al.*, 2006). Der Mechanismus, welcher zwischen den Signalsequenzen differenziert und somit die substratspezifische Attenuation der Translokation bewirkt, ist noch unbekannt. An dieser Stelle wäre nun Sec62 ein interessanter Kandidat und würde auch erklären, warum gerade die ERj3-Biogenese auf Sec62 angewiesen ist, da dieses als Cochaperon bekanntlich bei ER-Stress vermehrt synthetisiert wird (Shen und Hendershot, 2005). Jedoch würde man dann auch für andere stressinduzierbare Proteine, wie BiP und GRP170, eine Sec62-Abhängigkeit fordern, welche nicht beobachtet wurde (siehe Tabelle 50). Hammadi *et al.* konnten erst kürzlich demonstrieren, dass das Translokon nicht nur unter physiologischen Bedingungen einen *leak*-Kanal darstellt, sondern durch Dissoziation von BiP von Sec61 α auf Grund der zu hohen ER-Last durch fehlgefaltete Proteine auch während der UPR einen Calciumausstrom zulässt (Hammadi *et al.*, 2013). Dieser kann daraufhin durch die Aktivierung von Caspasen die Apoptose induzieren. Auch Lang postulierte, dass „der stete,

aber veränderbare Calziumefflux aus dem ER laut Modell also Auskunft über die Proteinfaltungskapazität und den Stresszustand, kurz die Physiologie des ER Lumens“ gibt (Lang, 2012). Demnach ist nicht auszuschließen, dass Sec62 unter ER-Stressbedingungen tatsächlich entweder als Signalsequenzkontrollpunkt oder zur Vermittlung zwischen arretierten Ribosomen und durch Sec63 rekrutiertes BiP zur Vermeidung einer weiteren Überlastung der ER-Faltungsmaschinerie dient. Diese Theorie wird durch die Tatsache bestärkt, dass Sec62 laut bioinformatischen Vorhersagen in seinem cytosolischen C-Terminus zwei EF-Hände aufweist (Greiner *et al.*, 2011b). Somit könnte Sec62 als Calciumsensor dienen und durch ER-Stress bedingten Calziumefflux seine Konformation ändern, wodurch seine Funktionen im ER-Stress aktiviert werden würden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sec62 in einem parallelen Transportweg zum SRP-abhängigen Transportmodus involviert ist. Auf Grund der Größe des hier beschriebenen Substrats (ERj3; über 300 Aminosäuren) und der Möglichkeit von Sec62 an Ribosomen zu binden und die Translationsaktivität zu modulieren (Müller *et al.*, 2009), wird davon ausgegangen, dass Sec62 im Säuger sowohl den posttranslationalen Transport von größeren Proteinen als auch den cotranslationalen Transport vermitteln kann. Zudem wurde ein Modell vorgestellt, laut dem SR α bei Sec62-Mangel über Calmodulin einen posttranslationalen Transport bewerkstelligt. Demnach dürfen zukünftig cotranslationale und SRP-abhängige bzw. posttranslationale und Sec62-abhängige Translokation nicht mehr gleichgestellt werden. Warum gerade ERj3 in seiner Biogenese auf Sec62 angewiesen ist und welche Rolle Sec62 dabei inne hat, ist noch herauszufinden.

V.3. Interpretationen der gleichzeitigen RNAi gegen SR α und Sec62 in HeLa-Zellen

V.3.1. Die gleichzeitige Depletion von SR α und Sec62 führt zu keinen weiteren Phänotypen als die alleinige Depletion eines der beiden Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, durch die in Zellkulturexperimenten der posttranslationale Transport, genauer gesagt die Beteiligung von Sec62 an jenem, demaskiert werden kann. Als effizientes Mittel erwies sich das gleichzeitige PTGS von SEC62 und SR α . So können durch siRNA-Manipulation zweierlei Zellpopulationen erstellt werden: Zellen, in denen der SRP-abhängige Transport, nicht aber der Sec62-abhängige Transport, stattfinden kann und Zellen, in denen beide Transportwege ausgeschaltet sind. In letzterem Fall wird verhindert, dass die Sec62-Transportsubstrate, wie z.B. ppcec in Transportstudien oder Chemokin CC2 in Zellkulturversuchen, auf einen SRP-abhängigen Transport ausweichen. Wie Abbildung 6 verdeutlicht, führt die

Kombination der Sec62 #1-siRNA mit der SR α #2- bzw. der SR α -UTR-siRNA zu einer effizienten Depletion der Proteine Sec62 und SR α . Da durch die Depletion beider sowohl der SRP-abhängige als auch der Sec62-abhängige Transport verhindert sind, war es von besonderem Interesse, ob die Viabilität und die Teilung der Zellen beeinflusst sind bzw. ob nun möglicherweise die Proteinhomöostase verändert ist. Der Mangel beider Proteine führte jedoch zu keinen weiteren Phänotypen verglichen mit Zellen, in denen nur eines der beiden fehlte. Dementsprechend reicht den Zellen der restliche Gehalt der beiden Proteine, um die Proteinhomöostase aufrechtzuerhalten und zu überleben oder es gibt noch einen weiteren Transportmechanismus, der den gleichzeitigen Ausfall von SR α und Sec62 kompensiert. Jedoch ergab sich nach 96stündiger PTGS nun ein Zeitpunkt, an dem die Transportstudien und Zellkulturexperimente durchgeführt werden konnten, ohne unerwartete Beeinflussungen in Betracht ziehen zu müssen, wie z.B. ein Fehlen des Sec61-Komplexes.

V.3.2. SR α und Sec62 agieren parallel im Transport von ppcec

Für sezernierte Proteine, die weniger als 120 Aminosäuren lang sind, wurde von Lakkaraju *et al.* demonstriert, dass diese sowohl posttranslational als auch Sec62-abhängig in das ER-Lumen transloziert werden (Lakkaraju *et al.*, 2012). Jedoch stand der Beweis für eine Sec62-abhängige, posttranslationale Translokation für ppcec in Säugerzellen noch aus. Sein Transport wurde bereits ausgiebig an Säugermikrosomen untersucht (Klappa *et al.*, 1991; Schlenstedt *et al.*, 1990; Shao und Hegde, 2011a; Zimmermann *et al.*, 1990a) und es gilt somit als klassisches posttranslationales Transportsubstrat. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit ein Sec62-abhängiger Transport von ppcec in das ER geprüft werden. Dazu wurde das Transportsubstrat unter co- oder posttranslationalen Bedingungen, das heißt bei An- oder Abwesenheit von semipermeabilisierten HeLa-Zellen (SPCs), synthetisiert. Für posttranslationale Bedingungen wurde die Synthese zuerst durch Zugabe von Cycloheximid und RNase A gestoppt, bevor die manipulierten SPCs zugegeben wurden. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass ppcec auf einem cotranslationalen Transportweg, wie er von Schlenstedt *et al.* beobachtet wurde (Schlenstedt *et al.*, 1990), transloziert werden konnte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigten die Annahme, dass ppcec auch in HeLa-Zellen unter cotranslationalen Bedingungen in Abhängigkeit vom SRP-Rezeptor transportiert wird (siehe Abbildung 25). Da ppcec zu kurz ist, um vor Beendigung der Synthese seine Signalsequenz im Cytosol zu exponieren, muss SRP entweder schon an das Ribosom binden, während die Signalsequenz noch im ribosomalen Tunnel verborgen ist oder SRP und sein Rezeptor vermitteln auch den Transport von ppcec, wenn dessen Synthese schon komplett abgeschlossen ist. Dies würde dann eine Beteiligung von SR α in der posttranslationalen Translokation bedeuten. Für beide Theorien gibt es bereits Hinweise in der Literatur. Abell *et al.* konnten durch Untersuchungen der Insertion von TA-Proteinen

