

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

**Charakterisierung der Funktionen von Calmodulin und BiP bei der
Regulation des humanen Sec61-Komplexes**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von: Nico Schäuble

geb. am: 22.07.1982 in Waldshut-Tiengen

Meiner Familie gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	7
III. Zusammenfassung/Summary	12
III.1. Zusammenfassung	12
III.2. Summary	14
IV. Einleitung	16
IV.1. Das endoplasmatische Retikulum	16
IV.1.1. Proteintransport ins endoplasmatische Retikulum.....	17
IV.1.2. Die Proteintranslokase des endoplasmatischen Retikulums	24
IV.1.3. Akzessorische Proteine der ER-Translokase	27
IV.1.4. Die „unfolded protein response“ (UPR)	36
IV.1.5. Die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD)	37
IV.2. Zelluläres Calcium	37
IV.2.1. Ca ²⁺ -bindende Proteine des ER	38
IV.2.2. Ca ²⁺ -Pumpen und -Austauscher	39
IV.2.3. Ca ²⁺ -Leckkanäle	40
IV.2.4. Das Ca ²⁺ -Sensorprotein Calmodulin	41
IV.2.5. Der „store-operated Ca ²⁺ -entry“ (SOCE)	42
IV.3. Ziele der Arbeit	44
V. Material und Methoden	45
V.1. Material	45
V.1.1. Geräte.....	45
V.1.2. Chemikalien.....	47
V.1.3. Enzyme und sekundäre Antikörper.....	49
V.1.4. Primäre Antikörper	50
V.1.5. Oligonukleotide	51
V.1.6. Plasmide.....	52
V.1.7. Zelllinien.....	54
V.1.8. Bakterienstämme	55
V.1.9. Raue Mikrosomen.....	55
V.2. Methoden	56
V.2.1. Biochemische Analysemethoden	56
V.2.2. Molekularbiologische Analysemethoden.....	73
V.2.3. <i>In vitro</i> Proteinsynthese und Transportstudien	80

V.2.4. Zellkulturtechniken.....	88
V.2.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	98
V.2.6. Echtzeit-Messungen von zellulärem Calcium - Ca ²⁺ -„imaging“.....	102
V.2.7. Statistische Analyse von Daten.....	115
VI. Ergebnisse	116
VI.1. Einfluss von Calmodulin auf den Sec61-Komplex.....	116
VI.1.1. Einfluss von CaM-Inhibitoren auf den <i>in vitro</i> Proteinimport ins ER.....	117
VI.1.2. Einfluss von Calmodulin auf die Ca ²⁺ -Homöostase des ER.....	130
VI.2. Einfluss der Sec61α-Manipulation auf die zelluläre Ca²⁺-Homöostase und den Proteintransport ins ER	137
VI.2.1. Überprüfung des Sec61 α -Proteingehaltes mittels Western-Blot	138
VI.2.2. Einfluss der Sec61 α -Modulation auf Viabilität und ER-Morphologie	144
VI.2.3. Einfluss der Sec61 α -Modulation auf den <i>in vitro</i> Transport in SPZ	149
VI.2.4. Einfluss der Sec61 α -Modulation auf die Ca ²⁺ -Homöostase des ER.....	151
VI.2.5. Einfluss der Retrotranslokation auf den Ca ²⁺ -Ausstrom aus dem ER	161
VI.3. Einfluss der BiP-Manipulation auf den ER-Import und den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER.....	164
VI.3.1. Überprüfung des zellulären BiP-Gehaltes mittels Western-Blot	164
VI.3.2. Einfluss der BiP-Modulation auf Zellproliferation und ER-Stress.....	175
VI.3.3. <i>In vitro</i> Proteintransport in das ER BiP-depletierter Säugetierzellen	181
VI.3.4. Einfluss der BiP-Depletion auf die Ca ²⁺ -Homöostase des ER	185
VI.3.5. Überprüfung der zellulären Konzentration an freiem Ca ²⁺ von HeLa-Zellen nach diversen Genexpressionsmanipulationen für 48 h.....	196
VI.3.6. Untersuchung weiterer abundanter Ca ²⁺ -bindender ER-Chaperone	197
VI.4. BiP-Sec61α-Interaktionsstudien.....	200
VII. Diskussion.....	203
VII.1. Charakterisierung der Funktionen von Calmodulin	204
VII.1.1. Diverse CaM-Antagonisten inhibieren den cotranslationalen <i>in vitro</i> Proteinimport ins ER.....	204
VII.1.2. CaM-Inhibition begünstigt den posttranslationalen <i>in vitro</i> Import Signalsequenz-abhängiger Proteine ins ER	207
VII.1.3. CaM reguliert Ca ²⁺ -abhängig die Insertion von „tail-anchored“-Proteinen in die ER-Membran.	208
VII.1.4. Das Sec61 α -IQ-Motiv ist nicht essentiell für den Proteintransport und die Zellvitalität	210
VII.1.5. CaM reguliert den Sec61-vermittelten Ca ²⁺ -Leckstrom aus dem ER nach Termination der Proteinsynthese.....	212
VII.2. Exotoxin A inhibiert die Öffnung des Sec61α-Komplexes	218
VII.3. Charakterisierung der Funktionen von BiP	219

I. Inhaltsverzeichnis

VII.3.1. Die siRNA-vermittelte BiP-Depletion führt zur UPR-Aktivierung und Inhibition der Zellproliferation.....	220
VII.3.2. Reduktion von BiP durch siRNA führt zur UPR-vermittelten Steigerung des ER-Importes	224
VII.3.3. BiP fungiert als ER-luminaler Regulator des Sec61-Komplexes	226
VII.4. Hypothetisches Modell des CaM-BiP-Zusammenspiels	229
VII.5. Ca²⁺-Leckstrom über den Sec61-Komplex: Physiologische Bedeutung?	232
VIII. Literatur.....	235
IX. Danksagung.....	277
X. Lebenslauf.....	278

II. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (= 10^{-10} m = 0,1 nm)
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethylester
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	„immunoglobulin heavy chain binding protein“, auch Grp78
bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
°C	Grad Celsius
$\text{Ca}^{2+}/[\text{Ca}^{2+}]$	Calciumion/Calciumionenkonzentration
CAL	Calmidazolium (CaM-Antagonist)
CALR	Calretikulin
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (korrespondierendes CaM-Bindepeptid der CaMKII als CaM-Antagonist)
CCE	„capacitive calcium entry“ (= kapazitiver Calciumeinstrom), auch SOCE
Ci	Curie
CICR	„ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release“ (= Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung)
CMV	Cytomegalie-Virus
CTP	Cytidintriphosphat
Cytb5	Cytochrom b5
CRAC	„calcium-release activated Ca^{2+} current“
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (= Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

II. Abkürzungsverzeichnis

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Protein-Degradation
ERj	„ER-associated dnaJ protein“
F	Fluoreszenzintensität
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> bzw. <i>et alie</i> (= und andere, je nach Genus)
FCS	„fetal calve serum“ (= fetales Kälberserum)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
Grp	„glucose-regulated protein“
h	„hour“ (= Stunde)
HBSS	„Hanks buffered salt solution“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsc	„heat shock cognate“ (konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein)
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Inositoltriphosphat (Inositol-1,4,5-trisphosphat)
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	„lysogeny broth“
LM-2	limitierendes DMEM (ohne L-Leucin und L-Methionin)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Molarität [mol/l]
mA	Milliampere
m ⁷ GpppG	5´-(7-Methyl)-guanosin-5´-guanosintriphosphat
min	Minute
mRNA	„messenger“-RNA (= Boten-RNA)
MW	„molecular weight“ (= Molekulargewicht)
n	nano (10 ⁻⁹)
N-Terminus	Amino-Terminus
NBD	Nukleotid-Bindedomäne

II. Abkürzungsverzeichnis

NC(K)X	Natrium-Calcium-(Kalium)-Austauscher der Plasmamembran
NEF	„nucleotide exchange factor“ (= Nukleotidaustauschfaktor)
Neo	Neomycin
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
Ophio A	Ophiobolin A (CaM-Antagonist)
Orai1	„calcium release-activated calcium channel protein 1“
ORF	„open reading frame“ (= offener Leserahmen)
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAS	Photo-Aminosäure
PBS	„phosphate buffered saline“ (= Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	„polymerase chain reaction“ (= Polymerasekettenreaktion)
Phb	Phenoxybenzamin
Pdi	Proteindisulfidisomerase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PK	Proteinase K
PLAC	Proteaseinhibitormix (Pepstatin A, Leupeptin, Antipain, Chymostatin)
pp α F	Präpro- α -Faktor
ppcecA	Präprocecropin A
pMet	L-Photo-Methionin (L-2-Amino-5,5-azi-Hexansäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMCA	„plasma membrane calcium ATPase“ (= Ca ²⁺ -ATPase der Plasmamembran)
pLeu	L-Photo-Leucin (L-2-Amino-4,4-azi-Pentansäure)
ppl	Präprolaktin
P/S	Penicillin/Streptomycin
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative „real-time“ PCR (= quantitative Echtzeit-PCR)
R	„ratio“ (= Verhältnis)
RISC	„RNA-induced silencing complex“ (= RNA induzierter Stilllegungskomplex)
RM	raue Mikrosomen
RNA	„ribonucleic acid“ (= Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RNaseA	Ribonuklease A

II. Abkürzungsverzeichnis

RNC	„ribosome-nascent chain complex“ (= Ribosom-naszierende-Kette-Komplex)
rpm	„rotations per minute“ (= Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SBD	Substrat-Bindedomäne
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (= Natriumdodecylsulfat)
Sec	Sekretions-Mutante
SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SMCC	Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexan-1-Carboxylat
siRNA	„small interfering“ RNA (kleine interferierende RNA)
SOCE	„store-operated Ca ²⁺ entry“ (= Speichervermittelter Ca ²⁺ -Eintritt), auch CCE
SPC	Signalpeptidasekomplex
SPPase	Signalpeptidpeptidase
SPZ	semi-permeabilisierte Zellen
SR	SRP-Rezeptor
SRP	„signal recognition particle“ (= Signalerkennungspartikel)
Stim1	„stromal interaction molecule 1“
Syb2	Synaptobrevin2
TA-MP	„tail-anchored“ Membranprotein (= Endanker-Membranprotein)
TB	„terrific broth“
TBS	„tris buffered saline“ (= Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Thapsigargin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TFP	Trifluoperazin (CaM-Antagonist)
TTP	Thymidintriphosphat
Tuni	Tunicamycin
TX-100	Triton X-100
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
UPR	„unfolded protein response“ (= Antwort auf ungefaltete Proteine)

II. Abkürzungsverzeichnis

UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	„volume/volume“ (= Volumenprozent)
WST	„water soluble tetrazolium“
w/v	„weight/volume“ (= Gewichtsprozent)

Ein-(Drei)-Buchstabencode für Aminosäuren

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

III. Zusammenfassung/Summary

III.1. Zusammenfassung

Die Biogenese eines Drittels der Proteine eukaryotischer Zellen erfordert den Transport über oder die Integration in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Dieser Vorgang wird generell mit Hilfe einer ER-Translokase mit dem heterotrimeren Sec61-Komplex als Kernkomponente bewerkstelligt. Gleichzeitig fungiert das ER in Säugetierzellen als Hauptspeicherorganell für Calcium (Ca^{2+}), einem wichtigen Bestandteil der zellulären Signaltransduktion. Diverse Studien haben gezeigt, dass das Translokon einen hydrophilen, ionenpermeablen Kanal darstellt und auf zellulärer Ebene, insbesondere nach Termination der Translokation, transient die Passage von Ca^{2+} erlaubt. Bislang war nicht bekannt, wie die Zelle trotz der hohen Translokationsrate eine adäquate Permeabilitätsbarriere zwischen Zytosol (50-100 nM Ca^{2+}) und ER-Lumen (100-800 μM Ca^{2+}) aufrechterhält. Der Sec61-Komplex weist jedoch eine hochdynamische Struktur auf, die sowohl hinsichtlich ihrer Funktion beim Proteintransport wie auch als Ca^{2+} -Leckkanal durch eine Vielzahl akzessorischer Proteine moduliert wird. Basierend auf *in vitro* Experimenten, die eine limitierende Wirkung des zytosolischen Ca^{2+} -Sensorproteins Calmodulin (CaM) und des ER-luminalen Hsp70-Chaperons BiP auf die Ionen- bzw. Ca^{2+} -Permeabilität der Translokase zeigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die regulatorischen Funktionen beider Proteine beim Proteintransport und bei der Ca^{2+} -Homöostase auf Ebene humaner Zellen funktional charakterisiert. Zur Untersuchung der Rolle von CaM beim ER-Import erfolgten zunächst *in vitro* Transportstudien mit diversen CaM-Antagonisten in rauen Hundepankreas-mikrosomen. Hierbei zeigte sich nicht nur eine unspezifische Inhibition des Importes verschiedener Modellsubstrate durch einige der Antagonisten, sondern auch eine Ca^{2+} -CaM-abhängige Inhibition der Membranintegration des Sec61-unabhängigen „tail-anchored“-Membranproteins (TA-MP) Cytochrom b5. CaM kann daher Ca^{2+} abhängig die Insertion von TA-MP in die ER-Membran steuern. Bezüglich der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase bewirkte die CaM-Inhibition in Ca^{2+} -„imaging“-Experimenten eine signifikante Erhöhung des Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER, welcher durch Thapsigargin-Behandlung in Ca^{2+} -freiem Puffer demaskiert und somit gemessen werden kann. Dieser Effekt wurde wiederum durch siRNA-vermittelte Sec61 α -Depletion unterdrückt. Die Komplementation mit Sec61 α -R24A/K29A, einer Sec61 α -Mutante mit einem defekten, zytosolischen IQ-Motiv für die Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung, konnte diesen Phänotyp im Gegensatz zur Wildtyp-Kopie nicht aufheben, war jedoch in der Lage sowohl die Viabilität als auch die Transportkompetenz der humanen Zellen zu retten. Ferner weist diese Mutante eine generell erhöhte Ca^{2+} -Permeabilität auf. CaM reguliert somit auf zellulärer Ebene den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER über den Sec61-Komplex durch Ca^{2+} -abhängige Interaktion mit dem Sec61 α -IQ-Motiv. Mit Hilfe des bakteriellen Exotoxin A wurde ferner bestätigt, dass der Export von Proteinen aus dem ER ebenfalls einen Einfluss auf den Ca^{2+} -Leckstrom ausübt. Zur Untersuchung des Einflusses von BiP auf den passiven Ca^{2+} -

III. Zusammenfassung/Summary

Efflux aus dem ER humaner Zellen wurde das Protein mittels siRNA depletiert. Abhängig von der BiP-Konzentration wurde ein signifikanter Anstieg des Ca^{2+} -Leckstroms auf Ebene des Sec61-Komplexes nachgewiesen. Zudem konnte dieser Phänotyp durch gleichzeitige Expression der *BIP*-cDNA wieder gerettet werden. Diese Spezifität der *BIP* siRNA wurde ferner in analogen Rettungsansätzen zur Untersuchung der Viabilität und der ER-Stress-Induktion verifiziert, da eine prolongierte BiP-Depletion sowohl zur UPR-Aktivierung als auch zur Inhibition der Zellproliferation führt, beide Effekte jedoch durch *BIP*-Expression aufgehoben wurden. Weder das Hefe-Ortholog *KAR2* noch zwei *BIP*-Mutanten (R197E bzw. -H), die defizient in der Assoziation mit Hsp40-Cochaperonen und in der Freisetzung von Substraten sind, waren in der Lage die genannten Phänotypen zu retten. Auch übt die Depletion weiterer Ca^{2+} -bindender Chaperone des ER (Grp94, Pdi und Calretikulin) keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER aus. Nicht zuletzt wurden Hinweise auf eine direkte Interaktion von BiP mit Sec61 α geliefert. BiP fungiert somit in höheren Eukaryoten als ER-luminaler Regulator des Sec61-Komplexes und limitiert den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER im Ruhezustand, indem es offensichtlich in Form einer typischen Substratbindung direkt mit der porenbildenden Sec61 α -Untereinheit interagiert. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass diese Bindung ER-Stress-labil ist und bei der Induktion der Ca^{2+} -vermittelten Apoptose von Bedeutung ist.

III.2. Summary

About one third of the proteins in eukaryotic cells have to be translocated across or inserted into the endoplasmic reticulum (ER) membrane as a crucial step during their synthesis. This process is typically facilitated by a protein translocase with the heterotrimeric Sec61 complex as core component. In addition, the ER serves as a major storage organelle for Calcium (Ca^{2+}), which is important for cell signaling. Studies from different laboratories provide evidence, that the translocon forms a hydrophilic, ion permeable channel which transiently allows the passage of Ca^{2+} *in vivo*, especially after termination of protein translocation. But so far it is unclear, how the cell can manage the frequent opening of those pores and keep up an adequate permeability barrier between cytosol (50-100 nM Ca^{2+}) and ER lumen (100-800 μM Ca^{2+}) at the same time. It is known however, that the Sec61 complex has a highly dynamic structure modulated by several accessory proteins for proper gating between the open and closed state. Based on available *in vitro* experiments, showing a limiting influence of the cytosolic Ca^{2+} sensor protein Calmodulin (CaM) and the ER luminal hsp70 chaperone BiP on the ion/ Ca^{2+} permeability of the translocase, in the present work the regulatory functions of both proteins were characterized at the cellular level. To investigate the role of CaM during ER-import first *in vitro* translocation assays in rough microsomes from canine pancreas were carried out in the presence of different CaM antagonists, showing an unspecific inhibitory effect on the import of various model substrates for some of these antagonists. Moreover membrane integration of the Sec61-independent tail-anchored protein (TA-MP) cytochrome b5 was specifically inhibited by Ca^{2+} -CaM, implicating a Ca^{2+} -dependent regulatory role for CaM in the TA-MP-insertion into the ER membrane. Concerning Ca^{2+} -homeostasis inhibiting CaM-function by antagonists significantly increased the Ca^{2+} leakage from the ER measured by Ca^{2+} -imaging, whereas siRNA mediated gene silencing directed against *SEC61A1* suppressed this effect. Unlike the Sec61 α wildtype, complementation with a Sec61 α -R24A/K29A mutant, carrying a defective, cytosolic IQ-motif for Ca^{2+} -dependent CaM-binding, did not restore the wildtype phenotype, but is able to rescue viability and transport competence. Moreover, this mutant had an increased Ca^{2+} -permeability in general. Thus, CaM regulates the passive Ca^{2+} efflux from the ER across the Sec61 complex by interacting with the N-terminally located IQ-motif of Sec61 α . Furthermore, by using the bacterial exotoxin A it was demonstrated that export of proteins from the ER also interferes with the Ca^{2+} leakage at the cellular level. To characterize the influence of BiP on the passive Ca^{2+} release from the ER of human cells the protein was depleted by siRNA treatment. Dependent on the cellular BiP concentration a significant increase in Ca^{2+} leakage at the level of the Sec61 complex was detected. Moreover, simultaneous expression of a *BIP* cDNA copy rescued this phenotype. This specificity was also proven in analogous rescue approaches monitoring cell viability as well as ER stress induction, because long time BiP depletion affects cell proliferation and leads to UPR-activation. Whereas *BIP*-expression could restore the wildtype conditions, neither the yeast ortholog *KAR2* nor two *BIP* mutants (R197E or -H), unable to associate with hsp40 cochaperones and to release bound substrates, could rescue the mentioned phenotypes. As another

III. Zusammenfassung/Summary

proof of specificity three further major Ca^{2+} -binding proteins (Grp94, Pdi and Calreticulin) of the ER were also depleted, but did not increase Ca^{2+} leakage from the ER. Finally, a direct interaction between BiP and Sec61 α was shown by cross linking and Ni^{2+} -pulldown experiments. Thus, BiP acts as an ER-luminal regulator for gating the Sec61 complex in higher eukaryotes by limiting Ca^{2+} efflux from the ER under resting conditions and seems to bind directly to the pore forming subunit Sec61 α in a manner similar to a typical BiP-substrate-interaction. In the context of available data, this mechanism of Sec61-gating by BiP appears to be susceptible to ER-stress and obviously plays a role in the induction of Ca^{2+} -release mediated apoptosis.

IV. Einleitung

Die Zelle bildet die kleinstmögliche lebende Einheit eines Organismus. Bereits im 17. Jahrhundert machte der englische Physiker Robert Hooke mikroskopische Beobachtungen an Dünnschnitten von Kork, dessen gleichartige, porenartige Strukturen er mit dem Begriff der „Zelle“ (*lat. cellula*, kleiner Raum) prägte (Mazzarello, 1999). Der Botaniker Matthias Jakob Schleiden (1804–1881) und der Zoologe Theodor Schwann (1810–1882) formulierten schließlich hundert Jahre später die „Zelltheorie“, welche besagt, dass die grundlegenden Elemente aller Gewebe aus Zellen bestehen und dies als universales Prinzip aller elementaren Bestandteile eines Organismus gilt (Schwann, 1993; Wolpert, 1995). Ende des 19. Jahrhunderts wurden neben den bereits bekannten zellulären Kompartimenten wie dem Zytoplasma und dem Nukleus mit Verbesserung der Mikroskopie- und Färbetechniken nach und nach alle bekannten Organellen identifiziert. Hierzu gehören die Mitochondrien, der Golgi-Apparat und nicht zuletzt das endoplasmatische Retikulum, dessen vielseitige Eigenschaften wie die Beteiligung an der Proteinsynthese oder an der zellulären Ca^{2+} -Homöostase Thema dieser Dissertation sind (Mazzarello, 1999; Mazzarello *et al.*, 2003; Mazzarello *et al.*, 2009).

IV.1. Das endoplasmatische Retikulum

Als einem der wichtigsten Organellen der eukaryotischen Zelle kommen dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bedeutende Aufgaben, wie die Synthese und Translokation von Proteinen ins Lumen bzw. deren Insertion in die ER-Membran, zu (Gilmore *et al.*, 1982a; Wilkinson *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2011). Innerhalb des ER-Lumens werden die Polypeptide mit Hilfe einer Reihe von Chaperonen korrekt gefaltet sowie posttranslational modifiziert (Braakman und Bulleid, 2011; Kleizen und Braakman, 2004; Ma und Hendershot, 2001). Diesen Syntheseweg verfolgen etwa 30 % der Proteine die im humanen Genom kodiert sind, was die Proteine des ER, des Golgi-Apparates, der Lyso- und Endosomen, der Plasmamembran und alle zu sezernierenden Proteine miteinschließt (Chen *et al.*, 2010; High und Stirling, 1993). Das ER stellt neben dem Eintrittspunkt für Proteine in den Sekretionsweg ferner den Ort der Steroid-, Fettsäure- und Phospholipidsynthese sowie der Detoxifikation (Baumann und Walz, 2001; McMaster, 2001) dar und repräsentiert ein Hauptspeicherorganell für zelluläres Ca^{2+} (Baumann und Walz, 2001; Brostrom und Brostrom, 2003), einem sekundärem Botenstoff für die intrazelluläre Signalweiterleitung (Clapham, 2007). Der luminaire Bereich des peripheren ER ist mit der Kernhülle („nuclear envelope“, NE) verbunden und bildet mit dieser ein Kontinuum. Abhängig vom Zelltyp nehmen diese intrazellulären Membranen ca. 10 % des Zellvolumens (Prinz *et al.*, 2000b; Voeltz, 2002) und sogar bis zu 50 % der gesamten Membranfraktion ein (Chevet *et al.*, 2001). Die deutlichsten, strukturellen wie auch funktionalen Unterschiede

innerhalb des ER bestehen zwischen dem glatten, in der Regel tubulären ER („smooth“ ER) und dem Ribosomen-besetzten, rauem ER („rough“ ER), welches gestreckte, abgeflachtere Formen („sheets“) aufweist (Shibata *et al.*, 2006). Im rauem ER sind insbesondere Proteine vorzufinden, die an der Translokation oder Prozessierung neu synthetisierter Polypeptide beteiligt sind (Baumann und Walz, 2001; Shibata *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass sogar die alleinige Assoziation von Ribosomen mit der ER-Membran direkt für eine Bildung von „sheets“ verantwortlich ist (Puhka *et al.*, 2007). Das Verhältnis von rauem zu glattem ER hängt stark vom Zelltyp ab. Zellen die große Proteinmengen sezernieren besitzen dabei auch einen hohen Anteil an rauem ER (Amar-Costesec *et al.*, 1989; Kreibich *et al.*, 1978). Das ER ist darüber hinaus neben dem Zytosol und dem Nukleus mit nahezu allen anderen Zellorganellen assoziiert und bildet an entsprechenden Kontaktregionen funktional spezialisierte Domänen. Mitochondrien sind beispielsweise in der Lage aus dem ER freigesetztes Ca^{2+} aufzunehmen (Csordás *et al.*, 2006; Csordás *et al.*, 2010; Lebiezinska *et al.*, 2009). Neben dem Proteinimport können terminal fehlgefaltete Polypeptide über den Mechanismus der ER-assoziierten Protein-Degradation (ERAD) wieder über die ER-Membran ins Zytosol disloziert werden, wo sie letztendlich proteasomal degradiert werden (Meusser *et al.*, 2005; Sitia und Braakman, 2003; van Anken und Braakman, 2005).