demonstrieren, dass einige TA-Proteine SRP-abhängig zur ER-Membran dirigiert werden. Dazu muss das SRP jedoch schon am Ribosom gebunden sein, wenn das C-terminale Signalankersegment den Tunnel verlässt. Daraufhin kann die standardisierte Direktion zum SRP-Rezeptor erfolgen. SRP kann tatsächlich schon an das Ribosom binden, bevor die Signalsequenz aus dem ribosomalen Tunnel austritt. So zeigten Berndt *et al.* für das Membranprotein Dap2, dass es von SRP schon als Substrat erkannt wird, wenn das Signalankersegment noch im Tunnel verborgen ist (Berndt *et al.*, 2009). Wenn man diese beiden Veröffentlichungen beachtet, ist nicht auszuschließen, dass SR α auch den Transport von kurzen Substraten vermitteln kann, ohne bis zur Übergabe des RNC an den Sec61-Komplex einen kontinuierlichen RNC-SRP-Komplex zu bilden, wie es klassischerweise im cotranslationalen Transport beschrieben wird. Unter cotranslationalen Bedingungen kann parallel dennoch der posttranslationale Transport ablaufen, der aber nur einen geringeren Anteil zu haben scheint, da die gleichzeitige Depletion von SR α und Sec62 zu keinem additiven Effekt in der Translokationsdefizienz führt.

Unter posttranslationalen Bedingungen wird eine Abhängigkeit von Sec62 sichtbar, was bestätigt, dass ppcec posttranslational Sec62-abhängig transportiert wird. Unter diesen Bedingungen kann kein cotranslationaler Transport stattfinden, da die mRNA durch die RNase A degradiert wurde. Der Sec62-abhängige, posttranslationale Transport steht in Einklang mit den Beobachtungen von Lakkaraju *et al.*, die besagen, dass kurze Proteine (kürzer als 120 Aminosäuren) über diesen Modus in das ER-transloziert werden (Lakkaraju *et al.*, 2012). Unter posttranslationalen Bedingungen führt die gleichzeitige Depletion von Sec62 und SR α erneut zu keinem schlechteren Transport verglichen mit der alleinigen Depletion von Sec62. Posttranslational ist der ppcec-Transport folglich SRP-unabhängig. Johnson *et al.* konnten zeigen, dass ppcec zu einem gewissen Teil posttranslational über den TRC40-Weg transportiert wird (Johnson *et al.*, 2012). Die Insertion erfolgt daraufhin über den Sec61-Komplex. Aber auch Calmodulin wäre ein interessanter Kandidat für die Direktion des fertig synthetisierten ppcec's, da es sowohl an Signalsequenzen als auch an Sec61 α binden kann (Martoglio *et al.*, 1997; Shao und Hegde, 2011a). Ob und wie Sec62 in dem TRC40-Weg und in dem möglichen Calmodulin-abhängigen Weg involviert ist, bleibt zu klären.

Da der ppcec-Transport unter cotranslationalen Bedingungen vornehmlich von SR α abhängig und unter posttranslationalen Bedingungen nur von Sec62 abhängig war, agieren beide Proteine in unterschiedlichen, parallelen Signalwegen.

V.4. Fazit

Diese Arbeit konnte für das humane Sec62 folgendes darlegen:

1. Es kann die gleichen Funktionen wie sein Hefeortholog ausüben, da es in Hefe den letalen Phänotyp einer temperatursensitiven Mutante retten konnte. Folglich scheint es einen Signalsequenzrezeptor darzustellen.
2. Es ist im Säuger kein essentielles Protein, aber es hat einen positiven Einfluss auf die Kompetenz der Zellen sich zu teilen.
3. Es vermittelt einen posttranslationalen Transport des kleinen Modelltransportsubstrats ppcec.
4. Da ERj3 für seine Biogenese Sec62 benötigt, ist letzteres auch am Transport von Proteinen beteiligt, die mehr als 160 Aminosäuren enthalten.
5. Sec62 agiert im Falle von ERj3 und ppcec in einem parallelen Transportweg zu SR α .

VI. Literaturverzeichnis

- Abell, B.M., Pool, M.R., Schlenker, O., Sinning, I. and High, S. (2004) Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *Embo J*, **23**, 2755-2764.
- Abell, B.M., Rabu, C., Leznicki, P., Young, J.C. and High, S. (2007) Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J Cell Sci*, **120**, 1743-1751.
- Ainger, K.J. and Meyer, D.I. (1986) Translocation of nascent secretory proteins across membranes can occur late in translation. *Embo J*, **5**, 951-955.
- Althoff, S.M., Stevens, S.W. and Wise, J.A. (1994) The Srp54 GTPase is essential for protein export in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **14**, 7839-7854.
- Amaya, Y. and Nakano, A. (1991) SRH1 protein, the yeast homologue of the 54 kDa subunit of signal recognition particle, is involved in ER translocation of secretory proteins. *FEBS Lett*, **283**, 325-328.
- Ampofo, E., Welker, S., Jung, M., Müller, L., Greiner, M., Zimmermann, R. and Montenarh, M. (2012) CK2 phosphorylation of human Sec63 regulates its interaction with Sec62. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1830**, 2938-2945.
- Anderson, D.J. and Hetzer, M.W. (2007) Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*, **9**, 1160-1166.
- Anderson, D.J. and Hetzer, M.W. (2008) Shaping the endoplasmic reticulum into the nuclear envelope. *J Cell Sci*, **121**, 137-142.
- Anderson, D.J., Mostov, K.E. and Blobel, G. (1983) Mechanisms of integration of de novo-synthesized polypeptides into membranes: signal-recognition particle is required for integration into microsomal membranes of calcium ATPase and of lens MP26 but not of cytochrome b5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 7249-7253.
- Andrews, A.T. (1986) *Electrophoresis : theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Clarendon ; New York : Oxford University Press, Oxford.
- Aragon, T., van Anken, E., Pincus, D., Serafimova, I.M., Korennykh, A.V., Rubio, C.A. and Walter, P. (2009) Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature*, **457**, 736-740.
- Arnold, C.E. and Wittrup, K.D. (1994) The stress response to loss of signal recognition particle function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 30412-30418.