IV.1.1. Proteintransport ins endoplasmatische Retikulum

Der Proteintransport über die ER-Membran oder die Integration in diese stellt einen unerlässlichen Schritt während der Biogenese der meisten Proteine dar, die entweder in den extrazellulären Raum sezerniert, in zelluläre Organellen (ER, ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment, Golgi-Apparat, Endo- bzw. Lysosomen oder Membranen des Nukleus und der Peroxisomen) importiert oder in die Plasmamembran integriert werden (Blobel und Dobberstein, 1975a, b; Palade, 1975; Zimmermann *et al.*, 2011). Generell erfordert dieser Vorgang ein charakteristisches, abspaltbares Signalpeptid am N-Terminus des Vorläuferproteins zur spezifischen Direktion an die ER-Membran sowie einen komplexen Translokationsapparat (Blobel und Dobberstein, 1975a, b; von Heijne, 1983; von Heijne, 1984). Integrale Membranproteine können ferner sogenannte Signalankersequenzen besitzen, welche nicht entfernt werden, sondern als spätere Transmembrandomänen (TMD) fungieren (High und Laird, 1997). Signalpeptide weisen keine einheitliche Konsensussequenz auf, sind jedoch evolutionär hoch konserviert, weswegen es sich bei dieser Diversität nicht um eine funktionelle Degeneration handelt, sondern vielmehr um eine Spezialisierung auf das reife Protein, um eine optimale Translokation zu gewährleisten (Kim *et al.*, 2002; von Heijne, 1985; Williams *et al.*, 2000). Dennoch sind Signalsequenzen hinsichtlich ihrer grundsätzlichen Funktion gegenüber einer Reihe von Punktmutationen unempfindlich und sogar zwischen evolutionär weit entfernten Organismen austauschbar (Gierasch, 1989; Talmadge *et al.*, 1980). Diese Redundanz rührt daher, dass alle Signalsequenzen trotzdem übereinstimmende Merkmale aufweisen. Hierzu zählen eine generelle

IV. Einleitung

Länge von 15-30 Aminosäuren (von Heijne, 1984; Zimmermann *et al.*, 2011) sowie eine Unterteilbarkeit in drei distinkte Domänen: Eine basische, N-terminale Region (n) sowie eine moderat polare, C-terminale Region (c), welche durch eine 7–13 Aminosäurereste lange hydrophobe Domäne (h) getrennt werden. Die Spaltstelle liegt generell an Position -1 relativ zu einem kleinen Aminosäurerest bzw. an Position -3 zu einem aliphatischen Aminosäurerest. Die Signalpeptidspaltung kann ferner durch die Länge der hydrophoben Domäne sowie Eigenschaften der N-terminalen Region beeinflusst werden (Perlman und Halvorson, 1983; von Heijne, 1983; von Heijne, 1985, 1986b). Signalpeptide können nach der Abspaltung weitere Funktionen besitzen und ähnlich einer TMD in die Lipiddoppelschicht integriert werden oder vollständig bzw. nach Intramembranproteolyse ins Zytosol freigesetzt werden, wo sie mit weiteren Proteinen interagieren (Kapp, 2009; Lemberg *et al.*, 2001; Lyko *et al.*, 1995; Martoglio und Dobberstein, 1998). Letzteres wurde auch für das gespaltene Signalpeptid des eukaryotischen Hormons Prolaktin beobachtet, welches mit dem Ca^{2+} -Sensorprotein Calmodulin interagieren kann (Babu *et al.*, 1985; Lyko *et al.*, 1995; Martoglio *et al.*, 1997). Der Importprozess kann in drei Phasen untergliedert werden: (1) Der initiale Schritt stellt die Übergabe und die spezifische Assoziation des Transportsubstrates mit der ER-Membran, in einer translokationskompetenten Konformation, dar („targeting“). (2) Anschließend erfolgt die Insertion des Vorläufers in die Membran („insertion“) und schließlich (3) der unidirektionale Transport sowie die Freisetzung des Polypeptides ins ER-Lumen bzw. die ER-Membran („completion“) (Corsi und Schekman, 1996; Walter *et al.*, 1984; Zimmermann *et al.*, 2006). Hierbei können zwei Modi unterschieden werden, der co- und der posttranslationale Transport. Der cotranslationale Transport ist abhängig vom sogenannten Signalerkennungspartikel („signal recognition particle“; SRP), welcher das naszierende Polypeptid am Ribosom bindet und den Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (RNC) an den Membran-ständigen SRP-Rezeptor (SR) rekrutiert, wo er letztlich an das Translokon transferiert wird (Bui und Strub, 1999; Conolly und Gilmore, 1989; Lakkaraju *et al.*, 2008). Der posttranslationale oder SRP-unabhängige Transport erfolgt nach vollständiger Synthese des Polypeptids im Zytosol und unter Mithilfe zytosolischer Hsc70-Chaperone (Zimmermann, 2009). Dabei dient die Bindung von SRP oder Chaperonen nicht nur dem „targeting“ zur ER-Membran, sondern auch der Abschirmung der hydrophoben, N-terminalen Domäne gegenüber Aggregation oder unspezifischen Interaktionen im Zytosol. Somit wird das Protein in einer ungefalteten und translokationskompetenten Form gehalten (High und Stirling, 1993; Zimmermann *et al.*, 2011; Zimmermann und Meyer, 1986). Welche Transportroute eingeschlagen wird, hängt letztlich sowohl von der Größe des Proteins als auch von der Hydrophobizität der Signalsequenz ab. Generell wird der cotranslationale Weg von großen Proteinen mit hydrophoberen Signalpeptiden bevorzugt (Hatsuzawa *et al.*, 1997; Lakkaraju *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 1996; Okun und Shields, 1992; Schlenstedt *et al.*, 1990). Der eigentliche Transport über die ER-Membran wird jedoch unabhängig vom Zielsteuerungsmechanismus durch eine Proteintranslokase mit dem heterotrimeren Sec61-Komplex als Kernkomponente bewerkstelligt (Hegde und Lingappa, 1999; Kim *et al.*, 2002). Die Effizienz des Importes wird ferner durch eine Reihe akzessorischer Proteine,

wie u.a. dem ER-luminalen BiP sowie dessen Co-Chaperone und Nukleotidaustauschfaktoren („nucleotide exchange factor“; NEF) beeinflusst (Dierks *et al.*, 1996; Lang *et al.*, 2012; Ngosuwana *et al.*, 2003; Schäuble *et al.*, 2012; Zimmermann, 1998). Nach dem Eintritt der Polypeptidkette ins ER-Lumen wird diese meist durch verschiedene Enzymkomplexe prozessiert bzw. modifiziert, was entweder nach abgeschlossener oder noch während der eigentlichen Translokation erfolgen kann. Der Signalpeptidasekomplex (SPC) spaltet die N-Terminale Signalsequenz des Vorläuferproteins ab (Jackson und Blobel, 1977; Paetzel *et al.*, 2002) während die Oligosacharyltransferase (OST) spezifische Asparaginreste glykosyliert (Chen *et al.*, 2001; Dempski und Imperiali, 2002). Solche posttranslationale Modifikationen sind zwar nicht essentiell für den Importprozess, allerdings von großer Bedeutung für die anschließende, korrekte Faltung und Assemblierung der Proteine durch ER-luminale Chaperone (Bies *et al.*, 1999; Bole *et al.*, 1986; Haas und Wabl, 1983; Weitzmann *et al.*, 2007). Zuletzt existiert auch eine besondere Klasse von Membranproteinen, deren Integration in die ER-Membran gänzlich Sec61-unabhängig erfolgen kann. Diese sogenannten „tail-anchored“-Membranproteine werden nach Exposition eines hydrophoben, C-terminalen Signalankers posttranslational in die Membran inseriert (Borgese und Fasana, 2011; Denic, 2012; Haßdenteufel *et al.*, 2011; Kutay *et al.*, 1993). Nachfolgend wird auf die beiden Transportmodi detaillierter eingegangen.

IV.1.1.1. Cotranslationaler Proteintransport ins ER (SRP-abhängig)

Der cotranslationale Proteintransport, der die bevorzugte Importroute in Säugetierzellen darstellt (Blobel und Dobberstein, 1975a; Zimmermann *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 1990), wird durch den SRP vermittelt, einem zytosolischen 11 S Ribonukleoproteinkomplex, bestehend aus sechs Polypeptiduntereinheiten (9, 14, 19, 54, 68 und 72 kDa) sowie einer 7 S rRNA (Walter und Blobel, 1980, 1983b). Dieses spezialisierte Chaperon interagiert mit der hydrophoben Kernregion von Signalsequenzen naszierender Polypeptidketten nach deren Exposition am Ribosom und dirigiert den RNC spezifisch zum SRP-Rezeptor (SR) an der ER-Membran (Egea *et al.*, 2005; Gilmore *et al.*, 1982a; Gilmore *et al.*, 1982b; Meyer und Dobberstein, 1980; Schwartz und Blobel, 2003; Shan und Walter, 2005). Neben der Abschirmung des hydrophoben Signalpeptids hält der SRP das entstehende Protein in einem translokationskompetenten Zustand, indem er mit der „M-site“ des Ribosoms (Membran-Bindungsstelle) interagiert und einen Translationsarrest bewirkt, der erst durch Bindung an den SR aufgehoben wird (Halic *et al.*, 2004; Halic und Beckmann, 2005; Lakkaraju *et al.*, 2008; Möller *et al.*, 1998a; Walter und Johnson, 1994). Der SRP weist dabei zwei funktionale Domänen auf, die Alu- und S-Domäne (Halic und Beckmann, 2005). Die S-Domäne (SRP68/72 und SRP19/54) interagiert über eine methioninreiche Bindungsfurche von SRP54 mit dem Signalpeptid (Janda *et al.*, 2010; Keenan *et al.*, 1998; Siegel und Walter, 1988; Zopf *et al.*, 1990) während die Alu-Domäne (SRP9/14) nach Bindung des SRP an das Ribosom zwischen der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit den Zugang für Aminoacyl-tRNAs und Elongationsfaktoren in die „A-site“ des

IV. Einleitung

Ribosoms blockiert und somit den Translationsarrest bewirkt (Gomez-Lorenzo *et al.*, 2000; Halic *et al.*, 2004; Lakkaraju *et al.*, 2008; Mary *et al.*, 2010; Terzi *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 1997). Sowohl die SR-Untereinheiten SR α (membranassoziiert) und SR β (Transmembranprotein) (Lauffer *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1995; Tajima *et al.*, 1986) als auch SRP54 besitzen eine GTPase-Aktivität (Freyman *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1998) und können dabei nur in GTP-gebundener Form miteinander interagieren (Miller *et al.*, 1995; Schwartz und Blobel, 2003). Die Interaktion des SR mit dem RNC-beladenen SRP führt zur Neuorientierung der S-Domäne von SRP, wodurch die in der Nähe des ribosomalen Tunnelausgangs befindlichen Proteine L23a und L35 der großen ribosomalen Untereinheit exponiert werden. Über diese Proteine sowie die 28 S rRNA erfolgt die Interaktion des Ribosoms mit dem Translokator (Halic *et al.*, 2006; Kalies *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 2001; Prinz *et al.*, 2000a). Durch die simultane GTP-Hydrolyse der drei GTPasen wird die Dissoziation des Komplexes und damit die vollständige Übergabe des RNC an die Translokase bewirkt (Connolly und Gilmore, 1993; Connolly *et al.*, 1991; Connolly und Gilmore, 1989; Legate *et al.*, 2000; Möller *et al.*, 1998b; Powers und Walter, 1995). Die Interaktion zwischen RNC und Translokator wird zusätzlich durch die Bindung der hydrophoben Signalsequenz des naszierenden Polypeptids stabilisiert, welches generell in einer schleifenförmigen Orientierung, mit dem N-Terminus zum Zytosol gerichtet, in die Translokationspore inseriert wird (Goder und Spiess, 2003; Hegde und Kang, 2008; McCormick *et al.*, 2003; Shao und Hegde, 2011b). Durch die Positionierung des Ribosoms auf dem Translokator wird so der reife Anteil der Polypeptidkette in die Translokationspore synthetisiert (Becker *et al.*, 2009; Beckmann *et al.*, 1997; Johnson und van Waes, 1999; Ménétret *et al.*, 2008). Da nach Termination der Synthese am Ribosom die treibende Kraft für den endgültigen Transport des Polypeptids (ca. 70 Å) ins ER aus dem Zytosol fehlt, wird angenommen, dass das molekulare Chaperon BiP im ER bereits während dem Import den exponierten Teil des Translokationsintermediates bindet und durch die beginnende Faltung für einen unidirektionalen Transport sorgt (Matlack *et al.*, 1999; Tyedmers *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2011). Wie gezeigt werden konnte, verbleibt die große 60 S Untereinheit von Ribosomen in einigen Fällen auch nach Termination der Proteinsynthese am Sec61-Komplex. Die Neusynthese von Proteinen kann daher auch an Ribosomen initiiert werden, die kontinuierlich an der ER-Membran gebunden vorliegen. Die Effizienz der eigentlichen Translokation wird neben BiP zudem durch eine Reihe weiterer akzessorischer Proteine (IV.1.3), wie beispielsweise TRAM, dem TRAP-Komplex oder Sec63 beeinflusst (Lang *et al.*, 2012; Ménétret *et al.*, 2008; Tyedmers *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2003; Voigt *et al.*, 1996). In Abbildung 1 ist eine schematische Darstellung des cotranslationalen Transportmodus gezeigt.

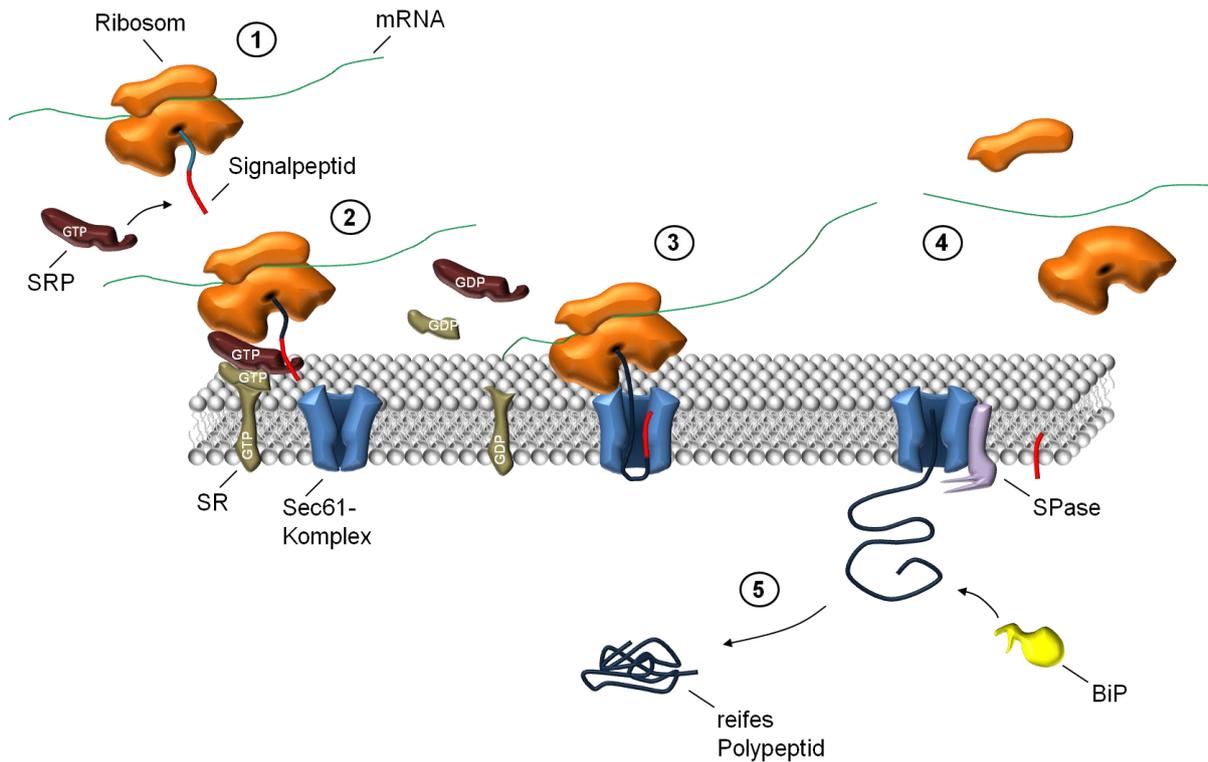


Abbildung 1: Schematische Darstellung des cotranslationalen (SRP-abhängigen) Proteintransportes ins endoplasmatische Retikulum eukaryotischer Zellen (Signalpeptide mit hoher Hydrophobizität). **1**) Nach Exposition der hydrophoben Signalsequenz des naszierenden Polypeptids am aktiven Ribosom interagiert der Signalerkennungspartikel (SRP) mit dieser sowie mit der M-„site“ (Interaktionsstelle mit dem ER-Membranrezeptor) des Ribosoms. **2**) Durch die Bildung des RNC-Komplexes erfolgt ein Elongationsarrest, der bis zur Interaktion mit dem SRP-Rezeptor (SR) an der ER-Membran besteht. Die Bindung an den Rezeptor erfordert den GTP-Zustand aller drei GTPase-Untereinheiten von SRP, SR α und SR β . **3**) Der RNC wird anschließend auf den Sec61-Komplex, die zentrale Komponente der Proteintranslokase in der ER-Membran, übertragen. Durch die konzertierte GTP-Hydrolyse von SRP- und SRP-Rezeptor-Untereinheiten dissoziiert der SRP/SR-Komplex und kann in einen neuen „targeting“-Zyklus eintreten. Das Signalpeptid bindet in einer schlaufenförmigen Orientierung im Bereich der Pore des Sec61-Komplexes und das Polypeptid wird durch die fortgesetzte Translation direkt ins ER-Lumen synthetisiert **4**) Das Signalpeptid wird durch die Aktivität der Signalpeptidase abgespalten **5**) Das Polypeptid wird unter Mithilfe des ER-luminalen molekularen Hsp70-Chaperons BiP vollständig importiert und in die korrekt gefaltete, reife Konformation überführt. Zur besseren Übersicht wurden weitere akzessorische Faktoren des SRP-abhängigen ER-Imports (IV.1.3) nicht dargestellt.

IV.1.1.2. Posttranslationaler Proteintransport ins ER (SRP-unabhängig)

Beim posttranslationalen Transport werden die Vorläuferproteine vollständig im Zytosol synthetisiert und durch zytosolische Hsp70-Chaperone (Hsc70/Ssa1) sowie deren Hsp40-Cochaperone (Hdj2/Ydj1 und Hsp40) gebunden und zur ER-Membran geleitet. Durch die Interaktionen mit hydrophoben Regionen des Polypeptids wird überdies eine Aggregation verhindert und eine translokationskompetente Konformation erhalten (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Ngosuwan *et al.*, 2003; Waters und Blobel, 1986; Wiech *et al.*, 1987; Zimmermann, 2009; Zimmermann *et al.*, 1988). Die Signalsequenzen SRP-unabhängiger Transportsubstrate weisen generell eine geringere Hydrophobizität auf, wodurch vermutlich die Affinität zum SRP erniedrigt ist. Zudem liegt die Größe der Vorläufer generell unter 75 Aminosäureresten und damit unterhalb der Grenze, bei der das Signal-

IV. Einleitung

peptid noch während der Proteinsynthese vollständig aus dem ribosomalen Tunnelausgang (Länge $\hat{=}$ ca. 60 AS) ragt, bevor der C-Terminus des Proteins vom Peptidyltransferasezentrum freigesetzt wird (Ng *et al.*, 1996; Voss *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2011). In der Hefe, in welcher der posttranslationale Transport eine größere Rolle spielt (Zimmermann und Blatch, 2009) wurde bereits früh gezeigt, dass sowohl ATP als auch das ER-luminale, molekulare Chaperon Kar2 ($\hat{=}$ BiP) für initiale Schritte sowie die Termination der Proteintranslokation ins ER benötigt werden (Brodsky *et al.*, 1995; Lyman und Schekman, 1995, 1997; Rapoport *et al.*, 1999). Eine derartige Funktion ist plausibel, da Chaperone der Hsp70-Familie hydrophobe Bereiche von ungefalteten Polypeptiden, wie sie auch Signalpeptide aufweisen, binden können (Flynn *et al.*, 1991; Martoglio und Dobberstein, 1998; Mayer *et al.*, 2000). BiP (Kar2) kann demnach über die J-Domäne des Membran-ständigen, Translokation-assoziierten Hsp40-Cochaperons Sec63 zum Sec61-Komplex rekrutiert werden und interagiert mit Translokationsintermediaten, um deren passive Rückbewegung ins Zytosol zu verhindern (Corsi und Schekman, 1997; Matlack *et al.*, 1999; Tyedmers *et al.*, 2000). Der SRP-unabhängige Transport erfordert in Hefen generell die Mitwirkung des tetrameren Sec62/Sec63-Komplexes, bestehend aus den Membranproteinen Sec62, Sec63, Sec71 (Sec66) sowie Sec72, welcher vermutlich in Form eines Signalsequenzrezeptors fungiert, wobei die Proteine Sec62 und Sec63 essentielle Untereinheiten darstellen (Deshaies *et al.*, 1991; Deshaies und Schekman, 1989; Feldheim und Schekman, 1994; Müsch *et al.*, 1992; Panzner *et al.*, 1995; Rothblatt *et al.*, 1989). Zusammen mit dem Sec61-Komplex wird der Sec62/Sec63-Komplex auch als SEC-Komplex bezeichnet (Dünnwald *et al.*, 1999; Plath *et al.*, 2004). In Säugetierzellen interagieren Sec62 und Sec63 ebenfalls miteinander und liegen im Komplex mit Sec61 vor (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Obwohl für Sec62 auch in Säugetieren bislang nur ein Einfluss auf den posttranslationalen ER-Import zeigt wurde, weist es gegenüber dem Hefe-Homolog die zusätzliche Fähigkeit auf Ribosomen in der Nähe des Tunnelausgangs zu binden (Lang *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2010). Sec62 und Sec63 scheinen überdies in höheren Eukaryoten nicht essentiell zu sein (Fedele *et al.*, 2011; Greiner *et al.*, 2011a; Lang *et al.*, 2012). Neben der Dominanz des cotranslationalen Imports in höheren Eukaryoten verfügen Säugetierzellen über ein weiteres Hsp40-Cochaperon, ERj1, welches ähnlich wie der Sec62/Sec63-Komplex eine ER-luminale J-Domäne sowie eine zytosolische Ribosomenbindungsstelle besitzt, womit BiP zu translatierenden Ribosomen dirigiert werden kann (Benedix *et al.*, 2010; Blau *et al.*, 2005; Dudek *et al.*, 2005; Dudek *et al.*, 2002). Da die Expression von *ERJ1* in Hefen den Verlust von *SEC63* kompensieren kann, sind beide Proteine in Säugetierzellen offensichtlich redundant (Kroczyńska *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2010). Neben dem ursprünglich entdeckten „targeting“-Mechanismus über das zytosolische Hsc70-Chaperon wurde in Säugetierzellen derweil die Beteiligung zweier weiterer Proteine charakterisiert. Dabei handelt es sich um die zytosolische ATPase TRC40, welche auch am „targeting“ von „tail-anchored“-Membranproteinen beteiligt ist (Favaloro *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012) sowie das Ca²⁺-Sensorprotein Calmodulin, welches die Signalsequenz kleiner Vorläuferproteine wie ppcecA zu binden vermag (unter physiologischen Ca²⁺-Konzentrationen) und

IV. Einleitung

das Polypeptid translokationskompetent hält. (Shao und Hegde, 2011c). Ein schematischer Überblick zum posttranslationalen ER-Import in Säugetierzellen ist in Abbildung 2 dargestellt.