- Aza-Blanc, P., Cooper, C.L., Wagner, K., Batalov, S., Deveraux, Q.L. and Cooke, M.P. (2003) Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell*, **12**, 627-637.
- Bacher, G., Lutcke, H., Jungnickel, B., Rapoport, T.A. and Dobberstein, B. (1996) Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting. *Nature*, **381**, 248-251.
- Bacher, G., Pool, M. and Dobberstein, B. (1999) The ribosome regulates the GTPase of the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol*, **146**, 723-730.
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-186.
- Balasubramaniam, S., Mitropoulos, K.A., Venkatesan, S., Myant, N.B., Peters, T.J., Postiglione, A. and Mancini, M. (1981) Analytical fractionation of human liver microsomal fractions: localization of cholesterol and of the enzymes relevant to its metabolism. *Clin Sci (Lond)*, **60**, 435-439.
- Baumann, O. and Walz, B. (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol*, **205**, 149-214.
- Beckerich, J.M., Boisrame-Baudevin, A. and Gaillardin, C. (1998) *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int Microbiol*, **1**, 123-130.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. and Frank, J. (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, **278**, 2123-2126.
- Benedix, J., Lajoie, P., Jaiswal, H., Burgard, C., Greiner, M., Zimmermann, R., Rospert, S., Snapp, E.L. and Dudek, J. (2010) BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERj1 for ribosomes. *J Biol Chem*, **285**, 36427-36433.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, **27**, 198-219.
- Bernabeu, C. and Lake, J.A. (1982) Nascent polypeptide chains emerge from the exit domain of the large ribosomal subunit: immune mapping of the nascent chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 3111-3115.
- Bernales, S., Papa, F.R. and Walter, P. (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 487-508.
- Bernasconi, R. and Molinari, M. (2011) ERAD and ERAD tuning: disposal of cargo and of ERAD regulators from the mammalian ER. *Curr Opin Cell Biol*, **23**, 176-183.

- Berndt, U., Oellerer, S., Zhang, Y., Johnson, A.E. and Rospert, S. (2009) A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1398-1403.
- Bies, C., Blum, R., Dudek, J., Nastainczyk, W., Oberhauser, S., Jung, M. and Zimmermann, R. (2004) Characterization of pancreatic ERj3p, a homolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p. *Biol Chem*, **385**, 389-395.
- Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J. and Zimmermann, R. (1999) A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *Biol Chem*, **380**, 1175-1182.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Black, V.H., Sanjay, A., van Leyen, K., Luring, B. and Kreibich, G. (2005) Cholesterol and steroid synthesizing smooth endoplasmic reticulum of adrenocortical cells contains high levels of proteins associated with the translocation channel. *Endocrinology*, **146**, 4234-4249.
- Blau, M., Mullapudi, S., Becker, T., Dudek, J., Zimmermann, R., Penczek, P.A. and Beckmann, R. (2005) ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 1015-1016.
- Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975a) 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.
- Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975b) Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, **67**, 852-862.
- Blobel, G. and Sabatini, D.D. (1970) Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J Cell Biol*, **45**, 130-145.
- Bojkowska, K., Santoni de Sio, F., Barde, I., Offner, S., Verp, S., Heinis, C., Johnsson, K. and Trono, D. (2011) Measuring in vivo protein half-life. *Chem Biol*, **18**, 805-815.
- Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 19-57.
- Bononi, A., Missiroli, S., Poletti, F., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bonora, M., De Marchi, E., Giorgi, C., Marchi, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Wieckowski, M.R. and Pinton, P. (2012) Mitochondria-associated membranes (MAMs) as hotspot Ca(2+) signaling units. *Adv Exp Med Biol*, **740**, 411-437.

- Borgese, N., Colombo, S. and Pedrazzini, E. (2003) The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J Cell Biol*, **161**, 1013-1019.
- Borgese, N. and Fasana, E. (2011) Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1808**, 937-946.
- Borgese, N. and Righi, M. (2010) Remote origins of tail-anchored proteins. *Traffic*, **11**, 877-885.
- Bosher, J.M. and Labouesse, M. (2000) RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nat Cell Biol*, **2**, E31-36.
- Brodsky, J.L., Goeckeler, J. and Schekman, R. (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9643-9646.
- Brodsky, J.L., Hamamoto, S., Feldheim, D. and Schekman, R. (1993) Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70. *J Cell Biol*, **120**, 95-102.
- Brodsky, J.L. and Schekman, R. (1993) A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol*, **123**, 1355-1363.
- Buchberger, A., Bukau, B. and Sommer, T. (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell*, **40**, 238-252.
- Caplan, S., Naslavsky, N., Hartnell, L.M., Lodge, R., Polishchuk, R.S., Donaldson, J.G. and Bonifacino, J.S. (2002) A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *Embo J*, **21**, 2557-2567.
- Cappel, S. (2011) Funktionale Charakterisierung der ER-luminalen Proteine BiP, Grp170 und Sili1 hinsichtlich der Zellvitalität und der Protein-Biogenese. *Medizinische Biochemie und Molekularbiologie*. Universität des Saarlandes.
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C. and Wolf, D.E. (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8790-8794.
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Attane, C., Duparc, T., Knauf, C. and Valet, P. (2011) Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*, **40**, 1-9.
- Chen, Y., Zhang, Y., Yin, Y., Gao, G., Li, S., Jiang, Y., Gu, X. and Luo, J. (2005) SPD--a web-based secreted protein database. *Nucleic Acids Res*, **33**, D169-173.

- Chirico, W.J., Waters, M.G. and Blobel, G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, **332**, 805-810.
- Choi, J., Park, J., Kim, D., Jung, K., Kang, S. and Lee, Y.H. (2010) Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics*, **11**, 105.
- Chu, F.F. and Doyle, D. (1985) Turnover of plasma membrane proteins in rat hepatoma cells and primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem*, **260**, 3097-3107.
- Collas, P. and Poccia, D. (2000) Membrane fusion events during nuclear envelope assembly. *Subcell Biochem*, **34**, 273-302.
- Connolly, T., Rapiejko, P. and Gilmore, R. (1991) Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science*, **252**, 1171-1173.
- Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F. and Sanchez, J.C. (2000) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, **21**, 1104-1115.
- D'Angelo, M.A. and Hetzer, M.W. (2008) Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol*, **18**, 456-466.
- Dabrowski, S. and Kur, J. (1998) Cloning and expression in Escherichia coli of the recombinant his-tagged DNA polymerases from Pyrococcus furiosus and Pyrococcus woesei. *Protein Expr Purif*, **14**, 131-138.
- Dalal, K. and Duong, F. (2011) The SecY complex: conducting the orchestra of protein translocation. *Trends Cell Biol*, **21**, 506-514.
- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A.G., Tian, X., Onoe, T., Qian, Q., Li, A., Cai, Y., Kamath, P.S., King, B.F., Azurmendi, P.J., Tahvanainen, P., Kaariainen, H., Hockerstedt, K., Devuyt, O., Pirson, Y., Martin, R.S., Lifton, R.P., Tahvanainen, E., Torres, V.E. and Somlo, S. (2004) Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet*, **36**, 575-577.
- Demir, O. and Aksan Kurnaz, I. (2006) An integrated model of glucose and galactose metabolism regulated by the GAL genetic switch. *Comput Biol Chem*, **30**, 179-192.
- Dempski, R.E., Jr. and Imperiali, B. (2002) Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 844-850.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D. and Schekman, R. (1988) The role of stress proteins in membrane biogenesis. *Trends Biochem Sci*, **13**, 384-388.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A. and Schekman, R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, **349**, 806-808.

- Deshaies, R.J. and Schekman, R. (1989) SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **109**, 2653-2664.
- Deshaies, R.J. and Schekman, R. (1990) Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol*, **10**, 6024-6035.
- 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., Frie, 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.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. and Johnsson, N. (1999) Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **10**, 329-344.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877-6888.
- English, A.R., Zurek, N. and Voeltz, G.K. (2009) Peripheral ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 596-602.
- Eravci, M., Fuxius, S., Broedel, O., Weist, S., Krause, E., Stephanowitz, H., Schluter, H., Eravci, S. and Baumgartner, A. (2008) The whereabouts of transmembrane proteins from rat brain synaptosomes during two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, **8**, 1762-1770.
- Erdmann, F., Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Honigsmann, A., Ahmad, M., Dudek, J., Benedix, J., Harsman, A., Kopp, A., Helms, V., Cavalie, A., Wagner, R. and Zimmermann, R. (2011) Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **30**, 17-31.
- Evans, T.C., Jr. and Nelsestuen, G.L. (1994) Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. *Biochemistry*, **33**, 13231-13238.
- Falcao-Pires, I. and Leite-Moreira, A.F. (2005) Apelin: a novel neurohumoral modulator of the cardiovascular system. Pathophysiologic importance and potential use as a therapeutic target. *Rev Port Cardiol*, **24**, 1263-1276.

- Fedorov, Y., Anderson, E.M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W.S. and Khvorova, A. (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *Rna*, **12**, 1188-1196.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Flower, A.M. (2007) The SecY translocation complex: convergence of genetics and structure. *Trends Microbiol*, **15**, 203-210.
- Fons, R.D., Bogert, B.A. and Hegde, R.S. (2003) Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol*, **160**, 529-539.
- Fourie, A.M., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1994) Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem*, **269**, 30470-30478.
- Friedman, J.R. and Voeltz, G.K. (2011) The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol*, **21**, 709-717.
- Fries, T., Betz, C., Sohn, K., Caesar, S., Schlenstedt, G. and Bailer, S.M. (2007) A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins. *J Biol Chem*, **282**, 19292-19301.
- Frith, M.C., Forrest, A.R., Nourbakhsh, E., Pang, K.C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Bailey, T.L. and Grimmond, S.M. (2006) The abundance of short proteins in the mammalian proteome. *PLoS Genet*, **2**, e52.
- Fujimoto, M. and Hayashi, T. (2011) New insights into the role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane. *Int Rev Cell Mol Biol*, **292**, 73-117.
- Gerke, V. and Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, **82**, 331-371.
- Gillon, A.D., Latham, C.F. and Miller, E.A. (2012) Vesicle-mediated ER export of proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta*, **1821**, 1040-1049.
- Gilmore, R., Walter, P. and Blobel, G. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol*, **95**, 470-477.
- Goldshmidt, H., Sheiner, L., Butikofer, P., Roditi, I., Uliel, S., Gunzel, M., Engstler, M. and Michaeli, S. (2008) Role of protein translocation pathways across the endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*, **283**, 32085-32098.

- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J.J. and Madjar, J.J. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis*, **18**, 328-337.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U. and Rapoport, T.A. (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, **71**, 489-503.
- Görlich, D. and Rapoport, T.A. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-630.
- Götz, C., Müller, A., Montenarh, M., Zimmermann, R. and Dudek, J. (2009) The ER-membrane-resident Hsp40 ERj1 is a novel substrate for protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun*, **388**, 637-642.
- Grallath, S., Schwarz, J.P., Bottcher, U.M., Bracher, A., Hartl, F.U. and Siegers, K. (2006) L25 functions as a conserved ribosomal docking site shared by nascent chain-associated complex and signal-recognition particle. *EMBO Rep*, **7**, 78-84.
- Greiner, M., Kreutzer, B., Jung, V., Grobholz, R., Hasenfus, A., Stöhr, R.F., Tornillo, L., Dudek, J., Stöckle, M., Unteregger, G., Kamradt, J., Wullich, B. and Zimmermann, R. (2011a) Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *Int J Cancer*, **128**, 2284-2295.
- Greiner, M., Kreutzer, B., Lang, S., Jung, V., Cavalie, A., Unteregger, G., Zimmermann, R. and Wullich, B. (2011b) Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *Prostate*, **71**, 1074-1083.
- Grudnik, P., Bange, G. and Sinning, I. (2009) Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol Chem*, **390**, 775-782.
- Gumbart, J. and Schulten, K. (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J*, **90**, 2356-2367.
- Gundelfinger, E.D., Krause, E., Melli, M. and Dobberstein, B. (1983) The organization of the 7SL RNA in the signal recognition particle. *Nucleic Acids Res*, **11**, 7363-7374.
- Guth, S., Volzing, C., Müller, A., Jung, M. and Zimmermann, R. (2004) Protein transport into canine pancreatic microsomes: a quantitative approach. *Eur J Biochem*, **271**, 3200-3207.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M.R., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Frank, J. and Beckmann, R. (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, **427**, 808-814.

- Hammadi, M., Oulidi, A., Gackiere, F., Katsogiannou, M., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Dewailly, E., Delcourt, P., Lepage, G., Lotteau, S., Ducreux, S., Prevarskaya, N. and Van Coppenolle, F. (2013) Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *Faseb J*, **27**, 1600-1609.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
- Hampton, R.Y. (2000) ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol*, **10**, R518-521.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A. and Akey, C.W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 721-732.
- Hann, B.C. and Walter, P. (1991) The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell*, **67**, 131-144.
- Harada, Y., Li, H., Wall, J.S., Li, H. and Lennarz, W.J. (2011) Structural studies and the assembly of the heptameric post-translational translocon complex. *J Biol Chem*, **286**, 2956-2965.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K. (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, **114**, 4557-4565.
- Hassdenteufel, S., Schäuble, N., Cassella, P., Leznicki, P., Müller, A., High, S., Jung, M. and Zimmermann, R. (2011) Ca²⁺-calmodulin inhibits tail-anchored protein insertion into the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett*, **585**, 3485-3490.
- Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V. and Moss, S.E. (2004) Annexin-actin interactions. *Traffic*, **5**, 571-576.
- He, F., Yaver, D., Beckerich, J.M., Ogrydziak, D. and Gaillardin, C. (1990) The yeast *Yarrowia lipolytica* has two, functional, signal recognition particle 7S RNA genes. *Curr Genet*, **17**, 289-292.
- Hegde, R.S. and Bernstein, H.D. (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci*, **31**, 563-571.
- Hegde, R.S. and Keenan, R.J. (2011) Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 787-798.

- Hellman, R., Vanhove, M., Lejeune, A., Stevens, F.J. and Hendershot, L.M. (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.
- Hendershot, L.M. (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, **71**, 289-297.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hetz, C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 89-102.
- Higgins, M.L. and Schockman, G.D. (1971) Procaryotic cell division with respect to wall and membranes. *CRC Crit Rev Microbiol*, **1**, 29-72.
- High, S. and Dobberstein, B. (1991) The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54-kD protein of signal recognition particle. *J Cell Biol*, **113**, 229-233.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, **10**, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hu, J., Prinz, W.A. and Rapoport, T.A. (2011) Weaving the web of ER tubules. *Cell*, **147**, 1226-1231.
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J. and Ballestrem, C. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol*, **179**, 1043-1057.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. and Mann, M. (2005) Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1265-1272.
- Ishimura, K. and Fujita, H. (1997) Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. *Microsc Res Tech*, **36**, 445-453.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983a) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-168.
- Ito, K., Date, T. and Wickner, W. (1980) Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. *J Biol Chem*, **255**, 2123-2130.