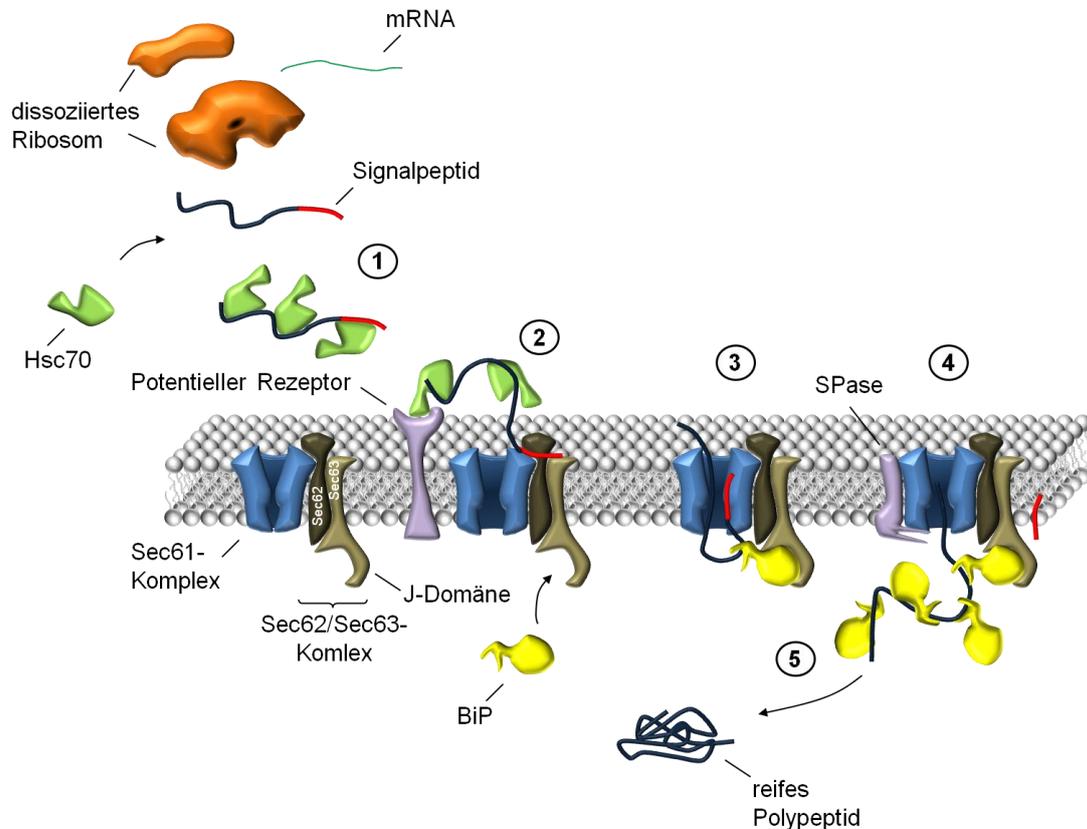


Abbildung 2: Schematische Darstellung des posttranslationalen (SRP-unabhängigen) Proteintportes ins endoplasmatische Retikulum von Säugetierzellen. Dieser Transportmodus betrifft insbesondere Substrate unterhalb einer Größe von ca. 75 Aminosäuren und mit Signalpeptiden mit relativ geringer Hydrophobizität **1)** Nachdem das Protein vollständig im Zytosol synthetisiert wurde interagieren zytosolische molekulare Chaperone (Hsc70; auch TRC40 und Calmodulin) mit der Signalsequenz und weiteren hydrophoben Regionen des Polypeptids und verhindern eine Aggregation **2)** Der Hsc70-Substrat-Komplex wird zur ER-Membran rekrutiert wo die Bindung von Hsc70 an einen bislang noch unbekanntem Rezeptor erfolgt (eventuell die J-Domäne von DnaJB12). Das Signalpeptid interagiert mit dem Sec62/Sec63-Komplex sowie dem Sec61-Komplex (beide zusammen auch als SEC-Komplex bezeichnet). **3)** Nach der Insertion des Polypeptides in die Pore des Sec61-Komplexes in schleifenförmiger Orientierung werden die Hsc70-Chaperone wieder freigesetzt und das Protein auf der ER-luminalen durch das molekulare Hsp70-Chaperon BiP gebunden, welches über die J-Domäne des Sec62/Sec63-Komplexes zum Sec61-Komplex rekrutiert wird. **4)** Durch Bindung von BiP an das Polypeptid wird das Zurückgleiten der ins Zytosol verhindert. Die SPase spaltet das Signalpeptid nach dessen Exposition im ER-Lumen ab **5)** Nach ausreichender Inwärtsbewegung der Polypeptidkette binden sukzessive weitere BiP-Moleküle bis der Import abgeschlossen ist. Danach wird das Protein korrekt gefaltet freigesetzt.

IV.1.1.3. Zielsteuerung und Insertion von „tail-anchored“-Membranproteinen

Die sogenannten „tail-anchored“ Membranproteine (TA-MP) repräsentieren eine Klasse von Proteinen, die anstelle der üblichen N-terminalen Signalsequenz eine C-terminal lokalisierte, hydrophobe Signalankerregion aufweist, über welche die Integration in die ER-Membran erfolgt (Borgese und Fasana, 2011; Kutay *et al.*, 1995; Kutay *et al.*, 1993). Der bedeutend größere N-Terminus dieser Proteine befindet sich im Zytosol und beherbergt die funktionale Domäne des Proteins, während der polare C-Terminus im ER-Lumen maximal 30 Aminosäurereste aufweist

(Borgese, 2009; Borgese *et al.*, 2003b). Diese evolutionär hochkonservierte Gruppe von Transmembranproteinen ist an einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse, wie dem vesikulären Transport, dem Proteintransport und der Apoptose beteiligt (Beilharz *et al.*, 2003; Borgese und Righi, 2010; Kalbfleisch *et al.*, 2007). Basierend auf bioinformatischen Daten kodiert ca. 1-2 % des humanen Genoms potentielle TA-MP (Kalbfleisch *et al.*, 2007). Aufgrund der strukturellen Eigenheit weisen sie einen obligat posttranslationalen Transportmodus auf, da die TMD erst nach der Termination der Translation aus dem Ribosom austritt, und unterscheiden sich somit klar von Transmembranproteinen mit N-terminaler Signalsequenz, welche stets cotranslational integriert werden (Shan und Walter, 2005). Als weiteres Charakteristikum werden TA-MP unabhängig vom Sec61-Komplex in die ER-Membran inseriert (Borgese und Fasana, 2011; Hegde und Keenan, 2011; Kutay *et al.*, 1995; Lang, 2012). Es wird angenommen, auch wenn die Rekrutierung zur ER-Membran diverse Chaperone erfordert, dass die eigentliche Integration von TA-MP in die ER-Membran spontan erfolgt (Brambillasca *et al.*, 2006). Die Spezifität für die Integration in die ER-Membran ist vermutlich durch deren niedrigen Cholesterolgehalt gegenüber den restlichen zellulären Lipiddoppelschichten gegeben (Borgese und Fasana, 2011; Brambillasca *et al.*, 2005). Eine grundlegende Eigenschaft, die TA-MP mit typischen Vorläuferproteinen teilen, ist der Besitz einer hydrophoben Polypeptidregion für das „targeting“ zur Zielmembran, welche auch einer Abschirmung gegenüber Aggregation und unspezifischen Interaktionen bedarf. Bislang wurden drei verschiedene Zielsteuerungsmechanismen beschrieben. Zum einen existiert der ursprünglich in Hefe beschriebene Weg über die ATPase TRC40 (Asna1; Get3 in Hefe) (Favaloro *et al.*, 2010; Stefanovic und Hegde, 2007), welche zusammen mit dem vorgeschalteten BAG6-Komplex, einem Sortierkomplex, (Mariappan *et al.*, 2010) sowie dem Protein SGTA (\triangleq Sgt2) agiert (Winnefeld *et al.*, 2006). Als ER-Membran-ständiger Rezeptor für TRC40 wurde das tryptophanreiche, basische Protein WRB (CHD5) identifiziert. Es wird angenommen, dass WRB die ATPase-Aktivität von TRC40 stimuliert und damit die Substratfreisetzung in unmittelbarer Nähe der ER-Membran bewirkt (Vilardi *et al.*, 2011). Als weitere Zielsteuerungsmechanismen für TA-MP wurden ferner auch klassische Faktoren wie SRP (allerdings posttranslational) sowie zytosolische Hsc70-Chaperone beschrieben (Abell *et al.*, 2004; Abell *et al.*, 2007).

IV.1.2. Die Proteintranslokase des endoplasmatischen Retikulums

Unabhängig vom Zielsteuerungsmodus (co- oder posttranslational) erfolgt der ER-Import von Vorläuferproteinen mit N-terminalem Signalpeptid oder deren Insertion in die ER-Membran mit Hilfe der Proteintranslokase des ER (du Plessis *et al.*, 2011; Park und Rapoport, 2012; Zimmermann *et al.*, 2011). Dieser Multiproteinkomplex weist als zentrale Komponente den heterotrimeren Sec61-Komplex auf, welcher in Säugetieren aus den Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ besteht (Görlich *et al.*, 1992; Görlich und Rapoport, 1993). Insbesondere die α - und γ -Untereinheit weisen

IV. Einleitung

einen hohen evolutionären Konservierungsgrad auf (Deshaies und Schekman, 1987; Hartmann *et al.*, 1994) und sind im Gegensatz zu Sec61 β essentiell für das Überleben der Zelle (du Plessis *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 1994; Matlack *et al.*, 1998; Nishiyama *et al.*, 1994; Park und Rapoport, 2012). Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Innere der Pore ein wässriges, für Ionen und kleine Moleküle passierbares Milieu aufweist (Crowley *et al.*, 1994; Crowley *et al.*, 1993; Simon und Blobel, 1991). Basierend auf röntgenkristallographischen Daten (Auflösung: 3,2 Å) des Sec61YE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Archaea) wurden entscheidende strukturelle Informationen gewonnen (Van den Berg *et al.*, 2004), welche aufgrund der Sequenzhomologie (ca. 50 %) und dem Vergleich mit elektronenmikroskopischen Strukturen auch auf eukaryotische Systeme übertragbar sind (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008). Sec61 α (53 kDa) repräsentiert mit 10 TMD (beide Termini im Zytosol lokalisiert) die porenbildende Untereinheit des Sec61-Kanals und damit die zentrale Komponente für die Passage von Polypeptiden über die ER-Membran (High *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994). Sec61 β (11 kDa) und Sec61 γ (8 kDa) besitzen beide lediglich eine einzige Membran-durchspannende Region und gehören zur Klasse der genannten „tail-anchored“-Membranproteine (Abell *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2012). Aus zytosolischer Perspektive kann Sec61 α in zwei Domänen untergliedert werden, welche aus TMD 1-5 sowie TMD 6-10 bestehen und über die ER-luminale Schleife 5, vergleichbar mit einem Scharnier, miteinander verbunden sind (Van den Berg *et al.*, 2004). Dadurch ist die Struktur flexibel und dynamisch und kann sich auf der gegenüberliegenden Seite zur Membran hin öffnen. Dieser Bereich wird auch als „lateral gate“ (Laterales Tor) bezeichnet (Martoglio *et al.*, 1995). Sec61 γ bindet auf der Rückseite und verknüpft beide Hälften der α -Untereinheit mit einer diagonal angeordneten Membrandomäne (Zimmermann *et al.*, 2011). Somit wird der Komplex, ähnlich einer Klammer, stabilisiert (Abbildung 3, A). Sec61 β geht weniger Kontakte mit Sec61 α ein, was auch mit der Tatsache konform geht, dass Sec61 β weder essentiell noch evolutionär so stark konserviert ist wie die beiden anderen Untereinheiten (Park und Rapoport, 2012). Aus seitlicher Sicht betrachtet weist der Kanal eine Verengung auf, die als „pore ring“ (Porenring) bezeichnet wird und aus sechs Aminosäureresten mit großen, hydrophoben Seitenketten besteht (sechs Isoleucine in *E. coli*). Unterhalb dieser Konstriktion befindet sich eine kurze Polypeptidhelix, der sogenannte „plug“ (Stopfen), welcher durch die TMD 2a gebildet wird (Van den Berg *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2011) und dem Verschluss der Pore dient (Abbildung 3, B). Die Öffnung des Kanals wird vermutlich zuerst durch die Bindung des Ribosoms (SRP-abhängig) oder des Sec62/Sec63-Komplexes (SRP-abhängig) partiell induziert („priming“), wobei auch die „plug“-Domäne teilweise verlagert wird (in Bakterien durch SecA vermittelt) (Gumbart *et al.*, 2009; Wilkinson und Stirling, 2009; Zimmer *et al.*, 2008). Anhand von Quervernetzungsexperimenten wurde gezeigt, dass die hydrophobe Signalsequenz zwischen TMD 2b und 7 interkaliert und auch Interaktionen mit Phospholipiden eingeht. Der restliche Teil des naszierenden Polypeptids wird schlaufenförmig in die Translokationspore inseriert (Gumbart und Schulten, 2007; Hizlan *et al.*, 2012).

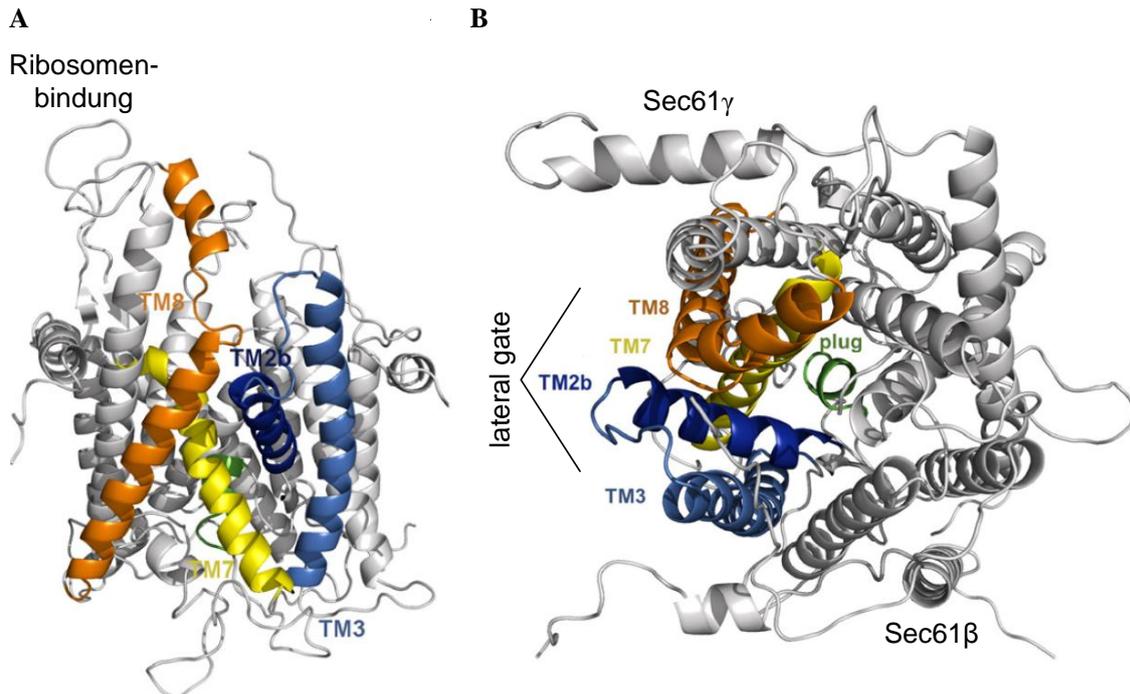


Abbildung 3: Homologiemodell des humanen Sec61-Komplexes (aus Sec61 α , - β und - γ) basierend auf der Kristallstruktur des Sec61YE β -Komplexes aus *Methanococcus jannaschii* (Zimmermann *et al.*, 2011). **A)** Seitenansicht **B)** Ansicht von zytosolischer Seite. Die Transmembran- α -Helices (TMD) TM2b, TM3, TM7 und TM8 bilden den vorderen Bereich des „lateral gates“. Der „plug“ ist in grün dargestellt und liegt unterhalb der Verengung im Zentrum des Kanals, dem sogenannten „pore ring“ (gebildet aus sechs hydrophoben Aminosäuren).

Durch die Bindung des Signalpeptides werden die TMDs des „lateral gates“ getrennt und der „plug“ weiter vom „pore ring“ wegbewegt, wodurch der Kanal für die Passage geöffnet wird. Die Insertion des vollständigen Polypeptids hält diesen offenen Zustand vermutlich stabil (Gouridis *et al.*, 2009; Park und Rapoport, 2012). Durch diese Konstellation können Proteinvorläufer sowohl ins ER-Lumen als auch, im Fall von Transmembranproteinen, seitlich in die Doppellipidschicht entlassen werden (Breyton *et al.*, 2002; Van den Berg *et al.*, 2004). Basierend auf Kristallstrukturen und 3D-Rekonstruktionen nach Kryoelektronentomographie wird davon ausgegangen, dass die Translokationspore durch einen einzelnen Sec61-Komplex gebildet wird. Im Fall des cotranslationalen Transportes ist daher ein einzelnes Ribosom derart über der Translokationspore angeordnet, dass diese mit dem ribosomalen Tunnelausgang eine Linie bildet und ein naszierendes Polypeptid direkt in den Kanal hineintransportiert wird (Becker *et al.*, 2009; Beckmann *et al.*, 1997). Eine vergleichbare Anordnung kann auch bei nicht-translatierenden Ribosomen beobachtet werden (Ménétrete *et al.*, 2008; Ménétrete *et al.*, 2007). Sowohl die strukturellen als auch biochemische Daten zeigen, dass auf ribosomaler Seite die Proteine L23a und L35 als Kontaktstellen zum Sec61-Komplex fungieren (Becker *et al.*, 2009). Als Interaktionsbereiche des Sec61-Komplexes zum Ribosom wurden die zytosolischen Schleifenregionen 6 und 8 von Sec61 α (gebildet durch TMD6/7 und TMD 8/9) identifiziert (Kalies *et al.*, 1994; Raden *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000). Die Translokationspore ist zwar aufgrund der gegebenen Voraussetzungen äußerst flexibel und kann sich dynamisch an das jeweilige Substrat anpassen, was

auch bioinformatisch sowie elektrophysiologisch gezeigt wurde, jedoch ist der Durchmesser des „pore rings“ basierend auf den Strukturdaten relativ eng. Bei einem theoretischen Porendurchmesser von maximal 15-20 Å (Gumbart und Schulten, 2006) kann eine Polypeptidkette folglich nur im entfalteten Zustand hindurchtreten und allenfalls α -helikale Strukturen (ca. 12 Å) annehmen (Bonardi *et al.*, 2011; Kowarik *et al.*, 2002). Andererseits deuten Untersuchungen zur Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes auf eine dynamische Weite zwischen 6 und 60 Å hin (Hamman *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 2003), ein Durchmesser der jedoch oberhalb des eigentlichen Gesamtdurchmessers des Kanals (40 Å) liegt (Zimmermann *et al.*, 2011). FRET-Analysen („fluorescence resonance energy transfer“) lassen jedoch auch auf eine Oligomerisierung von Sec61-Komplexen schließen (Snapp *et al.*, 2004), was den hohen Durchmesser erklären würde. Unabhängig davon wurde jedoch bereits mehrfach gezeigt, dass der Sec61-Komplex generell einen für Ionen und kleine Moleküle permeablen, durch Signalpeptide aktivierbaren Kanal darstellt (Heritage und Wonderlin, 2001; Roy und Wonderlin, 2003; Saparov *et al.*, 2007; Simon und Blobel, 1991; Wirth *et al.*, 2003). Während zunächst davon ausgegangen wurde, dass die alleinige Assoziation des Ribosoms ausreicht, um die Translokationspore zu verschließen (Crowley *et al.*, 1994) zeigen neuere Strukturdaten, dass sich zwischen Ribosom und Sec61-Komplex eine ausreichend große Lücke in der Nähe des ribosomalen Tunnelausgangs befindet, um einen Ionenfluss zu erlauben (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008). Entsprechend dieser Vermutung ist der Sec61-Komplex auch auf zellulärer Ebene, nach Freisetzung der Polypeptidkette mit dem Proteinsyntheseinhibitor Puromycin, unabhängig von einer Ribosomenbindung, transient permeabel für Ca^{2+} (Amer *et al.*, 2009; Flourakis *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der Öffnungszustand des Kanals durch eine Reihe weiterer Faktoren moduliert werden kann. So übernimmt das ER-luminale Chaperon BiP nicht nur Aufgaben beim co- und posttranslationalen Import von Polypeptiden ins ER (Dierks *et al.*, 1996; Matlack *et al.*, 1999; Nicchitta und Blobel, 1993; Tyedmers *et al.*, 2003), sondern vermag auch die Ionenpermeabilität des Translokons *in vitro* zu reduzieren (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003). Das Translokon besteht somit aus dem heterotrimeren Sec61-Komplex sowie einer Reihe akzessorischer Proteine, die je nach Bedarf rekrutiert werden können. Im Folgenden wird auf einige wichtige Modulatoren eingegangen.

IV.1.3. Akzessorische Proteine der ER-Translokase

IV.1.3.1. Sec62

Das Sec62-Protein ist sowohl in Hefe als auch in Säugetieren Bestandteil des SEC-Komplexes, welcher am posttranslationalen Proteinimport ins ER beteiligt ist (Deshaies und Schekman, 1989; Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012; Plath *et al.*, 2004; Rapoport *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 2000). Anhand von Co-Immunoprecipitationsstudien mit rauen Mikrosomen befindet sich Sec62 im Komplex

mit Sec61 α , Sec61 β sowie dem Membran-ständigen Hsp40-Cochaperon Sec63 und liegt mit 2 μ M in einer Suspension von Pankreasmikrosomen in einer äquimolaren Konzentration zu Sec61 α vor (Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000; Zimmermann, 2009). Aktuelle Studien postulieren eine Proteinkinase CK2-abhängige Phosphorylierung, welche die Interaktion von Sec63 mit Sec62 stimuliert (Ampofo *et al.*, 2013). Sec62 (46 kDa) weist zwei Membran-durchspannende Domänen und eine ER-luminale Schleifenregion ohne ER-Retentionsmotiv auf (Dudek *et al.*, 2009). Beide Termini sind zytosolisch lokalisiert und vermutlich bei der Erkennung von hydrophoben Signalpeptiden beteiligt (Dünnwald *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1996). Das Säugetierortholog besitzt gegenüber der Hefevariante zusätzlich die Eigenschaft über eine N-terminale, basische Region hochaffin mit Ribosomen zu interagieren, was zumindest *in vitro* die Translationsinitiation zu inhibieren vermag (Müller *et al.*, 2010). In Hefen ist *SEC62* essentiell (Deshaies und Schekman, 1989), dieser Phänotyp kann allerdings durch heterologe Expression der cDNA des ebenfalls Ribosomen-bindenden, säugerspezifischen Hsp40-Cochaperons ERj1 gerettet werden, was auch die Tatsache erklärt, warum eine Depletion des Proteins in Säugetieren nicht letal zu sein scheint (Benedix *et al.*, 2010; Dudek *et al.*, 2005; Greiner *et al.*, 2011a; Müller *et al.*, 2010). Basierend auf vergleichenden Sequenzanalysen besitzt Sec62 Homologien zu diversen Kationenkanälen (Dudek *et al.*, 2009) sowie zwei zytosolisch lokalisierte EF-Handmotive zur Bindung von Ca²⁺ (Greiner *et al.*, 2011b; Stefan Schorr, persönliche Mitteilung). Neueste Untersuchungen sprechen für eine Rolle von Sec62 bei der Onkogenese von Lungenkarzinomen und anderen malignen Karzinomen. In diesen Zellen wurde eine signifikante Erhöhung des Sec62-Proteinlevels und eine damit verbundene Steigerung der Migrationsfähigkeit festgestellt. Zudem zeigen Sec62-depletierte Tumorzellen eine Sensibilisierung gegenüber Thapsigargin-vermitteltem ER-Stress sowie einen gesteigerten Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER (Greiner *et al.*, 2011a; Greiner *et al.*, 2011b; Jung *et al.*, 2006; Linxweiler *et al.*, 2012).

IV.1.3.2. Posttranslational modifizierende Enzyme des ER

Nach dem Eintritt einer Polypeptidkette ins ER-Lumen durchläuft diese meist eine Reihe enzymatisch katalysierter Prozesse, die mit einer Sequenzabspaltung oder einer kovalenten Verknüpfung diverser Moleküle einhergehen. Diese Modifikationen sind die Voraussetzung für eine korrekte Faltung und Assemblierung neu synthetisierter Proteine im ER (Zapun *et al.*, 1999). Der ER-Membran-residente Signalpeptidasekomplex (SPC), dessen aktives Zentrum luminal lokalisiert ist, dient der Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids. Im Fall des cotranslationalen Transportes erfolgt dieser Vorgang noch während des ER-Importes (Blobel und Dobberstein, 1975a; Jackson und Blobel, 1977). In Säugetierzellen setzt sich der Komplex aus den Untereinheiten SPC12, -18, -21, -22/23 sowie -25 zusammen (Evans *et al.*, 1986; Shelness *et al.*, 1988). SPC12 und -18 repräsentieren dabei vermutlich die Peptidase-aktiven Untereinheiten (Dalbey *et al.*, 1997; Dalbey und von Heijne, 1992). Basierend auf Quervernetzungsexperimenten bindet der Komplex in Anwesenheit von Ribosomen über SPC25

an Sec61 β (Kalies *et al.*, 1998). Ein ebenso cotranslational möglicher Vorgang ist die Kopplung von Oligosacchariden an die γ -Aminogruppe definierter Asparaginseitenketten von Proteinen, die sich innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr (X = beliebige AS außer Prolin oder Aspartat) befinden (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Katalysiert wird diese Reaktion von der Oligosaccharyltransferase (OST), einem heptameren Transmembranproteinkomplex, der sich ebenfalls ER-luminal lokalisiert, in unmittelbarer Nähe Ribosomen-gebundener Sec61-Komplexe befindet (Burda und Aebi, 1999; Dempski und Imperiali, 2002; Kelleher und Gilmore, 2006; Pfeffer *et al.*, 2012; Zimmermann, 2009). Weitere nennenswerte modifizierende Enzymkomplexe sind das Presenilin-artige Enzym Signalpeptidpeptidase, welches die hydrophobe Domäne von abgespaltenen Signalpeptiden innerhalb der Lipiddoppelschicht der ER-Membran spaltet (Lemberg *et al.*, 2001; Lemberg und Martoglio, 2002; Weihofen *et al.*, 2002) sowie die Glykosylphosphatidyl-Transamidase, welche bestimmte Proteine mit einem GPI-Anker für die Assoziation an der ER-Membran versieht (Kamariah *et al.*, 2011; Ohishi *et al.*, 2003; Vidugiriene und Menon, 1995).

IV.1.3.3. Molekulare Chaperone des ER

Das ER besitzt neben posttranslational modifizierenden Enzymen eine Reihe verschiedener Faltungskatalysatoren, um eine korrekte Konformation und Assemblierung neu synthetisierter Proteine zu gewährleisten. Die Information für den nativen Faltungszustand von Polypeptiden steckt zwar in deren Primärstruktur, um diese jedoch effizient zu erreichen bedarf es der Hilfe molekularer Chaperone (Chevet *et al.*, 2001). Im ER-Lumen herrschen durch das oxidative Milieu sowie die hohe Konzentration an Chaperonen optimierte Bedingungen für die Proteinfaltung. Einige der Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle neu synthetisierter Proteine, da diese nur in korrekt gefalteter Form zu ihrem Destinationsort gelangen. Vertreter dieser Kontrollmaschinerie sind sowohl BiP (IV.1.3.3.1) als auch Calnexin und Calretikulin (IV.1.3.3.7). Irreversibel fehlgefaltete Proteine, welche die Kontrolle nicht bestehen, werden über das ERAD-System (ER-assoziierte Degradation) ins Zytosol disloziert und proteasomal degradiert (Ellgard *et al.*, 1999; Hoseki *et al.*, 2009; Kleizen und Braakman, 2004; Sitia und Braakman, 2003; van Anken und Braakman, 2005). Neben den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) stellen Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs), Lektin-Chaperone sowie klassische Hitzeschockproteine (Hsp) die bekannten ER-Chaperonklassen dar (Ellgaard und Ruddock, 2005; Rutkevich und Williams, 2010; Schrag *et al.*, 2003; Young, 2010; Zapun *et al.*, 1999).

IV.1.3.3.1. Das Hsp70-Chaperon BiP (Grp78)

Das ER-luminale, molekulare Chaperon BiP („immunoglobulin heavy chain binding protein“) oder auch Grp78 (Glukose-reguliertes Protein, 78 kDa) ist ein Mitglied der evolutionär hochkonservierten Hsp70-Familie (70 kDa „heat shock protein“). Entsprechend der Bezeichnung wurde es erstmals in

IV. Einleitung

Assoziation mit schweren Antikörperketten gefunden (Haas, 1994; Haas und Wabl, 1983; Hendershot und Kearney, 1988; Knittler und Haas, 1992) und wird ferner infolge von ER-Stress oder Glukose-Deprivation im Rahmen der UPR („unfolded protein response“) verstärkt synthetisiert (Gething und Sambrook, 1992; Hartl und Hayer-Hartl, 2009; Hendrick und Hartl, 1993; Munro und Pelham, 1986). Mit einer Konzentration von 5 μM in Suspensionen von rauen Mikrosomen ist BiP eines der abundantesten ER-luminalen Proteine (Mayer und Bukau, 1998; Weitzmann *et al.*, 2007). Wie alle Hsp70-Chaperone bindet es transient an hydrophobe Regionen neu synthetisierter oder fehlgefalteter Proteine, wodurch eine Aggregation oder unspezifische Bindungen verhindert und die Faltung bzw. Assemblierung in eine native Konformation unterstützt wird (Blond-Elguindi *et al.*, 1993; Blount und Merlie, 1991; Bukau *et al.*, 2000; Ellis, 1997; Flynn *et al.*, 1991). Generell besitzen Hsp70-Chaperone eine 44 kDa große N-terminale Nukleotidbindedomäne (NBD), eine 15 kDa große Substratbindedomäne (SBD) sowie eine variable C-terminale Region (10 kDa), welche die Substratspezifität bestimmt. Letztere weist einen flexiblen, α -helikalen Deckel auf, der die Peptidbindetasche der SBD verschließen kann (Abbildung 4). Zudem trägt diese ein KDEL-Motiv für die ER-Retention (Boorstein *et al.*, 1993; Bukau und Horwich, 1998; Flaherty *et al.*, 1990; Szyperski *et al.*, 1994). Die Bindung von Substraten wird allosterisch durch den zyklischen Austausch und die Hydrolyse von ATP in der NBD gesteuert, wodurch die Öffnung bzw. das Schließen des Deckels und die Affinität für Peptide reguliert wird. (McKay *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996). Die ATP-gebundene Form stellt dabei die niedrigaffine Konformation dar, bei der Substrate innerhalb kurzer Zeit häufig gebunden und freigesetzt werden. Die Bindung von ADP bewirkt eine Konversion in den hochaffinen Zustand, in welchem eine stabile Substratassoziation erfolgt (Jiang *et al.*, 2005). Hsp70-Chaperone besitzen selbst eine sehr geringe intrinsische ATPase-Aktivität. Diese kann jedoch durch Interaktion der NBD mit einem Hsp40-Cochaperon über dessen konservierte J-Domäne stimuliert werden (ca. 70 AS) (Jiang *et al.*, 2007; Szabo *et al.*, 1994). Hsp40-Cochaperone tragen dabei auch zur Substratspezifität bei (Marcinowski *et al.*, 2011). Der Austausch von ADP zu ATP erfolgt durch sogenannte Nukleotidaustauschfaktoren (NEF), wodurch wiederum die Substratfreisetzung begünstigt wird (Chung *et al.*, 2002; Weitzmann *et al.*, 2006). Die Strukturdaten zeigen dabei, dass der Bereich der direkten Peptidbindung lediglich durch fünf Aminosäurereste repräsentiert wird, wovon die mittleren drei Aminosäuren hydrophobe Seitenketten aufweisen (Rüdiger *et al.*, 1997). BiP wurde bereits in mehreren Studien als eine wichtige Komponente beim Proteintransport ins ER beschrieben (Klappa *et al.*, 1991; Nicchitta und Blobel, 1993). Während das Chaperon im posttranslationalen Transportmodus in Form einer molekularen Ratsche fungiert und das Polypeptid durch sukzessive Assoziation mehrerer BiP-Proteine ins ER-Lumen befördert (Liebermeister *et al.*, 2001; Matlack *et al.*, 1999), spielt diese Funktion beim cotranslationalen Transport vermutlich eine eher untergeordnete Rolle, da das naszierende Polypeptid, bis auf die restlichen 70 Aminosäuren, durch die Synthese am Ribosom aktiv in die Translokationspore hineingeschoben wird, wodurch ein gerichteter Import gewährleistet wird (Beckmann *et al.*, 1997; Ooi und Weiss, 1992).

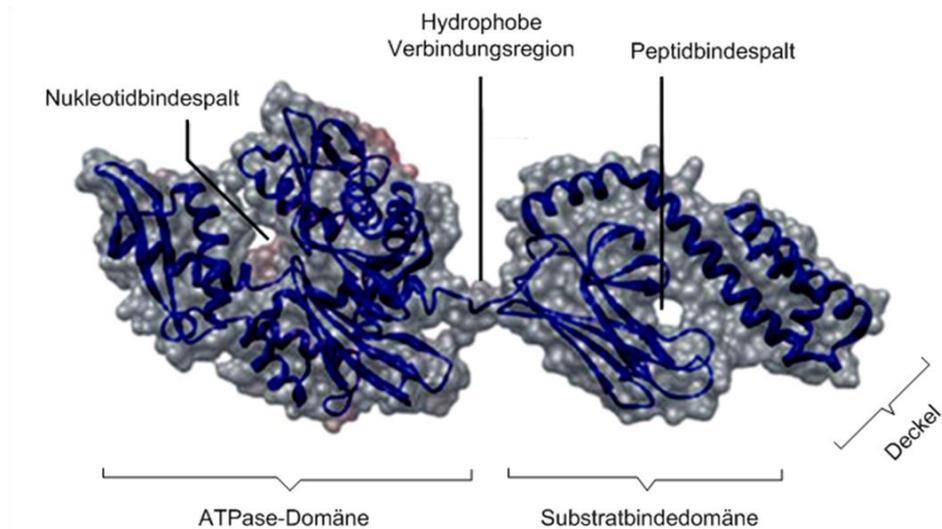


Abbildung 4: Struktur eines Hsp70-Chaperons (DnaK aus *E. coli*) mit gebundenem ADP in der ATPase-Domäne (Nukleotidbindedomäne; NBD; 44 kDa). Die NBD ist mit der Substratbindedomäne (SBD; 15 kDa) durch eine kurze, flexible und hydrophobe Verbindungsregion verknüpft. Infolge einer ATP-Hydrolyse zu ADP (durch Hsp40-Cochaperone stimuliert) entfernen sich die beiden Domänen voneinander. Dabei wird der Deckel in der SBD geschlossen und ein Substrat mit hoher Affinität gebunden. Durch den Austausch von ADP zu ATP (durch Nukleotidaustauschfaktoren; NEF) wird der Deckel wieder geöffnet und die beiden Domänen wieder zusammengelagert. Dadurch wird ein niedrigaffiner Bindungsstatus eingenommen, wodurch eine erleichterte Freisetzung und erneute Bindung von Substraten ermöglicht wird (Kampinga und Craig, 2010).

Dennoch wurde gezeigt, dass die simultane Interaktion und Faltung des naszierenden Polypeptids durch BiP offensichtlich ebenfalls positive Auswirkungen auf die Importeffizienz hat (Tyedmers *et al.*, 2003). Aktuelle Untersuchungen mit dem BiP-inaktivierenden Subtilase Zytotoxin zeigen eine Substrat-spezifische Inhibition des cotranslationalen Transportes ins ER semi-permeabilisierter HeLa-Zellen und lassen dabei auf eine direkte Interaktion mit dem Sec61-Komplex schließen, da dieser Vorläufer-abhängige Transportdefekt in Zellen mit einer Sec61 α -Y344H-Mutante (Mutation in ER-luminaler Schleife 7) phänokopiert wird (Lang, 2012). Für die Funktion beim ER-Import scheint jedoch die Mithilfe des Translokon-assoziierten Hsp40-Cochaperons Sec63 erforderlich zu sein, über das BiP zum Sec61-Komplex rekrutiert wird (Brodsky *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 2012; Lyman und Schekman, 1995; Meyer *et al.*, 2000). Auf der Grundlage von *in vitro* Fluoreszenzquenching-Experimenten und Einzelkanalmessungen mit rekonstituierten Proteoliposomen besitzt BiP die Fähigkeit die Translokationspore vor und in der frühen Phase der Translokation gegenüber Ionen zu verschließen (Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003). Neuere Untersuchungen deuten dabei auf eine typische Hsp70-Substratinteraktion hin, da der Mechanismus einerseits ATP-abhängig ist und zudem die Beteiligung eines bislang unbekanntes Hsp40-Cochaperones erfordert (Alder *et al.*, 2005). Mögliche Kandidaten stellen hierbei Sec63 und ERj1 dar, welche beide funktional über ihre J-Domäne mit BiP interagieren können und in Nähe des Translokons lokalisiert sind (Benedix *et al.*, 2010; Corsi und Schekman, 1997; Dudek *et al.*, 2005; Dudek *et al.*, 2002; Tyedmers *et al.*, 2000). BiP besitzt ferner eine generelle Funktion bei der Aufrechterhaltung der ER-luminalen Ca²⁺-Homöostase, da es als niedrigaffin Ca²⁺-bindendes Protein

IV. Einleitung

(ca. 10 Ca²⁺-Ionen pro Molekül) einen Großteil des freien Ca²⁺ im ER zu binden vermag (Coe, 2009; Lievremont *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Michalak *et al.*, 2002). Zudem ist BiP ein Hauptregulator der UPR („unfolded protein response“) und interagiert mit den drei UPR-Mediatoren PERK, Ire1 und ATF6. Im Umkehrschluss wird durch die Aktivierung der UPR die *BIP*-Expression induziert und somit der Aggregation von Proteinen entgegengewirkt (Bertolotti *et al.*, 2000; Li und Lee, 2006; Sitia und Braakman, 2003). Nicht zuletzt konnte für das molekulare Chaperon auch eine Beteiligung an der ER-assoziierten Protein-Degradation (ERAD) gezeigt werden, wobei es vermutlich die Übergabe fehlgefalteter Polypeptide an den Dislokationsapparat vermittelt (Beggah *et al.*, 1996; Brodsky *et al.*, 1999; Chillaron und Haas, 2000; Jin *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang unterstützt BiP auch die Dislokation bakterieller Exotoxine ins Zytosol (Schmitz *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1999). Zu dieser Toxinklasse wird auch das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* gezählt, welches nach endozytischer Aufnahme mittels eines C-terminalen KDEL-Motivs bis ins ER-Lumen gelangt (Jackson *et al.*, 1999), um von dort aus über den Sec61-Komplex ins Zytosol transportiert zu werden (Koopmann *et al.*, 2000). Dort inhibiert es den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 durch eine Adenosindiphosphat-Ribosylierung (Pavlovskis *et al.*, 1978). Ein weiteres bakterielles Zytotoxin, das oben erwähnte Subtilase Zytotoxin, wird in ähnlicher Weise internalisiert. Dieses durch pathogene *E. coli*-Stämme gebildete Toxin hat die besondere Eigenschaft, als Serinprotease BiP spezifisch an seiner hydrophoben Verbindungsregion zu spalten und damit zu inaktivieren (Chong *et al.*, 2008; Paton *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass dieses Toxin das lebensbedrohliche, hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) auslösen kann, welches durch eine Thrombozytenpenie, eine Zerstörung feiner Blutgefäße sowie akutes Nierenversagen gekennzeichnet ist, unterstreicht nochmals die zelluläre Bedeutung von BiP (Montecucco und Molinari, 2006; Wang *et al.*, 2007).

IV.1.3.3.2. Das Hefeortholog Kar2

Das in *S. cerevisiae* vorzufindende Protein Kar2 wurde ursprünglich im Zusammenhang mit Karyogamie (Fusion zweier Nuklei unterschiedlicher Genera zum Zygotenkern) isoliert und stellt mit einer Sequenzhomologie von 67 % das Hefeortholog zu BiP dar (Latterich und Schekman, 1994; Rose *et al.*, 1989). Es ist ebenfalls essentiell für die Zellviabilität (Normington *et al.*, 1989), fungiert als molekulares Hsp70-Chaperon bei der Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine (Machamer *et al.*, 1990; Scidmore *et al.*, 1993) und ist wesentlich am co- sowie posttranslationalen Proteintransport ins ER beteiligt (Boisramé *et al.*, 1998; Brodsky *et al.*, 1995; Matlack *et al.*, 1999; Pilon *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu BiP, welches basierend auf Ionenpermeabilitäts-Untersuchungen in der Lage ist den Ionenfluss über die Translokationspore zu minimieren, vermag Kar2, unabhängig von ATP oder ADP, diese Funktion nicht zu erfüllen. Stattdessen verursacht es sogar in Gegenwart von BiP eine Öffnung des Kanals und weist damit einen dominant-negativen Effekt auf (Alder *et al.*, 2005).

IV.1.3.3.3. Hsp40-Cochaperone des ER (ERj-Proteine)

Hsp40-Cochaperone, sind Homologe der bakteriellen DnaJ-Proteine und zeichnen sich durch eine charakteristische, aus vier α -Helices bestehende, J-Domäne mit einer Länge von ca. 70 Aminosäuren aus, über die sie mit der NBD von Hsp70-Chaperonen interagieren (Greene *et al.*, 1998; Hennessy *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 1999). Ein hochkonserviertes Sequenzmotiv, bestehend aus den drei Aminosäureresten Histidin, Prolin und Aspartat (HPD-Motiv), welches zwischen Helix 2 und 3 lokalisiert ist, stimuliert dabei die ATP-Hydrolyse der Chaperone (Cheetham und Caplan, 1998; Cheetham *et al.*, 1994). Vertreter dieser Proteine, die im ER-Lumen lokalisiert sind, werden als ERj-Proteine bezeichnet. In Säugetierzellen wurden bislang sieben verschiedene dieser ER-luminalen Hsp40-Proteine identifiziert, wovon ERj1, ERj2, ERj4 und ERj7 integrale Membranproteine darstellen (Bies *et al.*, 2004; Dudek *et al.*, 2002; Tyedmers *et al.*, 2000; Weitzmann *et al.*, 2007; Zahedi *et al.*, 2009).

ERj1 (Mtj1)

Das ausschließlich in Säugetierzellen vorkommende ERj1 (Mtj1) besitzt neben der ER-luminalen J-Domäne, über die es mit BiP interagieren kann, ein basisches, zytosolisch lokalisiertes Nonapeptid, ähnlich wie Sec62. Über dieses kann es mit der 28 S rRNA der ribosomalen 60 S Untereinheit in der Nähe des Tunnelausgangs assoziieren und einen Translationsarrest hervorrufen. Diese Inhibition wird durch eine Rekrutierung von BiP über die J-Domäne wieder aufgehoben, was auch mit der Rolle von BiP während des cotranslationalen Proteinimports ins ER konform geht (Benedix *et al.*, 2010; Dudek *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2010; Schäuble *et al.*, 2012).

ERj2 (Sec63)

Das Hsp40-Chaperon ERj2 (Sec63) wurde ursprünglich in der Hefe als essentielle Komponente beim Proteintransport ins ER identifiziert (Brodsky *et al.*, 1995; Brodsky und Scheckman, 1993; Corsi und Schekman, 1997; Young *et al.*, 2001). Auch im Säugetiersystem wurde das mit 2 μ M (in RM-Suspensionen) in äquimolarem Verhältnis zu Sec61 α und Sec62 vorliegende Protein als Translokations-assoziiertes Protein mit einer substratspezifischen Funktion beim ER-Import charakterisiert (Lang *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Sec63 ist in der Lage das ebenfalls an der Translokation beteiligte BiP über seine J-Domäne zum Sec61-Komplex zu rekrutieren (Misselwitz, 1999; Vembar *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2001). Es besitzt drei Transmembrandomänen (TMD), einen zytosolischen C-Terminus und einen ER-luminalen N-Terminus. Die J-Domäne befindet sich in der ER-luminalen Schleife zwischen TMD 2 und TMD 3. Mit einer negativ geladenen Region in der zytosolischen Domäne ist Sec63 in der Lage mit dem basischen Nonapeptid von Sec62 zu interagieren (Feldheim *et al.*, 1992; Skowronek *et al.*, 1999). Diese Bindung wird zusätzlich über eine CK2-abhängige Phosphorylierung verstärkt (Ampofo *et al.*, 2013). *SEC63*^{-/-}-Mausfibroblasten zeigen einen substratspezifischen Transportdefekt, erwachsene Mäuse mit einem gewebsspezifischen „knock-out“ entwickeln eine polyzystische Lebererkrankung, was unter anderem mit einer Unterrepräsentation der

relevanten Proteine Polycystin 1 und 2 in Hepatozyten einhergeht. Ein vollständiger „knock-out“ ist darüber hinaus embryonal letal (Davila *et al.*, 2004; Fedeles *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2012).

ERj3 (DNAJB11)

Das Hsp40-Cochaperon ERj3 (DNAJB11) stellt im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen ERj-Proteinen ein lösliches J-Domänen-Protein dar und repräsentiert das konservierte Säugetierhomolog zu Scj1 (Hefe). Neben seiner Interaktion mit BiP über die J-Domäne (Bies *et al.*, 2004; Bies *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000) ist ERj3 in der Lage selbst an neu synthetisierte, ungefaltete sowie auch für den ERAD-Weg bestimmte, fehlgefaltete Proteine zu binden, da auch nach Zerstörung des für die Hsp70/Hsp40-Komplex-Bildung essentiellen HPD-Motivs eine BiP-unabhängige Assoziation mit Substraten beobachtet wurde (Jin *et al.*, 2009; Meunier *et al.*, 2002; Yu und Haslam, 2005). ERj3 wird glykosyliert und liegt in der Zelle als Dimer vor, was *in vitro* für die Substratbindung von Bedeutung ist (Jin *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2005). Zudem wird die *ERJ3*-Expression, wie Fall vieler ER-Chaperone, durch ER-Stress induziert (Lee, 1992; Shen und Hendershot, 2005).

IV.1.3.3.4. Nukleotidaustauschfaktoren des ER

Um einen erneuten Substratbindungszyklus eingehen zu können, ist es erforderlich, dass das durch Hsp70-Chaperone gebundene ADP durch ATP ersetzt wird (Dudek *et al.*, 2009; Zahedi *et al.*, 2009). Dieser Vorgang wird durch sogenannte Nukleotidaustauschfaktoren (NEF) katalysiert. Für BiP wurden die beiden NEFs BAP (BiP-assoziiertes Protein; auch Sil1) sowie auch das Hsp70-verwandte Grp170 beschrieben (Andreasson *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2002; Senderek *et al.*, 2005; Weitzmann *et al.*, 2006). In der Hefe ist die Deletion beider Gene (*LSH1*, *SIL1*) synthetisch letal, was zum einen deren Redundanz zeigt und zum anderen, dass es offensichtlich keine weiteren NEFs gibt, die deren Funktion übernehmen können (Tyson und Stirling, 2000).