- Ito, K., Wittekind, M., Nomura, M., Shiba, K., Yura, T., Miura, A. and Nashimoto, H. (1983b) A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell*, **32**, 789-797.
- Jermy, A.J., Willer, M., Davis, E., Wilkinson, B.M. and Stirling, C.J. (2006) The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J Biol Chem*, **281**, 7899-7906.
- Jin, Y., Awad, W., Petrova, K. and Hendershot, L.M. (2008) Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP. *Embo J*, **27**, 2873-2882.
- Jin, Y., Zhuang, M. and Hendershot, L.M. (2009) ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues. *Biochemistry*, **48**, 41-49.
- Johnson, A.E. and Haigh, N.G. (2000) The ER translocon and retrotranslocation: is the shift into reverse manual or automatic? *Cell*, **102**, 709-712.
- Johnson, N., Vilardi, F., Lang, S., Leznicki, P., Zimmermann, R. and High, S. (2012) TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci*, **125**, 3612-3620.
- Jung, V., Kindich, R., Kamradt, J., Jung, M., Müller, M., Schulz, W.A., Engers, R., Unteregger, G., Stockle, M., Zimmermann, R. and 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.
- Jungnickel, B. and Rapoport, T.A. (1993) DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) inhibits an early step of protein translocation across the mammalian ER membrane. *FEBS Lett*, **329**, 268-272.
- Kalbfleisch, T., Cambon, A. and Wattenberg, B.W. (2007) A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic*, **8**, 1687-1694.
- Kaltschmidt, E. and Wittmann, H.G. (1970) Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal Biochem*, **36**, 401-412.
- Kang, S.W., Rane, N.S., Kim, S.J., Garrison, J.L., Taunton, J. and Hegde, R.S. (2006) Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell*, **127**, 999-1013.
- Kapp, K., Schrepf, S., Lemberg, M. and Dobberstein, B. (2009) Post-Targeting Functions of Signal Peptides

- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. and Weissman, D. (2004) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*, **172**, 6545-6549.
- Kaufman, R.J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, **13**, 1211-1233.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M. and Walter, P. (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem*, **70**, 755-775.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Walter, P. and Stroud, R.M. (1998) Crystal structure of the signal sequence binding subunit of the signal recognition particle. *Cell*, **94**, 181-191.
- Kenrick, K.G. and Margolis, J. (1970) Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem*, **33**, 204-207.
- Kim, S.J., Mitra, D., Salerno, J.R. and Hegde, R.S. (2002) Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Dev Cell*, **2**, 207-217.
- Klappa, P., Mayinger, P., Pipkorn, R., Zimmermann, M. and Zimmermann, R. (1991) A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *Embo J*, Vol. 10, pp. 2795-2803.
- Kleizen, B. and Braakman, I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 343-349.
- Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, **26**, 231-243.
- Krieg, U.C., Walter, P. and Johnson, A.E. (1986) Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8604-8608.
- Kurzchalia, T.V., Wiedmann, M., Girshovich, A.S., Bochkareva, E.S., Bielka, H. and Rapoport, T.A. (1986) The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature*, **320**, 634-636.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lakkaraju, A.K., Luyet, P.P., Parone, P., Falguieres, T. and Strub, K. (2007) Inefficient targeting to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle elicits selective defects in post-ER membrane trafficking. *Exp Cell Res*, **313**, 834-847.

- Lakkaraju, A.K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A.E. and Strub, K. (2008) SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. *Cell*, **133**, 440-451.
- Lakkaraju, A.K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J.L., Taunton, J. and Strub, K. (2012) Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell*, **23**, 2712-2722.
- Lang, S. (2012) Charakterisierung der Funktionen und Regulationsmechanismen des humanen Sec61 Komplexes auf zellulärer Ebene. *Medizinische Biochemie und Molekularbiologie*. Universität des Saarlandes, Homburg, Vol. Dr. rer. nat, p. 247.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S.V., Schorr, S., Schirra, C., Schäuble, N., Jalal, C., Greiner, M., Hassdenteufel, S., Tatzelt, J., Kreutzer, B., Edelmann, L., Krause, E., Rettig, J., Somlo, S., Zimmermann, R. and Dudek, J. (2012) Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci*, **125**, 1958-1969.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A. and Zimmermann, R. (2011a) Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels (Austin)*, **5**, 228-235.
- Lang, S., Schäuble, N., Cavalie, A. and Zimmermann, R. (2011b) Live cell calcium imaging combined with siRNA mediated gene silencing identifies Ca(2)(+) leak channels in the ER membrane and their regulatory mechanisms. *J Vis Exp*, e2730.
- Lauffer, L., Garcia, P.D., Harkins, R.N., Coussens, L., Ullrich, A. and Walter, P. (1985) Topology of signal recognition particle receptor in endoplasmic reticulum membrane. *Nature*, **318**, 334-338.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N. and Glimcher, L.H. (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, **23**, 7448-7459.
- Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **8**, 397-403.
- Leonhard, K., Guiard, B., Pellicchia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W. and Langer, T. (2000) Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol Cell*, **5**, 629-638.
- Lew, Q.J., Chia, Y.L., Chu, K.L., Lam, Y.T., Gurumurthy, M., Xu, S., Lam, K.P., Cheong, N. and Chao, S.H. (2012) Identification of HEXIM1 as a Positive Regulator of p53. *J Biol Chem*, **287**, 36443-36454.

- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K. and Hoffman, N.E. (1995) A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3789-3793.
- Lilley, K.S., Razzaq, A. and Dupree, P. (2002) Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 46-50.
- Lin, S., Sun, S. and Hu, J. (2012) Molecular basis for sculpting the endoplasmic reticulum membrane. *Int J Biochem Cell Biol*, **44**, 1436-1443.
- Lin, S.X., Grant, B., Hirsh, D. and Maxfield, F.R. (2001) Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 567-572.
- Linxweiler, M., Linxweiler, J., Barth, M., Benedix, J., Jung, V., Kim, Y.J., Bohle, R.M., Zimmermann, R. and Greiner, M. (2012) Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol*, **180**, 473-483.
- Lipp, J., Dobberstein, B. and Haeuptle, M.T. (1987) Signal recognition particle arrests elongation of nascent secretory and membrane proteins at multiple sites in a transient manner. *J Biol Chem*, **262**, 1680-1684.
- Liu, C.Y. and Kaufman, R.J. (2003) The unfolded protein response. *J Cell Sci*, **116**, 1861-1862.
- Liu, C.Y., Xu, Z. and Kaufman, R.J. (2003) Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1alpha. *J Biol Chem*, **278**, 17680-17687.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, **4**, 357-362.
- Loya, A., Pnueli, L., Yosefzon, Y., Wexler, Y., Ziv-Ukelson, M. and Arava, Y. (2008) The 3'-UTR mediates the cellular localization of an mRNA encoding a short plasma membrane protein. *Rna*, **14**, 1352-1365.
- Lyman, S.K. and Schekman, R. (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, **88**, 85-96.
- Lynes, E.M. and Simmen, T. (2011) Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 1893-1905.
- Macfarlane, D.E. (1989) Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride----sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal Biochem*, **176**, 457-463.