IV.1.3.3.5. Das Hsp70-verwandte Chaperon Grp170

Grp170 (auch ATP-bindendes Protein, ABP150 oder „oxygen-regulated protein“, Orp150) ist ein evolutionär konserviertes, konstitutiv exprimiertes Chaperon des ER und kann aufgrund seiner Charakteristika sowohl den Hsp70-Chaperonen als auch der Familie der Hsp110/SSE-Chaperone, einer Untergruppe großer Stressproteine, zugeordnet werden (Dierks *et al.*, 1996; Easton *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 1997; Lee-Yoon *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2003). Grp170 interagiert, wie BiP (Hsp70) und Grp94 (Hsp90), mit neu synthetisierten Antikörperketten (Lin *et al.*, 1993). Es besitzt eine N-terminale ATP-Bindedomäne, die ATP-Hydrolyse kann jedoch nicht über eine Assoziation mit J-Domänen stimuliert werden, sondern erfordert die Anwesenheit eines Hsp70/Hsp40-Komplexes. Dabei kann

Grp170 zudem als Nukleotidaustauschfaktor für BiP fungieren (Weitzmann *et al.*, 2006). Die Expression von *GRP170* wird ferner durch UPR-Aktivierung induziert (Craven *et al.*, 1996).

IV.1.3.3.6. Das Hsp90-Chaperon Grp94

Ein ebenso abundantes, ER-luminales Chaperon ist das Grp94, welches zur evolutionär konservierten Familie der Hsp90-Proteine gezählt wird. Dieses konstitutiv exprimierte Hitzeschockprotein (Buchner, 1996; Lindquist und Craig, 1988) bindet wie Hsp70-Chaperone fehlgefaltete Polypeptide und wird durch UPR-Aktivierung induziert (Argon und Simen, 1999; Eletto *et al.*, 2010; Nathan *et al.*, 1997). Die N-terminale Domäne von Hsp90-Proteinen (25 kDa) ist in der Lage ATP und zugleich ungefaltete Proteine zu binden, was möglicherweise durch die 12 kDa große C-terminale Domäne stimuliert werden kann. Diese vermittelt zudem die Dimerisierung des Hsp90 (Prodromou *et al.*, 1999; Scheibel *et al.*, 1998; Stebbins *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1997).

IV.1.3.3.7. Die Lektin-Chaperone Calnexin und Calretikulin

Die Lektin-Chaperone Calnexin und Caretikulin sind an der Qualitätskontrolle neu synthetisierter Glykoproteine im ER beteiligt und katalysieren deren Faltung durch Bindung spezifischer Glykosidreste (High *et al.*, 2000; Kleizen und Braakman, 2004; Zapun *et al.*, 1999). Beide wurden zudem als Ca^{2+} -bindende und Ca^{2+} -regulierte ER-Proteine beschrieben (Coe, 2009; Corbett *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 1991).

IV.1.3.3.8. Die Protein-Disulfid-Isomerase

Die Protein-Disulfid-Isomerase (Pdi) ist eine abundante, ER-luminale Oxidoreduktase und katalysiert Ditioloxidationen und Disulfidreduktionen von Sulfhydroylgruppen neu synthetisierter Polypeptide (Laboissiere *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 2000). Durch Isomerisierung bewirkt das Enzym eine Umstrukturierung nicht-nativer Disulfidbindungen, unterstützt dabei die Faltung naszierender Proteine in deren korrekte Konformation und weist dabei ferner eine von der Isomerase-unabhängige intrinsische Chaperonaktivität auf (Wang, 1998). Es wurde gezeigt, dass Pdi mit naszierenden Polypeptiden in der späten Phase der Translokation interagiert (Klappa *et al.*, 1995; Volkmer *et al.*, 1997). Der Promotor von *PDI* enthält, wie die meisten ER-Faltungsenzyme, ein „ER stress response element“ (ERSE), wodurch Pdi in Gegenwart fehlgefalteter Proteine infolge der UPR verstärkt synthetisiert wird (Roy und Lee, 1999; Shamu *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1998).

IV.1.4. Die „unfolded protein response“ (UPR)

Die Akkumulation ungefalteter und fehlgefalteter Proteine im ER führt zur Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR), einem koordinierten, adaptiven Prozess als Reaktion auf ER-Stress (Schröder und Kaufman, 2005). Diese zelluläre Antwort zeichnet sich durch Inhibition der generellen Proteinsynthese, einer gleichzeitig verstärkten Synthese faltungskatalysierender Enzyme sowie einer Aktivierung der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) aus. Abhängig vom Ausmaß des ER-Stresses bewirkt die UPR entweder eine Regeneration des ER-Milieus oder führt bei Überlastung des Systems zum programmierten Zelltod, der Apoptose (Harding *et al.*, 2002; Harding *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2006). Die Induktion der UPR erfolgt über drei integrale ER-Membranproteine, die als ER-Stresssensoren fungieren: Die Kinase und Endoribonuklease Ire1 („inositol requiring element“), die Kinase PERK („PKR-like ER kinase“) sowie der Transkriptionsfaktor ATF6 („activating transcription factor 6“) (Harding *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2000). Die Aktivierung dieser Rezeptoren erfolgt durch Dissoziation des molekularen Chaperons BiP, welches unter normalen Bedingungen mit diesen assoziiert und infolge einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER in Form eines vorgeschalteten Sensors rekrutiert wird. (Bertolotti *et al.*, 2000; Oikawa *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2002a). Dieser Zustand kann artifiziell herbeigeführt werden, indem mittels RNA-Interferenz die mRNA von *BIP* degradiert und somit die BiP-Synthese inhibiert oder das Chaperon direkt durch das Subtilase Zytotoxin gespalten wird (Suzuki *et al.*, 2007; Wolfson *et al.*, 2008). PERK phosphoryliert nach Dimerisierung den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α), was zu einem globalen Translationsarrest führt. Gleichzeitig wird die selektive Expression UPR-induzierter Gene aktiviert, wozu u.a. der Transkriptionsfaktor ATF4 sowie das dadurch regulierte proapoptotische Protein CHOP zählt. Ire1, welches ebenfalls dimerisiert, aktiviert durch Autophosphorylierung seine im Nukleus lokalisierte Endonuklease, welche die mRNA von *XBPI* spaltet („X-box binding protein 1“). Dadurch wird der Transkriptionsfaktor Xbp1-sp1 („splice variant 1“) synthetisiert, der weitere UPR-regulierte Gene aktiviert. ATF6 wiederum wird nach fehlender Retention, infolge der BiP-Dissoziation, in den Golgi-Apparat transferiert, wo es mittels Intramembranproteolyse durch S1P und S2P als löslicher Transkriptionsfaktor freigesetzt wird und an ERSE („ER-stress elements“) in Promotoren UPR-induzierter Gene binden kann (Chakrabarti *et al.*, 2011; Malhi und Kaufman, 2010; Oyadomari und Mori, 2004; Ye *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2000). Eine weiterer, direkterer Mechanismus zur Steuerung des selektiven ER-Proteinimports nach UPR-Aktivierung ist vermutlich bereits in der Signalsequenz von Proteinvorläufern verankert. Durch Austausch verschiedener Signalsequenzen wurde gezeigt, dass sowohl Länge, Hydrophobizität wie auch die generelle Aminosäurezusammensetzung von Signalpeptiden zumindest teilweise den Transport von Proteinen unter ER-Stress beeinflussen (Kang *et al.*, 2006).

IV.1.5. Die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD)

Die Qualität neu synthetisierter Proteine wird nach deren Import ins ER sorgfältig überwacht. Dabei wird nur korrekt gefalteten Proteinen die weitere Passage im Sekretionsweg gewährt, während jene, die diese Qualitätskontrolle aufgrund von Fehlfaltung oder fehlender Assemblierung nicht bestehen, dem Prozess der sogenannten ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) zugeführt werden (Hoseki *et al.*, 2009). Dieser konservierte Mechanismus spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der ER-Homöostase und verhindert die Akkumulation fehlgefalteter Proteine. Entsprechende Proteine werden hierfür nach Erkennung über die ER-Membran disloziert und durch den zytosolischen 26 S Proteasomkomplex degradiert (Kostova und Wolf, 2003; Sitia und Braakman, 2003). Trotz der Beschreibung weiterer potentieller Kandidaten wie Derlin1 und Hrd1 wird davon ausgegangen, dass die Retrotranslokation generell über den Sec61-Komplex erfolgt (Bernardi *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010; Katiyar *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 1997; Römisch, 1999; Schäfer und Wolf, 2009; Scott und Schekman, 2008; Ye *et al.*, 2004; Zhou und Schekman, 1999). Weitere Hinweise, die dafür sprechen zeigen Untersuchungen diverser pflanzlicher und bakterieller Toxine, welche nach endozytotischer Aufnahme über den Sekretionsweg ins Zytosol gelangen und dabei ebenfalls den Sec61-Komplex, vermutlich maskiert als ERAD-Substrat, zur Retrotranslokation nutzen (Jackson *et al.*, 1999; Koopmann *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1999). Für den Dislokationsprozess spielen überdies verschiedene molekulare Chaperone eine Rolle bei der Identifikation und Übergabe fehlgefalteter Chaperone zur Exportmaschinerie (Eletto *et al.*, 2010; Kabani *et al.*, 2003).

IV.2. Zelluläres Calcium

Calcium (Ca^{2+}) spielt eine bedeutende Rolle als sekundärer Botenstoff und ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, die von der Zellproliferation über den Steroid- und Glykosidmetabolismus, die Muskelkontraktion, neuronale Aktivitäten, die Exozytose bis hin zu apoptotischen Vorgängen reichen (Berridge *et al.*, 2000). Durch die positive Ladung vermag Ca^{2+} an verschiedene Proteine zu binden und deren Konformation und Interaktionspotential zu verändern. Da eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} Konzentration eine zytotoxische Phosphatpräzipitation sowie Proteinaggregationen verursacht ist eine Kompartimentierung des bivalenten Ions erforderlich. Das ER in Säugetierzellen stellt dabei ein Hauptspeicherorganell für zelluläres Ca^{2+} dar. Mit einer freien Ca^{2+} -Konzentration von 100-800 μM besteht im Vergleich zum Zytosol mit 50-100 nM ein 1.000-10.000-facher Konzentrationsunterschied (Michalak *et al.*, 2009; Robert *et al.*, 1998; Ziman *et al.*, 2010). Die Speicherung von Ca^{2+} im ER erfüllt mindestens zwei weitere Funktionen. Zum einen unterstützt sie die Faltungskapazität einer Reihe molekularer Chaperone und bietet ein Milieu vergleichbar zur extrazellulären Umgebung (ca. 2 mM Ca^{2+}), was vermutlich auch dabei hilft, dass sekretorische Proteine eine stabile Konformation erreichen. Zum anderen dient das ER als Reservoir für die kontrollierte,

transiente Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol über spezialisierte Ionenkanäle, wie Inositol-3-Phosphat (IP_3R) oder Ryanodin-Rezeptoren (RyR), welche im Rahmen der Signaltransduktion aktiviert werden können (Berridge, 2002; Chen *et al.*, 2010). Da hydratisiertes Ca^{2+} in Lösung mit bis zu 40 $\mu\text{m/s}$ diffundieren kann (wenn auch derart hohe Geschwindigkeiten innerhalb des dichtgepackten Zytosols nicht möglich sind), bietet dieser sekundäre Botenstoff eine äußerst schnelle und unmittelbare Reaktionsfähigkeit auf zelluläre Gegebenheiten, wie beispielsweise bei der Transmitterfreisetzung an postsynaptischen Membranen von Neuronen (Clapham, 2007). Zudem besitzt Ca^{2+} eine hohe Affinität für Carboxyl- und Carbonylreste, zwei der häufigsten funktionalen Gruppen von Polypeptiden (Case *et al.*, 2007). Grundsätzlich ist durch die heterogene Verteilung von Ca^{2+} -Pumpen und Ca^{2+} -bindenden Proteinen im ER auch die Ca^{2+} -Verteilung im ER nicht homogen (Papp *et al.*, 2003). Entsprechende Proteine werden im folgenden eingängiger beschrieben.

IV.2.1. Ca^{2+} -bindende Proteine des ER

Das ER-Lumen stellt eine spezialisierte Umgebung mit einer außerordentlich hohen Ca^{2+} -Konzentration von insgesamt 1-3 mM dar, wovon jedoch ein Großteil in gebundener Form vorliegt. Da das ER ferner eine Vielzahl an Ca^{2+} -bindenden Proteinen aufweist, beeinflussen diese sowohl die Speicherkapazität, die Ca^{2+} -Freisetzung als auch die Funktionalität diverser Faltungs- und Modifikationsenzyme (Michalak *et al.*, 2002; Schröder, 2008). Viele dieser Ca^{2+} -bindenden Proteine haben weitere Funktionen bei der Qualitätskontrolle und Faltung von Polypeptiden und sind dabei von einer adäquaten Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Ashby und Tepikin, 2001). Calretikulin stellt hierbei den Prototyp eines solchen Ca^{2+} -bindenden und -puffernden Chaperons dar (Michalak *et al.*, 2009). Neben einer Domäne mit hoher Affinität ($K_d = 1 \mu\text{M}$), jedoch niedriger Bindungskapazität (1 mol Ca^{2+} /Molekül) besitzt Calretikulin eine weitere C-terminale Domäne, bestehend aus Clustern mit Aspartat- und Glutamatresten, die zwar eine deutlich niedrigere Affinität ($K_d = 2 \text{ M}$) aufweist, allerdings eine äußerst hohe Kapazität zur Ca^{2+} -Bindung besitzt (25 mol Ca^{2+} /Molekül) und für die Bindung von über 50 % des ER-luminalen Ca^{2+} verantwortlich ist (Baksh und Michalak, 1991; Breier und Michalak, 1994; Nakamura *et al.*, 2001). Dieser Beitrag zur Ca^{2+} -Homöostase wird auch daran deutlich, dass eine Überexpression von *CALRETIKULIN* Einfluss auf die Speicherung und Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER hat (Li *et al.*, 2002; Mesaeli *et al.*, 1999). Neben Calretikulin existieren eine Reihe weiterer Ca^{2+} -bindender Proteine im ER, wozu das Hsp70-Chaperon BiP, das Hsp90-Protein Grp94, die Oxidoreduktasen Pdi und ERp72 sowie das Membran-gebundene Homolog von Calretikulin, Calnexin zählen. Die meisten dieser Proteine besitzen eine relativ niedrige Affinität bei gleichzeitig hohen Bindungskapazitäten (Argon und Simen, 1999; Coe, 2009; Lucero *et al.*, 1998). BiP repräsentiert hierbei ebenfalls einen der wichtigsten Ca^{2+} -Puffer und bindet etwa 25 % des ER-luminalen Ca^{2+} (Lievremont *et al.*, 1997). Grundsätzlich besitzt die Zelle zwar hunderte von Proteinen, die das Potential besitzen Ca^{2+} zu binden, jedoch erfolgt die Speicherung von Ca^{2+} im ER von nicht-

muskulären Zellen insbesondere durch die vier Faltungsenzyme Calretikulin, BiP, Grp94 und Pdi (Carafoli *et al.*, 2001; Milner *et al.*, 1991). Demnach werden ca. 90 % des ER-luminalen Ca^{2+} durch Proteine gepuffert (Ashby und Tepikin, 2001).

IV.2.2. Ca^{2+} -Pumpen und -Austauscher

Um den niedrigen Ca^{2+} -Level im Zytosol beizubehalten investiert die Zelle viel Energie. Neben der Differenz zur hohen ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration besteht insbesondere über die Plasmamembran ein enormer Ca^{2+} -Gradient. Zur Aufrechterhaltung dieses Zustandes agieren spezifische Ca^{2+} -ATPasen der SERCA- („sarco-/endoplasmic reticular Ca^{2+} ATPases“) oder der PMCA-Familie („plasma membrane Ca^{2+} ATPases“). Diese Pumpen befördern Ca^{2+} ins ER bzw. über die Plasmamembran aus der Zelle heraus. Pro hydrolysiertem ATP tauschen SERCAs dabei zwei Ca^{2+} -Ionen, PMCAs ein Ca^{2+} gegen jeweils ein Proton aus. Beide Pumpen sind P-Typ ATPasen, welche als Charakteristikum während der Katalyse eines Transportvorgangs die γ -Phosphatgruppe von ATP auf einen konservierten Aspartatrest innerhalb des Enzyms übertragen und dabei ein obligatorisches Aspartyl-Phosphat-Intermediat bilden (Kuhlbrandt, 2004; Strehler und Treiman, 2004). Das humane Genom kodiert drei SERCA-Gene (Hefen besitzen keine SERCA) die wiederum gewebes- und entwicklungspezifisch unterschiedliche „splice“-Varianten aufweisen (Guerini *et al.*, 1998; Lytton *et al.*, 1992). Die Isoformen SERCA2a und b werden in den meisten Zellen konstitutiv synthetisiert, wenn auch SERCA2a vermehrt in Muskelzellen und Neuronen vorgefunden wird (Vandecaetsbeek *et al.*, 2009; Wuytack *et al.*, 1994). Die Aktivität von SERCAs werden u.a. durch Proteine wie Phospholamban, Sarcolipin oder die Ca^{2+} -bindenden Chaperone Calnexin und Calretikulin, zum Teil phosphorylierungsabhängig gesteuert (Berridge, 2002; John *et al.*, 1998; Periasamy und Kalyanasundaram, 2007; Roderick *et al.*, 2000). Die humanen PMCAs werden durch vier Gene kodiert und insgesamt durch 30 alternative „splice“-Varianten repräsentiert (Carafoli und Brini, 2000; Strehler und Treiman, 2004; Strehler und Zacharias, 2001). Diese ATPasen besitzen einen zytosolischen N- und C-Terminus, wovon letzterer eine Länge von 70-200 Aminosäuren aufweist und der Autoinhibition dient (Strehler und Zacharias, 2001). Durch Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin wird diese Hemmung aufgehoben und die PMCA aktiviert. Dabei können bis zu zwei Calmodulin-Moleküle assoziieren und somit die Aktivität abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration steuern. Calmodulin steigert zudem die Affinität der PMCA für Ca^{2+} um das ca. 20-30-fache (Burette und Weinberg, 2007; Clapham, 2007; Monesterolo *et al.*, 2008; Tidow *et al.*, 2012). Als weiterer Mechanismus zur Elimination von Ca^{2+} aus dem Zytosol dienen Plasmamembran-ständige Ionen-transporter wie die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX; 1 Ca^{2+} gegen 3 Na^+) oder die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -Austauscher (NCKX; 1 Ca^{2+} und 1 K^+ gegen 4 Na^+). Während die PMCAs eine äußerst hohe Affinität für Ca^{2+} ($K_d \approx 100$ nM) aufweisen ist deren Pumpleistung verhältnismäßig niedrig. Austauscher hingegen haben eine relativ geringe Affinität (NCX = ca. 1 μM), jedoch eine hohe Transportkapazität

(Blaustein *et al.*, 2002). PMCA dient somit der Aufrechterhaltung niedriger zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen im Ruhezustand, während die NCX und NCKX infolge der Signaltransduktion den hohen Ca^{2+} -Level schnell (wenige ms) rückgängig machen können, um toxische Auswirkungen zu verhindern (Carafoli und Brini, 2000; Clapham, 2007; Hilgemann *et al.*, 2006). Um die Ca^{2+} -Konzentration möglichst niedrig zu halten enthält das Zytosol ferner eine Reihe Ca^{2+} -bindender Proteine, wie u.a. Calmodulin, Calbindin D-28k und Parvalbumin (Berridge *et al.*, 2000; Celio, 1990). Dadurch werden Ca^{2+} -Änderung infolge einer Öffnung von Kanälen lokal begrenzt, wobei die Ca^{2+} -Konzentration von ausgehend ca. 10 μM an der Porenöffnung innerhalb eines Radius von wenigen 100 Å auf 50-100 nM herabfällt. Dieser Bereich ist ausreichend um mindestens 10 Calmodulin-Moleküle (40 Å Durchmesser) zu beherbergen und diese zu aktivieren (Naraghi und Neher, 1997).

IV.2.3. Ca^{2+} -Leckkanäle

Wie bereits aus den vorherigen Kapiteln hervorgegangen ist, stellt das Zytosol den Ort mit der vermutlich niedrigsten Ca^{2+} -Konzentration innerhalb einer Säugetierzelle dar. Insbesondere das ER, als einer der Hauptspeicherorte und Quelle für freisetzbare Ca^{2+} , steht hierzu in starkem Kontrast. Während die Ca^{2+} -ATPasen der SERCA-Familie kontinuierlich Ca^{2+} in das Organell befördern wirkt diesem Import ein stetiger, passiver Ca^{2+} -Verlust entgegen, welcher unabhängig von einer physiologischen Stimulation (z.B. über IP_3 - und Ryanodin-Rezeptoren) ist. Durch diesen „Wettstreit“ zwischen Zytosol und ER-Lumen besteht ein dynamisches Gleichgewicht, welches sich auch infolge einer Agonisten-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung anschließend wieder einstellt (Camello *et al.*, 2002; Hofer *et al.*, 1996). Dieser sogenannte Ca^{2+} -Leckstrom kann auf elegante Weise demaskiert werden, indem entsprechende ATPasen geblockt werden, was sehr effektiv sowie spezifisch mit dem irreversiblen SERCA-Inhibitor Thapsigargin (aus der Pflanze *Thapsia garganica*) durchführbar ist. Demzufolge ist der Ca^{2+} -Ausstrom in der Lage das ER binnen kürzester Zeit zu depletieren (Hofer *et al.*, 1996). Trotz dieses enormen Einflusses ist bis heute die physiologische Bedeutung dieses Phänomens nicht genau geklärt. Dennoch wurden innerhalb der letzten Jahre einige Erkenntnisse über die Identität der diverser Ca^{2+} -Leckkanäle gewonnen. Zu den bisher beschriebenen Kandidaten gehört das kleine antiapoptotische Protein Bcl-2, welches infolge einer Überexpression eine annähernde Verdopplung des Ca^{2+} -Leckstroms bewirkt (Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2000; Pinton und Rizzuto, 2006). Eine Reihe von Studien beschreiben ebenfalls Presenilin 1 und 2, Untereinheiten des γ -Sekretase-Komplexes, als Leckkanäle (Cheung *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2006). Weiterhin wurde u.a. ein Einfluss durch Pannexin, TRPC1 oder einer trunkierten SERCA1-Isoform beobachtet (Berbey *et al.*, 2009; Chami *et al.*, 2001; Chami *et al.*, 2008; Vanden Abeele *et al.*, 2006). Nicht zuletzt wurde auch der Sec61-Komplex, die zentrale Komponente der ER-residenten Proteintranslokase, als ein bedeutender Faktor des passiven Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER charakterisiert. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass das Translokon einen aktivierbaren, unspezifischen Ionenkanal mit

einem Durchmesser zwischen 6 Å im geschlossenen, und 60 Å im offenen Zustand repräsentiert (Hamman *et al.*, 1997; Roy und Wonderlin, 2003; Simon *et al.*, 1989; Wirth *et al.*, 2003). Zunächst wurde vermutet, dass die alleinige Assoziation mit Ribosomen während der Proteintranslokation eine Permeabilitätsbarriere bietet (Crowley *et al.*, 1994), jedoch widerlegen aktuelle Strukturdaten des aktiven und inaktiven Sec61-Komplexes mit gebundenem Ribosom diese These, da zwischen Ribosom und Sec61-Komplex ein offener Spalt verbleibt, der eine Passage von Ionen und kleinen Molekülen ermöglichen kann (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008). Diese Auffassung geht auch mit Ergebnissen neuerer Studien auf zellulärer Ebene konform, nach denen der Sec61-Komplex infolge der Inhibition der Proteinsynthese, unabhängig von einer Ribosomenbindung, transient permeabel für Ca^{2+} ist (Amer *et al.*, 2009; Flourakis *et al.*, 2006; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007). Sec61 α -Depletionsstudien in HeLa-Zellen deuten dabei auf einen Beitrag von mindestens 50 % zum Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER hin (Lang *et al.*, 2011). Somit scheint der Sec61-Komplex nach Termination der Proteintranslokation zumindest in Säugetierzellen für Ca^{2+} -Ionen permeabel zu sein (Harsman *et al.*, 2011c).

IV.2.4. Das Ca^{2+} -Sensorprotein Calmodulin

Calmodulin (CaM; „calcium-modulated protein“) ist ein kleines (17 kDa), ubiquitäres, regulatorisches Protein, das in Eukaryoten hochkonserviert ist und gleichzeitig für die evolutionäre Bedeutung von Ca^{2+} als sekundärem Botenstoff steht (Babu *et al.*, 1985; Cheung, 1980). Homologe Proteine können sogar in Bakterien gefunden werden (Onek und Smith, 1992). Das sensorische Protein besitzt vier EF-Hand-Motive (Ca^{2+} -Bindungsmotive; benannt nach der E- und F-Region von Parvalbumin), zwei davon mit niedriger Ca^{2+} -Affinität ($K_d = 10\text{-}100 \mu\text{M}$; N-Terminus) und zwei mit hoher Ca^{2+} -Affinität ($K_d < 10 \mu\text{M}$; C-Terminus) und gehört damit zur Superfamilie der EF-Hand-Helix-Schleife-Helix-Proteine, welche mit 39 Subfamilien und bislang über 250 identifizierten Proteinen, die größte Klasse Ca^{2+} -bindender Proteine repräsentiert (Kawasaki und Kretsinger, 1994; Nakayama und Kretsinger, 1994; Weinstein und Mehler, 1994). CaM wird im humanen Genom auf den Chromosomen 2, 14 und 19 kodiert und in Form dreier identischer Genprodukte exprimiert (Berchtold *et al.*, 1993). Unter physiologischen Bedingungen liegt die zelluläre CaM-Konzentration bei ca. $10 \mu\text{M}$ (Black *et al.*, 2004). Als primärer Sensor von zytosolischen Ca^{2+} -Änderungen erfährt CaM nach Ca^{2+} -Bindung eine Konformationsänderung von einer globulären zu einer hantelförmigen Struktur und kann infolgedessen über seine exponierte, hydrophobe und flexible Interaktionsdomäne mit einer Vielzahl von Zielproteinen interagieren und diese aktivieren, indem es an basische, amphiphile Helices dieser Proteine bindet. CaM vermag dabei eine Reihe zellulärer Funktionen, wie die Sekretion, die Zellproliferation und -bewegung und nicht zuletzt die Signaltransduktion zu regulieren (Gnegy, 1993; Hinrichsen, 1993; Lu und Means, 1993; Means und Dedman, 1980). Hierbei bilden insbesondere Ionenkanäle, die in die Ca^{2+} -Homöostase involviert sind, eine Hauptklasse CaM-regulierter Proteine

IV. Einleitung

(Dick *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 1995; Zuhlke *et al.*, 1999). Auf der Grundlage elektrophysiologischer Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Wagner (Biophysik, Universität Osnabrück) ist Ca^{2+} -CaM in der Lage die Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes in rauen Mikrosomen zu reduzieren. Zusammen mit der Arbeitsgruppe Zimmermann wurde mittels Sequenzanalyse („Calmodulin Target Database“ und „Eucaryotic Linear Motif (ELM) resource“) ein sogenanntes IQ-Motiv, ein hochkonserviertes CaM-Bindungsmotiv im zytosolischen N-Terminus der α -Untereinheit des Sec61-Komplexes in Säugetieren identifiziert, welches dem IQ-Motiv unkonventioneller Myosine entspricht (Abbildung 5, A-C) (Punternvoll *et al.*, 2003; Rhoads und Friedberg, 1997; Yap *et al.*, 2000). Durch *in vitro* Interaktionsstudien mittels Coflotation in Saccharose-Gradienten, proteolytischer Spaltung nach FeBABE-Markierung (Fe(III)(s)-1-(p-Bromoacetamidobenzyl)-Ethyldiamin-tetraessigsäure) und Peptidbindungs-Experimenten durch Martin Jung wurde eine Ca^{2+} -abhängige CaM-Bindung zu Sec61 α verifiziert (Erdmann *et al.*, 2011).

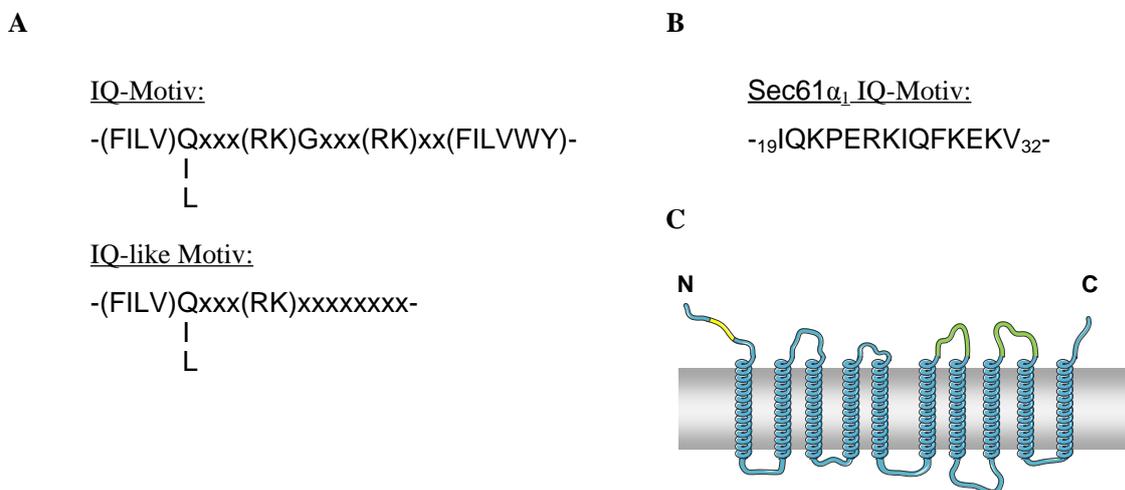


Abbildung 5: **A**) Konsensussequenz des IQ-Motivs und des IQ-like Motivs (Calmodulin Target Database) **B**) IQ-Motiv, identifiziert im N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit von *Canis lupus familiaris* und *Homo sapiens* (Gen-ID: P61619). **C**) Vorhergesagte Membrantopologie von Sec61 α in Säugetieren. Das IQ-Motiv ist in gelb dargestellt. Die grünen, zytosolischen Schleifen bilden die potentiellen Bindungsregionen für das Ribosom (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008); C = C-Terminus; N = N-Terminus.

IV.2.5. Der „store-operated Ca^{2+} -entry“ (SOCE)

Der „store-operated Ca^{2+} -entry“ (SOCE; Speicher-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom) oder auch „capacitative Ca^{2+} entry“ (CCE; kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom) ist ein ubiquitärer Signalmechanismus, der als Reaktion auf eine Reduktion der ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird (Parekh und Putney, 2005; Putney, 1986; Wu *et al.*, 2007). Unter physiologischen Bedingungen erfolgt der SOCE meist infolge einer Rezeptorstimulation an der Plasmamembran, welcher nach Signaltransduktion eine Öffnung von IP_3 - oder Ryanodin-Rezeptoren und damit eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER bewirkt. Durch die Speicherdepletion werden wiederum sogenannte SOCs („store-operated Ca^{2+} channels“) in der Plasmamembran aktiviert. Dieser Einstrom hat zwei wichtige Konsequenzen. Zum Einen wird extrazelluläres Ca^{2+} zur Wiederbefüllung des ER bereitgestellt, wodurch auch prolongierte

IV. Einleitung

Stimulationen möglich sind. Und zum Anderen erfolgt durch den Ca^{2+} -Influx eine Signal-amplifikation, was zur länger anhaltenden Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Levels führt, ein Vorgang der u.a. in T-Lymphozyten erforderlich ist, um die Expression von Genen nach einer T-Zellaktivierung voranzutreiben (Lewis, 2001; Parekh und Putney, 2005). Als Ca^{2+} -Sensor im ER-Lumen dient das 77 kDa große Typ I-Membranprotein STIM1 („stromal interaction molecule“), welches neben einer Reihe weiterer funktionaler Domänen eine SAM- („sterile- α -motif“) zur Oligomerisierung eine ER-luminale EF-Hand besitzt (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005; Stathopoulos *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Als zweite Komponente des SOCE-Mechanismus wurde das 33 kDa Plasmamembranprotein Orai1 (CRACM1) identifiziert, welches die porenbildende Untereinheit der SOC's darstellt. Nach ER-luminaler Ca^{2+} -Reduktion oligomerisieren STIM1-Moleküle und interagieren mit Hilfe der exponierten Lysin-reichen-Domäne mit Orai1-Molekülen in der Plasmamembran. Durch deren Oligomerisierung wiederum werden schließlich die Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran generiert. (Feske *et al.*, 2006; Hewavitharana *et al.*, 2008; Hogan *et al.*, 2010; Luik und Lewis, 2007; Vig *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). In Abbildung 6 sind alle unter IV.2 beschriebenen Vorgänge in einer schematischen Übersicht zusammengefasst.

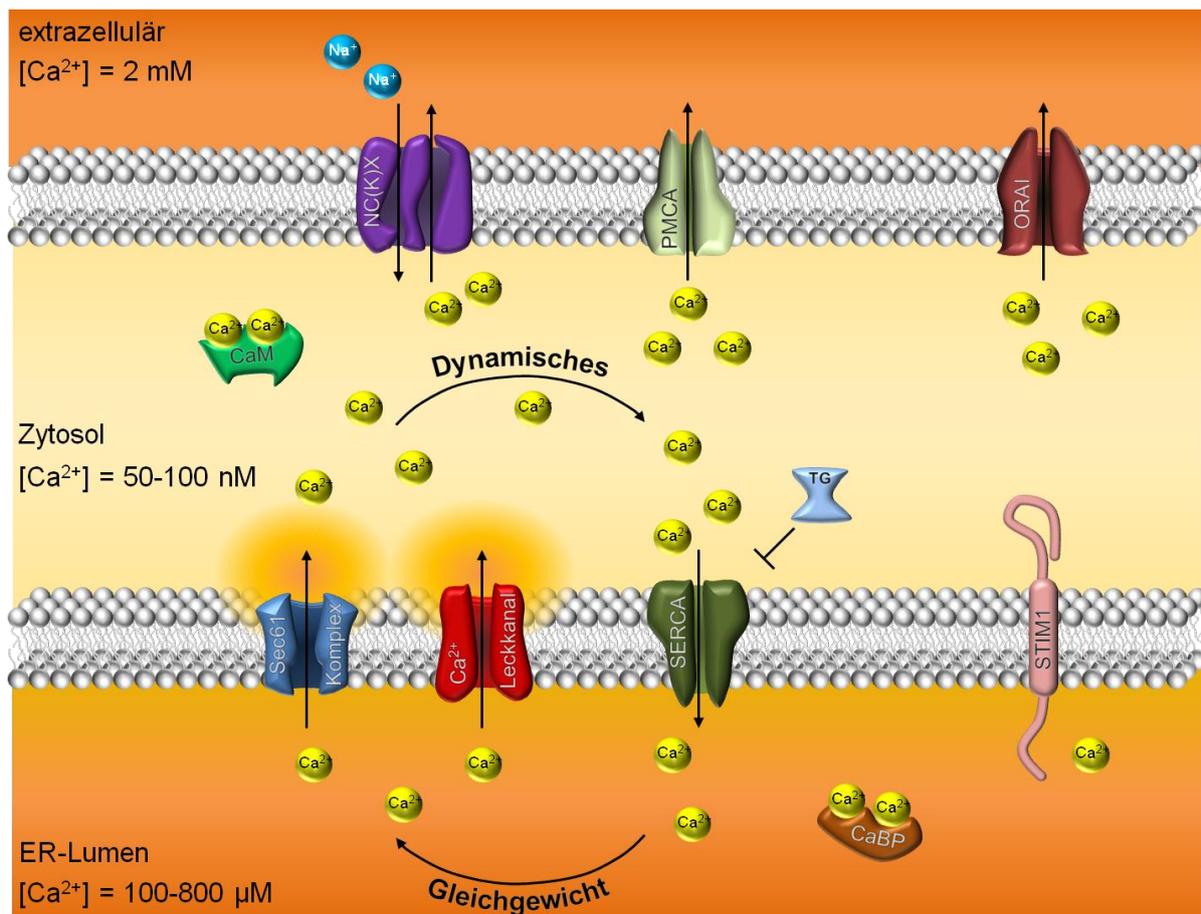


Abbildung 6: Übersicht der relevanten Faktoren der zellulären Ca^{2+} -Homöostase. Genauere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. CaBP = Ca^{2+} -bindendes Protein; CaM = Calmodulin; SERCA = glattes endoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPase; STIM1 = stromal interaction molecule 1; ORAI = store-operated Ca^{2+} -channel; PMCA = Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase; NC(K)X = Natrium-Calcium-(Kalium)-Austauscher; TG = Thapsigargin; Na^+ = Natriumion; Ca^{2+} = Calciumion.

IV.3. Ziele der Arbeit

Der Sec61-Komplex hat als essentielles Zentrum der ER-Proteintranslokase eine hochdynamische Struktur, welche entfalteten Polypeptidketten mit Aminosäureresten unterschiedlicher Größe den Import in das ER ermöglicht und sogar lediglich partiell gefalteten Proteinen den Export über das ERAD-System erlaubt. Gleichzeitig bietet der Translokationskanal durch seine Polypeptid-leitende Funktion und dem damit einhergehenden wässrigen Interieur eine optimale Passage für kleine, ungeladene Moleküle sowie Ionen. Da der Sec61-Komplex zumindest kurz nach der Öffnung der Translokationspore sowie nach Termination der Translokation permeabel für Ionen ist, stellte sich die Frage nach regulatorischen Mechanismen, welche unter physiologischen Bedingungen einen adäquaten Transport von Proteinen erlauben, ohne die erforderliche Permeabilitätsbarriere der ER-Membran gegenüber Ca^{2+} zu beeinträchtigen. Hinweise auf eine derartige Regulation konnten bereits durch *in vitro*-Experimente erhoben werden. Daher war das Ziel dieser Dissertation entsprechende, potentielle Kandidaten, d.h. das zytosolische Calmodulin sowie das ER-luminale, molekulare Chaperon BiP, auf zellulärer Ebene hinsichtlich einer Funktion bei der Regulation des Sec61-Komplexes zu untersuchen und genauer zu charakterisieren.

Um diese Fragestellung anzugehen wurden zur Reduktion bzw. Inhibition von Calmodulin diverse, etablierte Calmodulin-Antagonisten verwendet oder zur Überexpression in HeLa-Zellen ein Plasmid transfiziert, welches die cDNA von CaM-GFP kodiert. Zur zellulären Depletion von BiP wurde eine geeignete RNAi-Strategie angewandt. Um einen potentiellen Bezug zur Proteintranslokase herstellen zu können wurde in bestimmten Fällen eine zusätzliche siRNA-vermittelte Depletion des Sec61 α -Proteins durchgeführt. Die Verifizierung resultierender Effekte durch die siRNA-Behandlungen erfolgte durch eine Rettung des Phänotyps mit einer Plasmid-kodierten cDNA von *BIP* bzw. *SEC61A1*. Nach erfolgreicher Rettung wurden anschließend gezielt Punktmutationen in die jeweilige cDNA eingeführt (*SEC61A1*-R24A/K29A, *BIP*-R197E, *BIP*-R197H) und diese in gleicher Weise exprimiert, um spezifisch funktionale Domänen der Proteine zu analysieren, welche potentiell mit der Interaktion zwischen Calmodulin bzw. BiP und dem Sec61-Komplex assoziiert sind. In analoger Weise wurde zudem ein Rettungsansatz mit dem BiP-Ortholog Kar2 aus der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt, um dessen mögliche Komplementation des humanen Proteins zu untersuchen. Als funktionale Assays wurden neben der Untersuchung der Zellviabilität, der UPR-Induktion und der ER-Morphologie als wichtigste Methoden zum einen der *in vitro* Proteintransport ins ER von siRNA-vorbehandelten semi-permeabilisierten HeLa-Zellen angewandt und zum anderen für die Analyse der Ca^{2+} -Homöostase auf die Methode des Ca^{2+} -„imaging“ (mit zytosolischen und ER-luminalen, fluoreszenzbasierten Ca^{2+} -Indikatoren) zurückgegriffen.

V. Material und Methoden

V.1. Material

V.1.1. Geräte

Hersteller:

Abimed, Düsseldorf

Applied Biosystems, Carlsbad, USA

Beckmann, München

Biorad, München

Duran, Mainz

Eppendorf, Hamburg

Fröbel Labortechnik, Wasserburg

GE Healthcare, Uppsala, Schweden

Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim

GFL[®], Burgwedel

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

Heraeus, Hanau

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Invitrogen, Darmstadt

Infors, Bottmingen, CH

Artikel:

Gilson-Pipetten

HT7900 System qRT-PCR Cycler

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

Trans-Blot[™] Electrophoretic Transfer Cell (Nass-Blot-Apparatur für SDS-Gele)

Laborglasflaschen 100 ml, 250 ml, 500 ml und 1.000 ml

Kühlzentrifuge 5415 R, Thermostat 5320,

Tischzentrifuge 5412 bzw. 5415 C/R,

Thermomixer 5320, 2 ml Reaktionsgefäße

Geltrockner, Wipptisch ROCKY[®], Sterilbank,

Speed-Vac (evaporator centrifuge CON-1000)

ImageQuant Software TL 1D Version 5.1, Image Scanner III, Storage Phosphor Screen

Exponierplatten 20 x 25 cm, Electrophoresis

Power Supply EPS 601, Typhoon Trio[™] (9410)

Fluoreszenz-Laserscanner

Sterilbank

Rotationsschüttler 3019

Zellkulturschalen Ø 3,5 cm, 6 cm und 10 cm, Gewebe- und Suspensionskultur-Flaschen 250 ml (75 cm²), 6 well-, 12 well-Zellkultur-Multiwellplatten

Rotationsschüttler

Trockenschrank T12, Inkubationsschrank

Brutschrank Hera cell 150

Pipetus[®]-akku Pipettierhilfe

„Countess[®] Automated Cell Counter“

Inkubationsschüttler

Isotherm KGW, Karlsruhe	Flüssigstickstoff-Behälter
Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau	Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO
Julabo, Seelbach	Wasserbad
Konrad Benda, Wiesloch	UV-Tisch N90 LW 366 nm
Liebherr, Ochsenhausen	Premium No Frost Gefrierschrank
Memmert und Co. KG, Schwabach	Brutschrank BE500, Trockenschrank UL50
Millipore Co., Bedford, USA	Immobilon-P Transfermembran (PVDF, Porengröße: 0,45 µm), Wasseranlage Milli-Q Plus 185
Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA	Storage Phosphor Screen 20 x 25 cm (Exponierplatten), Image Eraser SF (Exponierplatten-Löscher)
Nikon Instruments, Düsseldorf	Filterset (DAPI, FITC, TRITC, TexR), Nikon Eclipse TE 2000-S, Nikon Plan Fluor 10x/0,3 Objektiv, Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0,45 Objektiv, Nikon Plan Fluor 60x oil/1,25 Objektiv, NIS Elements F 2.30 Software, NIS Elements AR 3.0 Software
Neolab, Heidelberg	Deckglas (Ø 25 mm), Eisbad 1-6031
New Brunswick, Edison, USA	Galaxy 14 S CO ₂ Inkubator
Optik-Labor, Görlitz	Neubauer Zählkammer
Peqlab, Erlangen	NanoDrop [®] ND-1000 UV/Vis, PCR-Cycler Primus 96
Pharmacia Biotech, Freiburg	ImageMaster [®] VDS Geldokumentationssystem, MultiTemp II Durchlaufkühlgerät für Western- Blot, Spannungsgeräte EPS 3500, EPS 600, EPS 500/400 und EPS 200
Rapp OptoElectronic GmbH, Hamburg	UVICO Longlife UV/Vis lamp system
Roche, Mannheim	FuGENE HD, Lumi Imager F1
Sarstedt, Nürnberg	1,5 ml Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP61, BP4100, LA420, ED5201
Schleicher & Schüll, Dassel	Filterpapiere, Sterilfilter (0,2 µm)
Schütt, Göttingen	BIOCLAV (Autoklav)
Scientific Industries, Bohemia, USA	Vortex-Mixer (Genie 2 TM)
Sigma, Steinheim	Glasbeads
Systec GmbH, Wetztenberg	Autoklav DX-65

Thermo Scientific, Dreieich

Sterilbank MSC Advantage,
Gefriertruhe - 80 °C, HERAcell 150 i CO₂-
Inkubator, Nalgene® Bottle-Top Filtereinheit
(500 ml), Menzelgläser (geschliffen)

TILL photonics, Gräfeling

iMIC Mikroskop, Polychromator V,
TILLvisION Software

VWR, Darmstadt

Pasteur-Pipetten Glas 150 mm

Waters-Millipore, Milford, USA

Milliporewasseranlage Milli-Q

Werkstatt Biochemie 1, Göttingen

Elektrophoresekammern (Eigenbau)

Whatman GmbH, Dassel

Whatman FP30/0,2 CA-S rotrand (0,2 µm)

WTW, Weilheim

pH-Meter pH 537

Zeiss, Jena

Binokulares Mikroskop Axiolab für Hellfeld
Fluar 20x/0,75 M27 Objektiv (iMIC)

Ziegra, Isernhagen

Eismaschine

V.1.2. Chemikalien

Hersteller:

Artikel:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:

Nukleosidtriphosphate
(ATP, UTP, GTP, CTP)

Applied Biosystems, Carlsbad, USA

TaqMan® Gene Expression Assays

Biochrom AG, Berlin

Fetal Bovine Serum (FCS)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard

Calbiochem® (Merck, Darmstadt)

Digitonin, Tunicamycin, CHAPS

Carl Roth, Karlsruhe

LB- Medium (Lennox), Mowiol 4-88,
TB-Medium

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bacto Agar

Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz

„Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability
reagent“, Ophiobolin A

Fermentas, St.Leon-Rot

Pure Extrem Rapid DNA Ligation Kit,
O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Genomed, Löhne

Jetstar Plasmid Purification MIDI-Kit/50 2.0

GibcoBRL, Heidelberg

Agarose

GE Healthcare Uppsala, Schweden

ECL-Western Blot Detektionssystem

Invitrogen, Karlsruhe

ER-Tracker™ Blue-White DPX, Fura-2 AM,
Fluo-5N AM, Ionomycin, Gibco® DMEM,
Gibco® DMEM + GlutaMAX™-I, 10 x HBSS,

Merck, Darmstadt	OptiMEM [®] , 1 x PBS, Pluronic F-127, Thapsigargin
Millipore Co., Bedford, USA	DMSO, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, Essigsäure, Glycerin, Ethanol, Glycin, Kaliumchlorid, Magnesiumacetat, Methanol, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Nonidet P40 Fura-2 Calcium „imaging“ Calibration Kit (F-6774)
MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich	Trypsininhibitor (aus Sojabohne)
New England Biolabs	Bovine serum albumine (BSA)
PAA, Pasching, Österreich	Penicillin/Streptomycin 100 x, Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) in PBS 1 x [³⁵ S]-Methionin (1.000 Ci/mmol)
Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim	Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated L416A, RNasin [®] -Ribonukleaseinhibitor
Promega Biotec, Madison, USA	AllStars negative control siRNA, siRNA (Zielgene: <i>SEC61A1</i> , <i>BIP</i> , <i>PDI</i> , <i>GRP94</i> , <i>GRP170</i> , <i>CALRETIKULIN</i>), HiPerFect Transfektionsreagenz, Ni-NTA Magnetic Agarose Beads, Plasmid Mega Kit
Qiagen, Hilden	Aceton, Essigsäure, Kaliumacetat
Riedel de Haën, Hannover	ADP, 1,4-Dithiothreitol (DTT), RNase A, WST-1-Reagenz
Roche, Mannheim	Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Ethanol, Ethidiumbromid, Harnstoff, HEPES, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Saccharose, SDS, TEMED, Triton X-100,
Serva, Heidelberg	Ampicillin, Antipain, ATP-C ⁸ -Agarose, β-Mercaptoethanol, Bovines Serumalbumin (BSA), Calmidazolium-Chlorid, Calmodulin (aus Rinderhoden) Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII), Chymostatin, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI),
Sigma-Aldrich, Steinheim	

	Kanamycin, Leupeptin, PepstatinA, Phenoxybenzamin-Hydrochlorid, Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Poly-L-Lysin, Propylgallat, Puroymcin- Dihydrochlorid, Trifluoperazin-Dihydrochlorid, Tween-20
Tecan, Männedorf (CH)	Microplate Reader Infinite M200
Thermo Fisher Scientific, Dreieich	DMEM-LM (ohne Leucin und Methionin), PageRuler™ Prestained Protein Ladder, L-Photo-Leucin, L-Photo-Methionin, SMCC (Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl) Cyclohexan-1-Carboxylat)
TSI GmbH, Zeven	Sucofin Magermilchpulver

Alle weitere Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

V.1.3. Enzyme und sekundäre Antikörper

<i>Hersteller:</i>	<i>Artikel:</i>
AG, Schlenstedt (UdS)	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (mit Hexa-His-,tag ^{cc})
Calbiochem	Exotoxin A (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Fermentas	T4-Ligase, Restriktionsendonukleasen <i>BglIII</i> , <i>Eco91I</i> , <i>EcoRV</i> , <i>NheI</i> , <i>SacI</i> , <i>XbaI</i>
GE Healthcare Uppsala, Schweden	ECL™-Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5
Promega	T7-RNA-Polymerase
Invitrogen, Karlsruhe	Superscript® II Reverse Transkriptase
Qiagen, Hilden	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Maus-anti- Penta-His-IgG
Promega Biotec, Madison, USA	SP6 RNA-Polymerase, T7 RNA-Polymerase
Roche, Mannheim	Nuklease S7, Proteinase K, Trypsin
Sigma-Aldrich, Steinheim	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti- Kaninchen-IgG, Meerrettich-Peroxidase- gekoppelter Esel-anti-Schaf-IgG

V.1.4. Primäre Antikörper

Ein Großteil der verwendeten Antikörper wurde direkt am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes hergestellt. Es handelt sich überwiegend um Antikörper gegen Peptidkonjugate, welche aus dem Serum von Kaninchen gewonnen wurden. Die Immunisierung, Blutentnahme und Gewinnung der Seren erfolgte im Labor von Martin Jung. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt. Als Sekundärantikörper wurden die unter Punkt 1.3. aufgeführten Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Esel-anti-Schaf-, Ziege-anti-Kaninchen- und Ziege-anti-Maus-Antikörper sowie die Cy-Fluoreszenzfarbstoff-markierten ECL™ Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und ECL™ Plex Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy5 jeweils in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Als interner Standard für die Gesamtzellproteinmenge der Proben für die Western-Blot-Analyse wurde das Struktur- und Haushaltsprotein β -Aktin mit Hilfe des Maus-anti- β -Aktin-Antikörpers detektiert.