- Malkin, L.I. and Rich, A. (1967) Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J Mol Biol*, **26**, 329-346.
- Mariappan, M., Li, X., Stefanovic, S., Sharma, A., Mateja, A., Keenan, R.J. and Hegde, R.S. (2010) A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature*, **466**, 1120-1124.
- Martoglio, B. and Dobberstein, B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol*, **8**, 410-415.
- Martoglio, B., Graf, R. and Dobberstein, B. (1997) Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *Embo J*, **16**, 6636-6645.
- Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J. and Dobberstein, B. (1995) The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell*, **81**, 207-214.
- Mary, C., Scherrer, A., Huck, L., Lakkaraju, A.K., Thomas, Y., Johnson, A.E. and Strub, K. (2010) Residues in SRP9/14 essential for elongation arrest activity of the signal recognition particle define a positively charged functional domain on one side of the protein. *Rna*, **16**, 969-979.
- Mason, N., Ciufu, L.F. and Brown, J.D. (2000) Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *Embo J*, **19**, 4164-4174.
- Mateja, A., Szlachcic, A., Downing, M.E., Dobosz, M., Mariappan, M., Hegde, R.S. and Keenan, R.J. (2009) The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature*, **461**, 361-366.
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K. and Rapoport, T.A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, **97**, 553-564.
- Matlack, K.E., Mothes, W. and Rapoport, T.A. (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, **92**, 381-390.
- Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B. and Rapoport, T.A. (1997) Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science*, **277**, 938-941.
- Mayer, M.P., Brehmer, D., Gassler, C.S. and Bukau, B. (2001) Hsp70 chaperone machines. *Adv Protein Chem*, **59**, 1-44.
- Mayer, M.P. and Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 670-684.

- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, **7**, 766-772.
- Meyer, D.I., Krause, E. and Dobberstein, B. (1982) Secretory protein translocation across membranes- the role of the "docking protein". *Nature*, **297**, 647-650.
- Meyer, H.A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.U. and Hartmann, E. (2000) Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem*, **275**, 14550-14557.
- Micaroni, M. (2012) Calcium around the Golgi apparatus: implications for intracellular membrane trafficking. *Adv Exp Med Biol*, **740**, 439-460.
- Milhavet, O., Gary, D.S. and Mattson, M.P. (2003) RNA interference in biology and medicine. *Pharmacol Rev*, **55**, 629-648.
- Molloy, M.P., Brzezinski, E.E., Hang, J., McDowell, M.T. and VanBogelen, R.A. (2003) Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics*, **3**, 1912-1919.
- Montgomery, M.K., Xu, S. and Fire, A. (1998) RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15502-15507.
- Moritz, C.P. (2012) Neuroproteomics in the auditory brainstem: Identification of region-typical proteins. *Department of animal physiology*. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, p. 251.
- Morris, J.A., Dorner, A.J., Edwards, C.A., Hendershot, L.M. and Kaufman, R.J. (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem*, **272**, 4327-4334.
- Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J. and Rapoport, T.A. (1997) Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell*, **89**, 523-533.
- Müller, G. and 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.
- Müller, G. and Zimmermann, R. (1988) Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *Embo J*, **7**, 639-648.
- Müller, L., de Escauriaza, M.D., Lajoie, P., Theis, M., Jung, M., Müller, A., Burgard, C., Greiner, M., Snapp, E.L., Dudek, J. and Zimmermann, R. (2009) Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell*, **21**, 691-703.

- Müsch, A., Wiedmann, M. and Rapoport, T.A. (1992) Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **69**, 343-352.
- Mutka, S.C. and Walter, P. (2001) Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol Biol Cell*, **12**, 577-588.
- Nakanishi, K., Kamiguchi, K., Torigoe, T., Nabeta, C., Hirohashi, Y., Asanuma, H., Tobioka, H., Koge, N., Harada, O., Tamura, Y., Nagano, H., Yano, S., Chiba, S., Matsumoto, H. and Sato, N. (2004) Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein. *Cell Stress Chaperones*, **9**, 253-264.
- Neuhof, A., Rolls, M.M., Jungnickel, B., Kalies, K.U. and Rapoport, T.A. (1998) Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol Biol Cell*, **9**, 103-115.
- Ng, D.T., Brown, J.D. and Walter, P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 269-278.
- Ni, M. and Lee, A.S. (2007) ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*, **581**, 3641-3651.
- Nicchitta, C.V. (2002) A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 412-416.
- Nicchitta, C.V., Murphy, E.C., 3rd, Haynes, R. and Shelness, G.S. (1995) Stage- and ribosome-specific alterations in nascent chain-Sec61p interactions accompany translocation across the ER membrane. *J Cell Biol*, **129**, 957-970.
- Nishiyama, K., Hanada, M. and Tokuda, H. (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *Embo J*, **13**, 3272-3277.
- Noel, P. and Cartwright, I.L. (1994) A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *Embo J*, **13**, 5253-5261.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J. and Sambrook, J. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell*, **57**, 1223-1236.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**, 4007-4021.
- Ogg, S.C., Poritz, M.A. and Walter, P. (1992) Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, Vol. 3, pp. 895-911.

- Ogg, S.C. and Walter, P. (1995) SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell*, **81**, 1075-1084.
- Okamoto, K. and Shaw, J.M. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **39**, 503-536.
- Ong, H.L., Liu, X., Sharma, A., Hegde, R.S. and Ambudkar, I.S. (2007) Intracellular Ca(2+) release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch*, **453**, 797-808.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 376-386.
- Otero, J.H., Lizak, B. and Hendershot, L.M. (2010) Life and death of a BiP substrate. *Semin Cell Dev Biol*, **21**, 472-478.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-358.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. and Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, 561-570.
- Park, E. and Rapoport, T.A. (2012) Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys*, **41**, 21-40.
- Pavitt, G.D. and Ron, D. (2012) New insights into translational regulation in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.
- Pelham, H.R. and Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, **67**, 247-256.
- Pendin, D., McNew, J.A. and Daga, A. (2011) Balancing ER dynamics: shaping, bending, severing, and mending membranes. *Curr Opin Cell Biol*, **23**, 435-442.
- Perlman, D. and Halvorson, H.O. (1983) A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol*, **167**, 391-409.
- Persengiev, S.P., Zhu, X. and Green, M.R. (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *Rna*, **10**, 12-18.
- Phillips, G.J. and Silhavy, T.J. (1992) The E. coli ffh gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature*, **359**, 744-746.

- Pinton, P., Ferrari, D., Rapizzi, E., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Rizzuto, R. (2001) The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J*, **20**, 2690-2701.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J. and Rapoport, T.A. (1998) Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*, **94**, 795-807.
- Plath, K. and Rapoport, T.A. (2000) Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **151**, 167-178.
- Plath, K., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J. and Rapoport, T.A. (2004) Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **15**, 1-10.
- Plutner, H., Davidson, H.W., Saraste, J. and Balch, W.E. (1992) Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment. *J Cell Biol*, **119**, 1097-1116.
- Pool, M.R. (2005) Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). *Mol Membr Biol*, **22**, 3-15.
- Pool, M.R., Stumm, J., Fulga, T.A., Sinning, I. and Dobberstein, B. (2002) Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science*, **297**, 1345-1348.
- Potter, M.D. and Nicchitta, C.V. (2000) Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **275**, 33828-33835.
- Potter, M.D., Seiser, R.M. and Nicchitta, C.V. (2001) Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol*, **11**, 112-115.
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T.A., Hartmann, E. and Kalies, K.U. (2000) Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *Embo J*, **19**, 1900-1906.
- Rabilloud, T. (2009) Membrane proteins and proteomics: love is possible, but so difficult. *Electrophoresis*, **30 Suppl 1**, S174-180.
- Rabilloud, T., Gianazza, E., Catto, N. and Righetti, P.G. (1990) Amidosulfobetaines, a family of detergents with improved solubilization properties: application for isoelectric focusing under denaturing conditions. *Anal Biochem*, **185**, 94-102.

- Rabu, C., Wipf, P., Brodsky, J.L. and High, S. (2008) A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **283**, 27504-27513.
- Raices, M. and D'Angelo, M.A. (2012) Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 687-699.
- Rapoport, T.A. (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, **450**, 663-669.
- Ren, Y.G., Wagner, K.W., Knee, D.A., Aza-Blanc, P., Nasoff, M. and Deveraux, Q.L. (2004) Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle. *Mol Biol Cell*, **15**, 5064-5074.
- Reynolds, A., Anderson, E.M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W.S. and Khvorova, A. (2006) Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *Rna*, **12**, 988-993.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., Velicelebi, G. and Stauderman, K.A. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*, **169**, 435-445.
- Rose, M.D., Misra, L.M. and Vogel, J.P. (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, **57**, 1211-1221.
- Rothblatt, J.A. and Meyer, D.I. (1986) Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro-alpha-factor in vitro can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. *Embo J*, **5**, 1031-1036.
- Rowland, A.A. and Voeltz, G.K. (2012) Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 607-625.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**, 20-28.
- Rychlik, W., Spencer, W.J. and Rhoads, R.E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6409-6412.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J. and Silver, P. (1989) A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an Escherichia coli heat shock protein. *J Cell Biol*, **109**, 2665-2675.
- Sakaguchi, M., Hachiya, N., Mihara, K. and Omura, T. (1992) Mitochondrial porin can be translocated across both endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Biochem*, **112**, 243-248.

- Samarin, S.N., Koch, S., Ivanov, A.I., Parkos, C.A. and Nusrat, A. (2010) Coronin 1C negatively regulates cell-matrix adhesion and motility of intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **391**, 394-400.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santoni, V., Molloy, M. and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*, **21**, 1054-1070.
- Saraogi, I., Akopian, D. and Shan, S.O. (2011) A tale of two GTPases in cotranslational protein targeting. *Protein Sci*, **20**, 1790-1795.
- Sato, T., Nyborg, A.C., Iwata, N., Diehl, T.S., Saido, T.C., Golde, T.E. and Wolfe, M.S. (2006) Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Biochemistry*, **45**, 8649-8656.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, O., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., Paton, A.W., Paton, J.C., Cavalie, A. and Zimmermann, R. (2012) BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *Embo J*, **31**, 3282-3296.
- Schlenker, O., Hendricks, A., Sinning, I. and Wild, K. (2006) The structure of the mammalian signal recognition particle (SRP) receptor as prototype for the interaction of small GTPases with Longin domains. *J Biol Chem*, **281**, 8898-8906.
- Schlenstedt, G., Gudmundsson, G.H., Boman, H.G. and Zimmermann, R. (1990) A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem*, **265**, 13960-13968.
- Schlenstedt, G. and Zimmermann, R. (1987) Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *Embo J*, **6**, 699-703.
- Schröder, K., Martoglio, B., Hofmann, M., Holscher, C., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A. and Dobberstein, B. (1999) Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *Embo J*, **18**, 4804-4815.
- Seiser, R.M. and Nicchitta, C.V. (2000) The fate of membrane-bound ribosomes following the termination of protein synthesis. *J Biol Chem*, **275**, 33820-33827.
- Shamu, C.E. (1997) Splicing together the unfolded-protein response. *Curr Biol*, **7**, R67-70.
- Shamu, C.E. (1998) Splicing: HACKing into the unfolded-protein response. *Curr Biol*, **8**, R121-123.

- Shao, S. and Hegde, R.S. (2011a) A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell*, **147**, 1576-1588.
- Shao, S. and Hegde, R.S. (2011b) Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **27**, 25-56.
- Shen, Y. and Hendershot, L.M. (2005) ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell*, **16**, 40-50.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K. and Rapoport, T.A. (2006) Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, **126**, 435-439.
- Sidrauski, C., Chapman, R. and Walter, P. (1998) The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol*, **8**, 245-249.
- Singer, S.J., Maher, P.A. and Yaffe, M.P. (1987) On the translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1015-1019.
- Sipos, L. and von Heijne, G. (1993) Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur J Biochem*, **213**, 1333-1340.
- Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M. and Gill, D.L. (2012) STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 549-565.
- Song, W., Raden, D., Mandon, E.C. and Gilmore, R. (2000) Role of Sec61alpha in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. *Cell*, **100**, 333-343.
- Staehelin, L.A. (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J*, **11**, 1151-1165.
- Stefanovic, S. and Hegde, R.S. (2007) Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*, **128**, 1147-1159.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R. and Schekman, R. (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **3**, 129-142.
- Struck, D.K., Lennarz, W.J. and 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.
- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*, **47**, 819-846.

- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, **7**, 880-885.
- Szul, T. and Sztul, E. (2011) COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)*, **26**, 348-364.
- Taddei, A., Schober, H. and Gasser, S.M. (2012) The budding yeast nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a000612.
- Terzi, L., Pool, M.R., Dobberstein, B. and Strub, K. (2004) Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. *Biochemistry*, **43**, 107-117.
- Thomas, Y., Bui, N. and Strub, K. (1997) A truncation in the 14 kDa protein of the signal recognition particle leads to tertiary structure changes in the RNA and abolishes the elongation arrest activity of the particle. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1920-1929.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M.H., Haas, I.G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J. and Zimmermann, R. (2000) Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7214-7219.
- Unlü, M., Morgan, M.E. and Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, **18**, 2071-2077.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C. and Rapoport, T.A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 36-44.
- Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I. and Brethes, D. (2009) Mitochondrial F1F0-ATP synthase and organellar internal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 1783-1789.
- Vembar, S.S., Jonikas, M.C., Hendershot, L.M., Weissman, J.S. and Brodsky, J.L. (2010) J domain co-chaperone specificity defines the role of BiP during protein translocation. *J Biol Chem*, **285**, 22484-22494.
- Vilardi, F., Lorenz, H. and Dobberstein, B. (2011) WRB is the receptor for TRC40/Asn1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci*, **124**, 1301-1307.
- Viswanathan, S., Unlü, M. and Minden, J.S. (2006) Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc*, **1**, 1351-1358.
- Vogel, J.P., Misra, L.M. and Rose, M.D. (1990) Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol*, **110**, 1885-1895.

- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. and Rapoport, T.A. (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 25-35.
- von Heijne, G. (1981) On the hydrophobic nature of signal sequences. *Eur J Biochem*, **116**, 419-422.
- von Heijne, G. (1984) Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells. *Embo J*, **3**, 2315-2318.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol*, **184**, 99-105.
- von Heijne, G. (1986) Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol*, **189**, 239-242.
- von Heijne, G. (1990) The signal peptide. *J Membr Biol*, **115**, 195-201.
- Wahlberg, J.M. and Spiess, M. (1997) Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain. *J Cell Biol*, **137**, 555-562.
- Wallin, E. and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci*, **7**, 1029-1038.
- Walter, P. and Blobel, G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, **91**, 551-556.
- Walter, P. and Blobel, G. (1983) Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol*, **96**, 84-93.
- Walter, P., Ibrahimi, I. and 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.
- Walter, P. and Ron, D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, **334**, 1081-1086.
- Walters, A.D., Bommakanti, A. and Cohen-Fix, O. (2012) Shaping the nucleus: factors and forces. *J Cell Biochem*, **113**, 2813-2821.
- Wang, X. and Johnsson, N. (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates Sec63p to stimulate the assembly of the endoplasmic reticulum protein translocation apparatus. *J Cell Sci*, **118**, 723-732.

- Watts, C., Wickner, W. and Zimmermann, R. (1983) M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2809-2813.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244**, 4406-4412.
- Wegrzyn, R.D., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Graf, C. and Deuring, E. (2006) A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains. *J Biol Chem*, **281**, 2847-2857.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K. and Martoglio, B. (2002) Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science*, **296**, 2215-2218.
- Weitzmann, A., Baldes, C., Dudek, J. and Zimmermann, R. (2007) The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *Febs J*, **274**, 5175-5187.
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13797-13801.
- Westermann, B. (2002) Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, **3**, 527-531.
- Wiech, H., Sagstetter, M., Müller, G. and 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.
- Wild, K., Halic, M., Sinning, I. and Beckmann, R. (2004) SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1049-1053.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Sanchez, J.C., Bairoch, A. and Hochstrasser, D.F. (1998) Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis*, **19**, 1501-1505.
- Wilkinson, B.M. and Stirling, C.J. (2009) Sec complexes in the yeast ER. In Zimmermann, R. (ed.), *Protein transport into the Endoplasmic Reticulum*. Landes Bioscience.
- Wilson, R., Allen, A.J., Oliver, J., Brookman, J.L., High, S. and Bulleid, N.J. (1995) The translocation, folding, assembly and redox-dependent degradation of secretory and membrane proteins in semi-permeabilized mammalian cells. *Biochem J*, **307** (Pt 3), 679-687.

- Wittke, S., Dünwald, M. and Johnsson, N. (2000) Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell*, **11**, 3859-3871.
- Wittmann-Liebold, B., Graack, H.R. and Pohl, T. (2006) Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, **6**, 4688-4703.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Young, B.P., Craven, R.A., Reid, P.J., Willer, M. and Stirling, C.J. (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.
- Yu, M., Haslam, R.H. and Haslam, D.B. (2000) HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J Biol Chem*, **275**, 24984-24992.
- Yu, S. and Liang, Y. (2012) A trapper keeper for TRAPP, its structures and functions. *Cell Mol Life Sci*.
- Zahedi, R.P., Meisinger, C. and Sickmann, A. (2005) Two-dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride/SDS-PAGE for membrane proteomics. *Proteomics*, **5**, 3581-3588.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zhang, X., Schaffitzel, C., Ban, N. and Shan, S.O. (2009) Multiple conformational switches in a GTPase complex control co-translational protein targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1754-1759.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M. and Snyder, M. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, **293**, 2101-2105.
- Ziegler, W.H., Gingras, A.R., Critchley, D.R. and Emsley, J. (2008) Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem Soc Trans*, **36**, 235-239.
- Zimmermann, R. (1998) The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol Chem*, **379**, 275-282.
- Zimmermann, R., Eyrich, S., Ahmad, M. and Helms, V. (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta*, **1808**, 912-924.

- Zimmermann, R. and Mollay, C. (1986) Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing, and sequestration. *J Biol Chem*, **261**, 12889-12895.
- Zimmermann, R., Müller, L. and Wullich, B. (2006) Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends Mol Med*, **12**, 567-573.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1988) Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *Embo J*, **7**, 2875-2880.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M. and Schlenstedt, G. (1990a) Ribonucleoparticle-independent import of proteins into mammalian microsomes involves a membrane protein which is sensitive to chemical alkylation. *Biochimie*, **72**, 95-101.
- Zimmermann, R., Zimmermann, M., Wiech, H., Schlenstedt, G., Müller, G., Morel, F., Klappa, P., Jung, C. and Cobet, W.W. (1990b) Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. *J Bioenerg Biomembr*, **22**, 711-723.
- Zopf, D., Bernstein, H.D. and Walter, P. (1993) GTPase domain of the 54-kD subunit of the mammalian signal recognition particle is required for protein translocation but not for signal sequence binding. *J Cell Biol*, **120**, 1113-1121.

VII. Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und der damit verbundenen Möglichkeit dieser Promotionsarbeit. Vielen Dank für die intensive Betreuung und Förderung sowie die stetige Bereitschaft zur Diskussion von Fragen und Problemen. Ein besonderer Dank gilt ihm für seine Begabung eine sehr herzliche Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Prof. Dr. Johannes Herrmann danke ich nicht nur für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur, sondern nochmals für die Betreuung meiner Diplomarbeit. Er hat mir den Weg in die AG Zimmermann erst ermöglicht.

Zudem möchte ich mich bei den Kollaborationspartnern der differentiellen Proteomanalyse bedanken, namentlich Prof. Dr. Albert Sickmann und Dr. René P. Zahedi. Außerdem danke ich der AG Schlenstedt für die Unterstützung bei der Durchführung der Hefe-Komplementationsstudien und Birgit Klemmer und Hannes Linxweiler für die Hilfe bei den qRT-PCR-Studien.

Daneben möchte ich mich auch herzlichst bei den Mitgliedern der AG Zimmermann bedanken. Besonders Dr. Markus Greiner gebührt ein großer Dank für seine Unterstützung, Beratung und seine ständige Hilfsbereitschaft, sei es bei technischen, wissenschaftlichen oder Zahn-Problemen. Dr. Martin Jung und Dr. Johanna Dudek danke ich ebenso für ihre Unterstützung bei Fragen und Problemen. Ich danke den guten Seelen im Labor, Anika Müller, Monika Lerner und Simone Amann, für ihre unschätzbare Hilfe. Ebenso danke ich der hohen Hilfsbereitschaft und Freundschaft unter den Doktoranden der Arbeitsgruppe. Sollte ein Tag mal nicht so gut gelaufen sein, gab es immer ein nettes und aufbauendes Wort von eurer Seite. Linda, Sven, Nico, Stefan, Sarah, Julia, Sabine, Armin, Max, Hannes: Danke!

Ich danke ebenso meinen Freunden, die für die nötige Abwechslung gesorgt haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Sie haben mir einen unglaublichen Rückhalt in den Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit gegeben. Ich danke meiner Schwester und meinen Eltern, dass sie immer für mich da waren und mich bei allem ganz selbstlos unterstütz haben. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen. Ich danke Felix dafür, dass er mit seiner Fröhlichkeit und Unbeschwertheit an manch schlechtem Tag mit einem einzigen Lächeln den Frust hat verschwinden lassen. Abschließend danke ich von ganzem Herzen Carsten, dass er in den letzten 6 Jahren immer an mich geglaubt hat, mich mit viel Liebe unterstützt hat und immer zu mir gehalten hat. Ohne ihn wäre ich jetzt nicht an diesem Punkt.

DANKE!