Tabelle 1: Auflistung aller in der Arbeit verwendeten primären Antikörper (UdS = Universität des Saarlandes).

Antikörper	Bezeichnung	Beschreibung	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
anti- β -Aktin	β -Aktin	Monoklonaler Antikörper gegen β -Aktin („Haushaltsprotein“ im Zytosol)	Maus	Sigma, Steinheim	1:5.000
anti-BiP	950/950*	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus von BiP (Hsp70 Chaperon im ER-Lumen) (* = mit verstärkendem Adjuvanz)	Kaninchen	UdS	1:500
anti-Calretikulin	Calret	Polyklonaler Antikörper gegen Calretikulin (Lektin-Chaperon im ER-Lumen)	Kaninchen	UdS	1.500
anti-Ces	Ces	Polyklonaler Antikörper gegen Leber-Caboxylesterase 1	Kaninchen	Abcam, Cambridge	1:1.000
anti-ERj3	ERj3	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus von ERj3 (lösliches Hsp40 Co-Chaperon im ER-Lumen)	Kaninchen	UdS	1:200
anti-GFP	GFP	Polyklonaler Peptidantikörper gegen GFP (grün fluoreszierendes Protein)	Kaninchen	UdS	1:1.000
anti-Grp170	ABP-150	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus von Grp170 (Hsp70-like Chaperon im ER-Lumen)	Kaninchen	UdS	1:500
anti-Grp94	Grp94	Polyklonaler Antikörper gegen Grp94 (Hsp90 Chaperon im ER-Lumen)	Kaninchen	UdS	1:500

anti-Kar2	Kar2	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den C-Terminus von Kar2 (Hsp70 Chaperon im ER-Lumen der Hefe)	Schaf	Manchester Universität	1:10.000
anti-Penta-His-HRP	His-POD	Antikörper gegen N-terminale, C-terminale und interne 6xHis-,tags“	Maus	Qiagen, Hilden	1:1.000
anti-Pdi	PDI	Polyklonaler Antikörper gegen Pdi (Protein-Disulfid-Isomerase im ER-Lumen)	Kaninchen	UdS	1:1.000
anti-Sec61 α	Sec61 α	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den C-Terminus der α -Untereinheit des Sec61-Komplexes (Proteintranslokase in der ER-Membran)	Kaninchen	UdS	1:200

V.1.5. Oligonukleotide

V.1.5.1. PCR-,„primer“

Bei PCR-,„primern“ handelt es sich um kurze DNA-Oligonukleotide, welche als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme in einer PCR eingesetzt werden. Die in Tabelle 2 aufgelisteten PCR-,„primer“ wurden entweder zur DNA-Sequenzierung eingesetzt (Eurofins MWG Operon Sequencing Department, Ebersberg) oder für die PCR-Amplifikation von cDNA verwendet. Letzteren wurden zudem Restriktionsschnittstellen angefügt, welche eine anschließende Klonierung ermöglichen (V.2.2.2; V.2.2.3).

Tabelle 2: Aufführung aller in dieser Arbeit verwendeten PCR-,„primer“ zur *in vitro* Amplifikation von DNA (Großbuchstaben = Sequenzen der „template“-DNA; Kleinbuchstaben = heterologe Nukleinsäuresequenzen; unterstrichen = Restriktionsschnittstellen; fett gedruckt = Start- oder Stopcodon).

Bezeichnung	Strang	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
RZ 139	+	AGTGGTGGCCACTAATGGAG	Sequenzierungsprimer für <i>BIP</i>
RZ 140	-	GGGGACAAACATCAAGCAGT	Sequenzierungsprimer für <i>BIP</i>
RZ 202	+	CCATGTTTCATGCCTTC	Sequenzierungsprimer für pAcGGSM2-IRES/GFP
RZ 203	-	GACAAACGCACACCG	Sequenzierungsprimer für pAcGGSM2-IRES/GFP
RZ 236	+	<u>gcgagctc</u> ATGATGAAGTTC ACTGTGGTGGCG	PCR-Primer zur Amplifikation von <i>BIP</i> -cDNA mit <i>SacI</i> -Restriktionsschnittstelle
RZ 318	-	cgcg <u>gctagc</u> CTACA ACTCATCTTTatggatgggtggtagtTTCTGATGTATCCTCTT CACCAGTTGGG	PCR-Primer zur Amplifikation von <i>BIP-6HIS</i> mit <i>NheI</i> -Restriktionsschnittstelle und Hexa-His-Sequenz

V.1.5.2. „small interfering“ RNA (siRNA)

Die folgende Tabelle 3 beinhaltet die in der Arbeit eingesetzten siRNA-Oligonukleotide. Eine genauere Beschreibung und Anwendung dieser Nukleinsäureklasse ist unter Punkt V.2.4.6.1 angegeben. Die gelieferten siRNA-Lyophilisate wurden in RNase-freiem H₂O_{bidest.} auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt, zu 50 oder 100 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide (UTR = untranslatierte Region).

Name	Zielgen (Organismus)	Sequenz („sense“-Strang)	Konzentration
<i>BIP</i>	<i>BIP</i> (<i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i>)	CCUUCGAUGUGUCUCUUCUtt	35 nM
<i>BIP</i> -UTR #1	UTR-Region von <i>BIP</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GCGGCUGUUUACUGCUUUUtt	10-35 nM
<i>BIP</i> -UTR #2	UTR-Region von <i>BIP</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GGGUGUGUGUUCACCUUCAtt	10 nM
<i>CALR</i> #1	<i>CALRETICULIN</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GUAUCUAUGCCUAUGAUAAtt	35 nM
<i>GRP94</i> #2	<i>GRP94</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GUUGAUGUGGAUGGUACAGtt	35 nM
<i>GRP170</i> #2	<i>GRP170</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GGAAAACACCGGUGAUCGUtt	35 nM
Kontroll siRNA	AllStar Negative Control (Qiagen)	-	10-35 nM
<i>PDI</i> #1	<i>PDI</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GGACGGUCAUUGAUUACAAtt	35 nM
<i>SEC61A1</i> #4	<i>SEC61A1</i> (<i>Homo sapiens</i>)	GGAAUUUGCCUGCUAAUCAtt	20 nM
<i>SEC61A1</i> -UTR #5	UTR-Region von <i>SEC61A1</i> (<i>Homo sapiens</i>)	CACUGAAAUGUCUACGUUUtt	20 nM

V.1.6. Plasmide

Diese ringförmige und autonom replizierende DNA dient in der Molekularbiologie der Überexpression gewünschter cDNA-Kopien von Genen und damit der gezielten Synthese bestimmter Proteine.

V.1.6.1. Plasmide zur Genüberexpression in Säugetierzellen

Für Zellkulturzwecke enthalten diese Plasmide sowohl Säugetier-spezifische Promotoren (z.B. der virale CMV-Promotor) als auch eukaryotische Replikationsursprünge. Zur Amplifikation der Plasmide in *E.coli*-Zellen (Punkt V.1.8) sind solche Plasmide zusätzlich mit einem bakteriellen Replikationsursprung („origin of replication“) sowie einem Resistenzgen zur Selektion ausgestattet. Über eine MCS (Multiple Klonierungstelle), die hinter dem Säugetierpromotor liegend aus einer beliebigen Anzahl

V. Material und Methoden

gängiger Restriktionsschnittstellen aufgebaut ist, können PCR-Amplifikate, wie unter V.1.5.1 beschrieben einkloniert werden. Die verwendeten Zellkulturplasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Plasmide zur Überexpression verschiedener cDNA-Kopien diverser eukaryotischer Gene in Säugetierzellen (Amp = Ampicillin-Resistenzgen; CMV = Zytomegalie-Virus; IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle; GFP = grün fluoreszierendes Protein; Kan = Kanamycin; * = Klonierung in den pcAGGSM2-*BIP*-IRES-GFP-Vektor, da *Eco911* im kodierenden Bereich von *BIP* spaltet).

Name	Beschreibung	Sequenzursprung	Resistenz	Promotor	Herkunft
pcAGGSM2-IRES-GFP	Vektor mit IRES-GFP-Sequenz	<i>Aequorea victoria</i>	Amp	CMV	Flockerzi, UdS
pcAGGSM2- <i>BIP</i> -IRES-GFP	<i>BIP</i> über <i>SacI</i> und <i>NheI</i> gerichtet kloniert	<i>Mus musculus</i>	Amp	CMV	S. Cappel, UdS
pcAGGSM2- <i>BIP</i> -His-IRES-GFP	Hexa-His-Sequenz wurde mittels PCR (RZ 318) angefügt	<i>Mus musculus</i>	Amp	CMV	Diese Arbeit
pcAGGSM2- <i>BIP</i> -R197E-IRES-GFP	<i>BIP</i> -R197E über <i>Eco911</i> und <i>XbaI/NheI</i> (kompatible Enden) gerichtet kloniert*	<i>Mus musculus</i>	Amp	CMV	Diese Arbeit
pcAGGSM2- <i>BIP</i> -R197H-IRES-GFP	<i>BIP</i> -R197H über <i>Eco911</i> und <i>XbaI/NheI</i> (kompatible Enden) gerichtet kloniert*	<i>Mus musculus</i>	Amp	CMV	Diese Arbeit
pcAGGSM2- <i>KAR2</i> -IRES-GFP	<i>KAR2</i> über <i>SacI</i> und <i>NheI</i> gerichtet kloniert	<i>S. Cerevisiae</i>	Amp	CMV	S. Cappel, UdS
pcDNA3-Neo-IRES-GFP	Vektor mit IRES-GFP-Sequenz	<i>Aequorea victoria</i>	Amp	CMV	U. Wissenbach, UdS
pcDNA3- <i>SEC61A1</i> -Neo-IRES-GFP	<i>SEC61A1</i> über <i>EcoRV</i> und <i>XhoI</i> gerichtet kloniert	<i>Homo Sapiens</i>	Amp	CMV	J. Benedix, UdS
pcDNA3- <i>SEC61A1</i> -R24A/K29A-Neo-IRES-GFP	pcDNA3- <i>SEC61A1</i> -Neo-IRES-GFP über „quick change“-PCR mutiert	<i>Homo Sapiens</i>	Amp	CMV	J. Dudek & M. Lerner, UdS
pEGFP-C3-CaM	<i>Calmodulin</i> über <i>SacI</i> und <i>KpnI</i> gerichtet kloniert	<i>Rattus norvegicus</i>	Kan	CMV	Betz, H., Max Planck Institut für Hirnforschung, Frankfurt

V.1.6.2. Plasmide und PCR-Produkte zur *in vitro* Synthese

Plasmide für die *in vitro* Synthese von Transportsubstraten (V.2.3) sind nicht obligatorisch mit Säugetierpromotoren und -replikationsursprüngen ausgestattet, enthalten aber die bakterienspezifische „ori“-Sequenz, ein entsprechendes Resistenzgen sowie einen hochaktiven Promotor, üblicherweise viralen Ursprungs (z.B. SP6 und T7), um große Mengen an mRNA zu synthetisieren. Die für eine *in vitro* Transkription verwendeten Plasmide und PCR-Produkte sind nachfolgend in Tabelle 5 gelistet.

Tabelle 5: Plasmide und PCR-Produkte zur *in vitro* Synthese diverser Transportsubstrate (AS = Aminosäuren; Amp = Ampicillin; CNR = Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italien; UCSF = University of California, San Francisco; UdS = Universität des Saarlandes; ¹ = PCR-Produkt).

Name	Beschreibung	Sequenzursprung	Resistenz	Promotor	Herkunft
pB4	Präprolaktin	<i>Bos taurus</i>	Amp	SP6	Peter Walter, UCSF
pB4-PvuII	Trunkiertes, 86 AS langes Präprolaktin (ppl ₈₆)	<i>Bos taurus</i>	Amp	SP6	UdS
pCA1-mut	Mutante von PräprocecropinA (Mutation von Ile44 und Ile45 jeweils zu Met) (ppcecA mut)	<i>Hyalophora cecropia</i>	Amp	T7	Gabriel Schlenstedt, Sven Lang, UdS
pcDNA3-ERj3	ER-Assoziiertes DnaJ Protein (pERj3)	<i>Homo sapiens</i>	Amp	T7	Johanna Dudek, UdS
pGEM4B5-op3	Modifiziertes ER-ständiges Cytochrom b5 (C-terminaler Opsin-Anhang mit N-Glykosylierungsstelle) (Cytb5)	<i>Homo sapiens</i>	Amp	SP6	Nica Borgese, CNR
Syb2-OPG ¹	Synaptobrevin2 (= VAMP2) (Syb2)	<i>Homo sapiens</i>	-	T7	Stephen High, University of Manchester
ppαF	Präpro-α-Faktor (ppαF)	<i>S. cerevisiae</i>	Amp	SP6	Toshi Endo, Nagoya

V.1.7. Zelllinien

Zur Durchführung von Experimenten auf zellulärer Ebene (z.B. „Ca²⁺-Imaging“) oder solche, die zumindest vorab lebende Zellen erforderten (wie die Manipulation der Genexpression gefolgt von der anschließenden Herstellung semi-permeabilisierter Zellen für eine *in vitro* Synthese von Proteinen), wurde die etablierte, humane Zelllinie HeLa (ATCC, Nr. CCL-2TM) verwendet. Bei diesen immortalisierten, adhären Zellen epithelialen Ursprungs handelt es sich um die ersten und damit ältesten Zellen, die erfolgreich *ex vivo* langfristig kultiviert werden konnten. Sie entstammen einer Gewebebiopsie des Gebärmutterhalses (*Cervix uteri*) einer 31-jährigen Afroamerikanerin, namens

Henrietta Lacks aus dem Jahre 1951, die an einem Adenokarzinom (einem *malignem* Tumor des Drüsengewebes) erkrankt war. HeLa-Zellen weisen zudem genomische Fragmente des humanen Papilloma Virus 18 (HPV-18) auf, welche über horizontalen Gentransfer übertragen wurden, sowie eine erhöhte Anzahl von Chromosomen, verglichen mit den Ausgangszellen. Diese Zahl beläuft sich auf durchschnittlich 82, wovon u.a. vier Kopien auf Chromosom 12 und jeweils drei auf Chromosom 6, 8 und 17 fallen (Macville *et al.*, 1999; Masters, 2002). Um Änderungen des Ca²⁺-Gehaltes des ER zu bestimmen wurde die viral transfizierte, stabile Zelllinie HeLa-CES2 verwendet, welche die cDNA einer ER-luminal dirigierten Carboxylesterase überexprimiert, um die Anreicherung von Acetoxymethylester-gekoppelten Substanzen in das Organell zu verbessern (Rehberg *et al.*, 2008). Eine detailliertere Erläuterung der Anwendung dieser Zellen wird unter V.2.6.3 beschrieben. Zur Kultivierung der HeLa-Zellen wurde DMEM + GlutaMAXTM-I verwendet. Das Medium wurde zusätzlich mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt. Die Zellen wurden in 75 cm² Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

V.1.8. Bakterienstämme

Zur Klonierung der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurden die transformationskompetenten *Escherichia coli*-Zellen der Stämme JM 101 (*pE thi-1Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqΔM15]*) oder XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*); Hersteller: Agilent Technologies) verwendet. Zur Amplifikation von Plasmiden für die Zellkultur wurde der Stamm DH5α (*F' φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) phoA, supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1*) benutzt. Die *E. coli*-Zellen wurden, wenn nicht gesondert angegeben, der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

V.1.9. Raue Mikrosomen

Raue Mikrosomen (RM) sind durch Präparation von bevorzugt sekretorischem Gewebe gewonnene, vesikuläre Fragmente des rauen ER, welche alle Bestandteile und Funktionen des Ausgangsorganells besitzen. Die in dieser Arbeit verwendeten RM wurden nach einer etablierten Methode aus Hundepankreas präpariert (Walter und Blobel, 1983a; Watts *et al.*, 1983). Die Konzentration der RM wird in eq (Äquivalent) angegeben. 1 eq ist dabei definiert als 1 µl einer RM-Suspension mit einer OD_{280nm} von 50. Die RM wurden vorwiegend für *in vitro* Experimente verwendet, um unter isolierten Bedingungen die Effizienz des Importes von Modellsubstraten ins ER zu testen (V.2.3.3). Außerdem wurden sie aufgrund der geringeren Vielfalt an Proteinen im Vergleich zu kompletten Zelllysaten und der damit reduzierten, potentiellen Kreuzreaktivität von Antikörpern, als Positivkontrolle bei der immunologischen Detektion von ER-Proteinen in der Western-Blot-Analyse verwendet (V.2.1.4; V.2.1.5).

V.2. Methoden

V.2.1. Biochemische Analysemethoden

V.2.1.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen in Abhängigkeit des Molekulargewichtes der einzelnen Proteine/Polypeptide wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, eine analytische Methode, welche auf einem von Ulrich K. Laemmli 1970 entwickelten Verfahren basiert (Laemmli, 1970). Die zu untersuchenden Proteine werden hierbei zunächst in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, welcher unter anderem das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Mit seiner langkettigen Alkylgruppe (C₁₂) ist es in der Lage die hydrophoben Aminosäurereste von Proteinen/Polypeptiden zu binden, welche zuvor durch Hitzedenaturierung (entweder 15 min bei 56 °C oder 5 min bei 95 °C) exponiert wurden. Ein Molekül SDS kann dabei pro zwei Aminosäurereste mit einem Protein/Polypeptid assoziieren. Zudem enthält der Probenpuffer ein starkes Reduktionsmittel wie β-Mercaptoethanol, wodurch sowohl intra- als auch intermolekulare Disulfidbrücken der Proteine getrennt werden, was eine weitere Denaturierung bewirkt. Durch die Sulfatgruppe des SDS wird allen Proteinen/Polypeptiden eine negative Ladung verliehen, wobei letztlich die Anzahl angelagerter SDS-Moleküle im Verhältnis zur Masse der Proteine/Polypeptide steht. Folglich wird die Auftrennung dieser Komplexe im elektrischen Gleichspannungsfeld, und somit deren Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel, lediglich durch deren Masse bestimmt (Weber und Osborn, 1969). Aufgrund der porenartigen Struktur des Gels ist die Beweglichkeit dieser Analyten umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes, wodurch Proteinen/Polypeptide geringer Masse in einem bestimmten Zeitintervall schneller wandern als jene mit einem höheren Molekulargewicht (Andrews, 1986; Dwyer, 1993).

Für die SDS-PAGE wurden stets diskontinuierliche Polyacrylamidgele verwendet, bestehend aus einem kurzen Sammelgel mit niedriger Acrylamidkonzentration und geringerem pH-Wert, welches auf ein langes, höher prozentiges Trenngel mit höherem pH-Wert gegossen wurde. In dem weitporigeren Sammelgel werden die SDS-Protein-Komplexe zuerst am Übergang zum Trenngel konzentriert, in welchem sie dann entsprechend ihres Molekulargewichtes getrennt werden. Die Kombination dieser beiden Geltypen erhöht somit die Trennschärfe des Gels. Je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine wurde der Anteil an Polyacrylamid im Trenngel zwischen 10 und 17,5 % variiert. Die stets vertikalen Polyacrylamidgele, mit einer Gesamtgröße von 14 x 11 x 0,1 (Breite x Höhe x Dicke in cm), wurden entsprechend dem Schema in Tabelle 6 zwischen zwei durch Platzhalter getrennte Glasplatten pipettiert. Zum Abdichten der Platten wurde zuvor ein etwa 1 cm hohes 2 %-iges Agarose-Bodengell gegossen. Nach Einspannen in eine entsprechende Elektrophoresekammer, wurden die Kathoden- und die Anodenkammer jeweils mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Alle aufzutrennenden Proben wurden in dafür vorgegossene Aussparungen im Sammelgel pipettiert. Zur Bestimmung der

V. Material und Methoden

Größe von Proteinen wurde als Standard entweder „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“ oder „Kaleidoscope™ Prestained Protein Standard“ verwendet. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte schließlich bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA über ca. 3 h oder bei 6 mA über Nacht.

Tabelle 6: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Trenngelkonzentrationen (10-17,5 %)

Lösungen	Trenngel				Sammelgel
Acrylamidkonzentration	10 %	12,5 %	15 %	17,5 %	5 %
40 % (w/v) Acrylamid (ml)	3,75	4,69	5,63	6,56	0,9
2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	1,00	1,25	1,50	1,76	0,24
H ₂ O _{bidest.} (ml)	4,05	2,86	1,67	0,48	5,01
1,875 M Tris/HCl pH 8,8 (ml)	6				-
1 M Tris/HCl pH 6,8 (ml)	-				0,9
10 % (w/v) SDS (μl)	150				72
TEMED (μl)	5				10,5
20 % (w/v) AMPS (μl)	45				67,5
Gesamtvolumen (ml)	15				4,8

Lämmli-Probenpuffer:

Tris/HCl, pH 6,8	60 mM
Glycerin	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Elektrophoresepuffer:

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

V.2.1.1.1. Harnstoff-SDS-PAGE

Zur Auftrennung sehr kleiner Proteine unter einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa wurden sogenannte Harnstoff-Polyacrylamidgele verwendet. Sie zeichnen sich durch eine besonders hohe Acrylamidkonzentration von 19,4 % sowie den Zusatz von Harnstoff aus. Hierbei wird sich die besonders hohe Hygroskopizität des Harnstoffs zu Nutze gemacht, welche die Gelstabilität erhöht. Darüber hinaus besitzt der Harnstoff als chaotrope Substanz die Eigenschaft Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des proteinumgebenden Wassers zu stören. Durch diese Entropieerhöhung wird die, das Protein stabilisierende, Käfigstruktur des Wassers gestört, was letztlich zu einer, von der SDS-

V. Material und Methoden

Wirkung unabhängigen, weiteren Denaturierung der Makromoleküle führt (Ito *et al.*, 1980). Die Gele wurden nach dem in Tabelle 7 angegebenen Pipettierschema hergestellt, entsprechen aber im Übrigen, was Aufbau und Größe betrifft, den unter Punkt V.2.1.1 beschriebenen Kriterien. Als Laufpuffer wurde der unten aufgeführte Elektrophoresepuffer (Urea) verwendet, der im Gegensatz zum oben genannten Puffer weniger Glycin enthält. Aufgrund des erhöhten Widerstandes, den der Harnstoff auf das System ausübt, wurde diese Form der Elektrophorese zudem lediglich bei einer Stromstärke von 20 mA für 6-8 h durchgeführt, um eine Überhitzung der Apparatur zu vermeiden. Ferner wurden die Gele auch wahlweise wie unter V.2.1.1 über Nacht bei 6 mA laufen gelassen.

Tabelle 7: Pipettierschema zur Herstellung von Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelen.

Lösungen	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidkonzentration	19,4 %	5 %
Harnstoff (g)	5,88	1,80
60 % (w/v) Acrylamid/ 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	5,25	0,42
1,875 M Tris/HCl; pH 8,8 (ml)	6,50	-
1 M Tris/HCl; pH 6,8 (ml)	-	0,63
H ₂ O _{bide} st. (ml)	-	2,60
10 % (w/v) SDS (µl)	160	50
TEMED (µl)	6	5
10 % (w/v) AMPS (µl)	55	25
Gesamtvolumen (ml)	11,97	3,73

Elektrophoresepuffer (Urea)

Tris/HCl	50 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

V.2.1.2. Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proteinen

Um die Proteine sichtbar zu machen, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden (V.2.1.1), wurde eine Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung (CCB) durchgeführt (Bennett und Scott, 1971). Hierbei lagern sich die Coomassie-Farbstoffe an basische Aminosäurereste der Proteine (Lysin, Arginin).

Zu färbende Polyacrylamidgele wurden zunächst für 20-30 min in der CCB-Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Gelbereiche ohne Proteine wieder entfärbt, indem zuerst mit Entfärbter 1 dreimal für 10 min und anschließend mit Entfärbter 2 für mehrere Stunden inkubiert wurde. Zur quantitativen

Bestimmung der Intensität der Proteinfärbung wurde bei Bedarf eine Densitometrie (V.2.1.7) durchgeführt. Eine Konservierung des gefärbten Gels erfolgte durch 30-minütiges Einlegen in einer 5 %-igen Glycerinlösung und nachfolgendem Trocknen zwischen Zellophanfolie.

CCB -Färbelösung

Coomassie-Brillant-Blue R 250	0,2 % (w/v)
Coomassie-Brillant-Blue G 250	0,005 % (w/v)
Methanol (techn.)	50 % (v/v)
Eisessig (techn.)	10 % (v/v)

Entfärber 1

Methanol (techn.)	50 % (v/v)
Eisessig (techn.)	10 % (v/v)

Entfärber 2

Methanol (techn.)	10 % (v/v)
Eisessig (techn.)	5 % (v/v)

V.2.1.3. Sensitive Färbung von Proteinen mit kolloidalem Coomassie (G-250)

Zur Färbung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine, die anschließend für eine massenspektrometrische Analyse isoliert werden sollten, wurde eine Färbung mit kolloidalem Coomassie (G-250) durchgeführt. Im Wesentlichen unterscheidet sich diese Färbung von der konventionellen CCB-Färbung insbesondere durch die höhere Sensitivität. Das Färbeprotokoll basiert auf einer von Candiano und Mitarbeitern beschriebenen Methode, die sie selbst als „blue silver“-Färbung bezeichneten (in Anlehnung an die typischerweise sensitivere Silberfärbung). Mit einer Detektionsgrenze von 1-5 ng Protein liegt die Empfindlichkeit dieser Variante deutlich höher als die der üblichen CBB-Färbung (ca. 100 ng). Somit können auch sehr geringe Proteinmengen, wie etwa das Produkt einer Proteinquervernetzung, nachgewiesen werden (V.2.1.11). Zudem ist der CCB-Farbstoff G-250, der im Vergleich zur konventionellen CCB-Färbelösung höher konzentriert vorliegt, geeignet für eine nachfolgende Massenspektrometrie-Analyse, da er reversibel bindet. Der Hauptbestandteil der Standard-CCB-Färbelösung, die CBB-Form R-250, bindet hingegen kovalent an Proteine und verhindert somit die erforderliche Elution der Proteine aus dem Polyacrylamidgel (Candiano *et al.*, 2004). Alle Materialien für die Durchführung der Gelelektrophorese (V.2.1.1) und die nachfolgende Färbung mit kolloidalem Coomassie, die in direktem Kontakt mit dem Polyacrylamidgel standen, wurden zuvor mit 1 M

V. Material und Methoden

Natriumhydroxid (NaOH) gereinigt um potentielle Proteinkontaminationen für die anschließende massenspektrometrische Analyse zu minimieren. Außerdem wurden zu diesem Zweck das Trenn- sowie das Sammelgel zuvor filtriert. Im Gegensatz zur üblichen Prozedur, wurde anstelle von Agarose ebenfalls zuvor filtriertes Polyacrylamid zum Gießen des Bodengels verwendet (Tabelle 8). Nach der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel mit der Coomassie-Lösung überschichtet, welche zuvor nochmals sorgfältig durchmischt wurde, und dann auf einem Rotationsschüttler gefärbt. Die Färbung erfolgte je nach Bedarf 1-7 Tage. Falls erforderlich, wurde das Gel nach der Färbung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ für 10-60 min entfärbt.

Tabelle 8: Pipettierschema zur Herstellung eines Acrylamid-Bodengels.

Lösungen	Bodengel
30 % (w/v) Acrylamid/ 0,2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	26,7
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ (ml)	12,6
10 % (w/v) SDS (μl)	400
TEMED (μl)	100
10 % (w/v) AMPS (μl)	200
Gesamtvolumen (ml)	40

Färbelösung

Coomassie-Brillant-Blue G-250	0,02 % (w/v)
Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat	2 % (w/v)
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	2 % (w/v)
Ethanol (techn.)	10 % (v/v)

Es ist wichtig, dass bei der Herstellung der Färbelösung die folgende Reihenfolge eingehalten wird. Zuerst wird das Aluminiumsulfat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst. Danach wird der Ethanol hinzugegeben und anschließend das CBB G-250. Zum Schluss wird die Phosphorsäure hinzugefügt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgefüllt.

V.2.1.4. Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Um Proteine nach einer Auftrennung mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) für weitere Methoden wie eine immunologische Detektion (V.2.1.5) zugänglich zu machen wurden diese auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert, ein Verfahren das auch als Western-Blot bezeichnet wird.

Im Gegensatz zur PAGE verläuft der Stromfluss beim Western-Blot senkrecht zum Polyacrylamidgel, wodurch die Proteine aufgrund des direkten Kontaktes zur PVDF-Membran auf diese transferiert werden und letztlich über hydrophobe Assoziationen und polare Wechselwirkungen immobilisiert werden. Somit bleibt die Verteilung der Proteine durch die elektrophoretische Auftrennung stabil erhalten (Renart *et al.*, 1979; Southern, 1975).

Der Elektrotransfer wurde stets als sogenannter Nass-Blot durchgeführt, wofür das Tank-Blot-System „Trans-Blot™ Cell“ (Bio-Rad) verwendet wurde. Hierfür wurde vorbereitend eine PVDF-Membran mit einer standardmäßigen Porengröße von 0,45 µm in Methanol eingelegt, um das hydrophobe Material für wässrige Lösungen zugänglich zu machen. Nach zweimaligem Spülen in destilliertem Wasser wurde die Membran in Transferpuffer äquilibriert. Das System wurde wie folgt zusammengebaut. In eine entsprechende Plastikhalterung wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei auf das ebenfalls etwa 5 min äquilibrierte Polyacrylamidgel aufgelegt. Diese wurden wiederum erst zwischen zwei puffergetränkte Filterpapiere und dann in zwei Schwämme gepackt. Die geschlossene Plastikhalterung wurde anschließend in die bereits mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer eingesetzt, so dass das Gel zur Kathode (positiver Pol) und die PVDF-Membran zur Anode (negativer Pol) zeigten. Der Transfer der SDS-Proteinkomplexe aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 15 °C für 3 h oder über Nacht mit einer konstanten Stromstärke von 400 mA.

Transferpuffer

Glycin	96,0 mM
Tris/HCl	12,4 mM

V.2.1.5. Immunologische Detektion von Proteinen

Das Verfahren der immunologischen Proteindetektion beruht auf der Verwendung spezifischer Antikörper, welche über ihre Antigenbindungsregion (Paratop) komplementäre Epitope hochaffin binden können. Durch Injektion eines gewünschten Antigens (Antikörpererzeugende Substanz) in ein geeignetes Tier (z.B. Maus, Kaninchen), also durch eine sogenannte Immunisierung, können gezielt polyklonale Antiseren gegen bestimmte Proteine produziert werden, die je nach Bedarf noch zusätzlich affinitätsgereinigt oder sogar zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden können. Die Detektion einer solchen Antikörperbindung erfolgt in der Regel mit einem Immunkonjugat, einem an die Fc-Region („fragment crystallizable“) des Primärantikörpers bindenden sekundären Antikörper, der an ein Reportermolekül, wie beispielsweise ein Enzym oder ein Fluoreszenzfarbstoff, gekoppelt ist. In gesonderten Fällen kann das Reportermolekül auch direkt an den primären Antikörper gebunden sein (Tabelle 1). Durch diese Methode ist es möglich sowohl quantitativ (Vergleich der Proteinmengen verschiedener Proben; siehe hierzu V.2.1.7) als auch qualitativ (Verändertes Molekulargewicht durch Modifikationen wie Spaltung oder Glykosylierung) eine Aussage über Proteine von Interesse zu treffen.

V. Material und Methoden

Nach dem Elektrotransfer (V.2.1.4) wurde die PVDF-Membran zunächst in einer Blockierlösung ca. 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde der gewünschte primäre Antikörper, welcher zuvor in Blockierlösung verdünnt wurde (V.1.4, Tabelle 1), entweder für 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C hinzugegeben. Die Membran wurde daraufhin kurz mit Waschpuffer abgespült und dann zweimal 5 min in Waschpuffer mit Triton X-100 sowie einmal 5 min mit Waschpuffer geschwenkt. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde ein Sekundärantikörper mit kovalent gekoppelter Meerrettich-Peroxidase oder einem entsprechend gebundenen Fluorophor eingesetzt, welcher ebenfalls in Blockierlösung verdünnt wurde (V.1.3). Im Fall von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern wurde die PVDF-Membran direkt nach Beendigung des letzten Waschschruttes mit 4 ml eines Gemisches aus zwei Lösungen zu je 50 % des ECL-Detektionskits („luminol/enhancer“ und „stable peroxide buffer“) der Firma Pierce überschichtet und in eine durchsichtige Folie gepackt. Die durch die enzymatisch katalysierte Umsetzung des ECL-Substrates freigesetzten Photonen (Chemilumineszenz) wurden mit Hilfe des Lumi Imager F1 detektiert. Der Nachweis von Proteinen über Fluorophor-gekoppelte sekundäre Antikörper erfolgte direkt durch Einscannen der getrockneten PVDF-Membran mit Hilfe des Typhoon Trio™ Scanners. Während für die meisten Schritte Tris-gepufferte Lösungen verwendet wurden, erfolgten bei einem fluoreszenzbasierten Nachweis des Primärantikörpers alle Schritte nach dem ersten Antikörper analog auf der Basis von Phosphat-Puffer sowie BSA in der Blockierlösung anstelle von Magermilchpulver.

Waschpuffer (TBS)

Tris/HCl, pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM

Waschpuffer (TBS) + Triton X

TBS + 0,05 % (v/v) Triton X-100

Waschpuffer (PBS)

Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaH ₂ PO ₄	2,3 mM
NaCl	155 mM

Waschpuffer (PBS) + Triton X

PBS + 0,05 % (v/v) Triton X-100

pH 7,4 mit NaOH einstellen

Blockierlösung (PBS)

BSA in PBS 3 % (w/v)

Antikörperlösung

Blockierlösung mit Antikörper
(Verdünnung: siehe Tabelle 1)

Blockierlösung (TBS)

Magermilchpulver in TBS 3 % (w/v)

V.2.1.6. Autoradiographie mittels „phosphorimaging“

Zum Nachweis radioaktiv markierter Proben wurde das sogenannte „phosphorimaging“ (Radioluminografie) durchgeführt, eine moderne Variante der Autoradiographie. Die hierbei verwendeten Exponierplatten bieten nicht nur eine deutlich erhöhte Sensitivität im Vergleich zu konventionellen Röntgenfilmen, sondern liefern darüber hinaus eine besonders gute Signallinearität über einen weiten Detektionsbereich (Kaneke *et al.*, 1995), was die Quantifizierbarkeit verbessert. Das Kunststoffmaterial der Exponierplatten ist mit kleinen Kristallen besetzt, welche aus BaFBr:Eu²⁺ (Bariumfluorobromid mit einem Strang bivalentem Europium als Lumineszenz-Zentrum) bestehen. Durch Emission der radioaktiven Probe wird das bivalente Europium (Eu²⁺) zu trivalentem Eu³⁺ oxidiert, welches sich damit in einem metastabilen Anregungszustand befindet. Zum Auslesen dieser gespeicherten Energie wird die Platte erneut mit Hilfe eines Lasers (630 nm) angeregt, wodurch Eu³⁺ wieder zu Eu²⁺ reduziert und die freiwerdende Energie in Form von Photonen (390 nm) freigesetzt wird, welche letztlich in ein digitales Signal umgewandelt werden kann. Das „phosphorimaging“ wurde in dieser Arbeit verwendet, um *in vitro* synthetisierte, radioaktiv markierte Proteine vor oder nach deren Import in raue Hundepankreas-mikrosomen oder das ER semi-permeabilisierter HeLa-Zellen (V.2.3.2) nachzuweisen, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden (V.2.1.1). Hierzu wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten [³⁵S]-Methionin-markierten Proteinen zunächst 15 min in Entfärber 1 fixiert (V.2.1.2) und dann zur Neutralisation 30 min in Neutralisationslösung inkubiert. Danach wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt, mit einer Folie abgedeckt und auf einem Gelrockner bei 90 °C unter Vakuum ca. 1 h getrocknet. Zur Detektion der Radioaktivität wurde das getrocknete Gel zunächst auf eine Exponierplatte („storage phosphor screen“, Molecular Dynamics) gelegt und in Abhängigkeit der Stärke der emittierten β -Strahlung zwischen 2 h und 3 Wochen gelagert. Nach entsprechender Expositionsdauer wurde die Platte anschließend mittels Typhoon TrioTM Scanner ausgelesen und die erhaltenen digitalen Signale mittels Densitometrie ausgewertet (V.2.1.7).

Neutralisationslösung

Methanol (techn.)	50 % (v/v)
Glycerin	1 % (v/v)

V.2.1.7. Densitometrie

Als Densitometrie wird die quantitative Bestimmung der Farbdichte, also der Farbmenge pro Flächeneinheit, bezeichnet. Zur Quantifizierung der Signalintensität Fluoreszenz- oder Chemilumineszenz-basierender Sekundärantikörper (V.2.1.5), der Radiolumineszenz (V.2.1.6) oder Coomassie-Brilliant-Blue gefärbter Proteinbanden (V.2.1.2) wurde die ImageQuant Software TL 1D (Version 5.1) verwendet. Die Signalstärken wurden je nach Methode und Fragestellung mit Hilfe der Software Excel 2007 (Microsoft) entsprechend untereinander verglichen und graphisch dargestellt.

V.2.1.8. Proteinkonzentrationsbestimmungen

V.2.1.8.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur einfachen und schnellen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet. Das Gerät ermöglicht neben Absorptionsmessungen von Lösungen verschiedener Stoff- und Molekülklassen die Konzentrationsbestimmung sehr geringer Flüssigkeitsvolumina im Mikroliterbereich. Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, was insbesondere dem Absorptionsbereich aromatischer Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan entspricht. Die Proteine wurden für eine reproduzierbare Quantifizierbarkeit 1:20 in 2 % SDS verdünnt, um diese zu denaturieren und somit die Aminosäuren aller Proteine gleichermaßen zu exponieren.

V.2.1.8.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BSA-Reihe

Zur präziseren Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung bekannter Konzentration sowie eine Verdünnungsreihe einer Proteinlösung von Interesse zusammen mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt (V.2.1.2) und densitometrisch ausgewertet (V.2.1.7). Die Signalintensitäten der Proteinbanden der BSA-Reihe wurden jeweils gegen die zugehörigen Proteinmassen in ein Diagramm aufgetragen und eine Regressionsgerade sowie deren Steigung ermittelt. Durch Einsetzen der Signalintensitäten der Proteinlösung mit unbekannter Konzentration in diese Steigungsformel wurde die Proteinmasse der jeweiligen Volumina und daraus die Konzentration der korrespondierenden Stocklösung berechnet. Analog wurde zur Bestimmung der Konzentration eines Proteins in einem Proteingemisch (z.B. Zellysate) eine Proteinlösung mit dem entsprechenden, gereinigten Protein mit bekannter Konzentration als Standard mit sowie das Proteingemisch jeweils in Form einer Verdünnungsreihe mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert (V.2.1.4) und immunologisch analysiert (V.2.1.5). Wie oben beschrieben wurde auch hier eine Steigung aus den Intensitätssignalen und den entsprechenden Massen berechnet und damit die unbekannte Konzentration des Proteins im Proteingemisch ermittelt.

V.2.1.9. Präzipitation His-„getaggtter“ Proteine mittels Ni²⁺-Magnet-Agarose

Zur biochemischen Untersuchung von *in vitro* Interaktionen zwischen Proteinen wird häufig die als „pull-down“ bezeichnete Form der Co-Präzipitation angewendet, welche eine Abwandlung der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) ist. Beide Methoden beruhen auf dem Prinzip der hochaffinen Bindung eines an einer Matrix (z.B. quervernetzte Agarose oder Dextran) immobilisierten Moleküls an einen spezifischen Teil eines Proteins bzw. Fusionsproteins. Wird angenommen, dass ein Protein innerhalb der Zelle mit einem oder mehreren bestimmten Proteinen interagiert, können unter geeigneten

Bedingungen ebenfalls solche Interaktionspartner mit gebunden und letztlich präzipitiert werden. Während bei der Co-IP Antikörper gegen native Epitope des Zielproteins an der Matrix immobilisiert werden bedient sich der „pulldown“ im allgemeinen Fusionsproteine, die mit einem N- oder C-terminalen „tag“ versehen wurden. Dabei handelt es sich um meist um relativ kleine Proteinsequenzen (z.B. Hexa-Histidin oder Glutathion-S-Transferase), welche spezifisch an bestimmte Substanzen (Nickelionen oder Glutathion) mit hoher Affinität binden. Dies erklärt zugleich einen weiteren, noch entscheidenderen Unterschied zur Co-IP, und zwar den Verzicht auf Antikörper. Denn eine der größten Herausforderungen einer Co-IP ist die Herstellung geeigneter, präzipitierender Antikörper. Die Verwendung von „tags“ umgeht diese Problematik, da der selbe effiziente „tag“ für eine Vielzahl verschiedener Proteine benutzt werden. Der Nachteil ist, dass das native Protein durch die Fusion verändert wird, was die Aussagekraft der Methode mindert, da so möglicherweise auch unnatürliche, falschpositive Interaktionen resultieren (Gilead *et al.*, 1976; Phizicky und Fields, 1995). Als Matrix für Präzipitationen wurde in dieser Arbeit Ni²⁺-NTA Magnetagarose verwendet. Diese hat gegenüber nicht-magnetischer Agarose den Vorteil, dass auf Zentrifugationsschritte verzichtet werden kann und daher, durch die verminderte physikalische Belastung, die Integrität insbesondere fragiler Proteinkomplexe erhalten bleibt. Die Metall-chelatierenden Nitrilotriessigsäuregruppen (NTA), die kovalent an der Oberfläche der Agarose-Kügelchen immobilisiert sind binden mehrwertige Metallionen wie Ca²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ oder Fe³⁺. Die Ni²⁺-NTA Magnetagarose-Kügelchen (Quiagen) sind bereits mit Ni²⁺ beladen was eine Reinigung Hexa-Histidin-„getaggtter“ Proteine erlaubt (Abbildung 7, A).

Für ein „pulldown“-Experiment wurden HeLa-Zellen (V.1.7) 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Zellen einer Konfluenz von etwa 70-80 % (exponentielle Wachstumsphase) wurden mittels Trypsin/EDTA abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und ausgezählt. Für einen Ansatz wurden mehrere 6 cm Zellkulturschalen verwendet, in welche jeweils 6,4 x 10⁵ HeLa-Zellen (V.1.7) ausgesät wurden. Die Zellzahl wurde hierfür auf 1,6 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt und 4 ml dieser Suspension in jeweils eine Zellkulturschale pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem Plasmid pcAGGSM2-BIP-His-IRES-GFP transfiziert (V.2.4.6.2) und weitere 48 h kultiviert. Die Zellen wurden nach erfolgter Plasmidexpression geerntet und in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vereint. Nachdem diese ausgezählt wurden folgte eine Zentrifugation (5 min bei 1.000 rpm und 4 °C). Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Zellen in „pulldown“-Lysepuffer (Tabelle 9) aufgenommen (10.000 Zellen/μl) worauf diese für 30 min auf Eis lysiert wurden. Das Zelllysate wurde zur Entfernung von Debris nochmals 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und 100 μl des Überstandes für die spätere SDS-PAGE entnommen. Pro 1 x 10⁷ Zellen wurde 100 μl Ni²⁺-NTA Magnetagarose-Suspension verwendet. Zur Immobilisierung der Ni²⁺-NTA Magnetagarose-Kügelchen und die Entnahme des Überstandes wurde das verwendete Reaktionsgefäß im Folgenden immer in einen Magnetständer eingesetzt. Um die Magnetagarose zu äquilibrieren, wurde der Lagerungspuffer entfernt und die Kügelchen zweimal 5 min in 1 ml „pulldown“-Lysepuffer gewaschen. Das vorbereitete Zelllysate wurde auf die Ni²⁺-NTA Magnetagarose-Kügelchen gegeben und

V. Material und Methoden

das Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C gerollt. Am folgenden Tag wurde der Überstand entnommen und 200 µl davon für die Elektrophorese gesammelt. Die Ni²⁺-NTA Magnetagarose wurde zweimal 5 min bei RT mit 100 µl „pulldown“-Lysepuffer gewaschen und die Waschschritte ebenfalls für die spätere Analyse gesammelt. Zur Elution von gebundenem BiP-His wurden die Kügelchen zweimal mit 30 µl Elutionspuffer (Tabelle 9) für jeweils 5 min bei RT überschichtet und zwischendurch mehrfach geschüttelt. Durch die im Elutionspuffer enthaltene hohe Konzentration an Imidazol, welches mit den Histidinresten des Protein-,tags“ um die Bindung an die Nickelionen kompetiert, werden die Hexa-His-Fusionsproteine wieder von der Matrix abgewaschen. Die Überstände aller Schritte wurden letztlich mit Lämmli-Probenpuffer versetzt (V.2.1.1) und bei 56 °C für 15 min erhitzt. Zum Nachweis des präzipitierten Proteins wurde entweder eine Coomassie-Färbung des Polyacrylamidgels oder eine Immundetektion nach Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran durchgeführt (Abbildung 7, B und C). Dabei wurden im Fall des Zelllysats, des Überstandes und des Waschschrittes stets Volumina aufgetragen die einer ausgehenden Zellzahl von 5 x 10⁵ entsprachen. Das Eluat hingegen wurde immer vollständig eingesetzt (5-15 x 10⁶ Zellen). Um potentielle Interaktionspartner des präzipitierten Proteins zu identifizieren erfolgte eine Immundetektion mit Hilfe von Antikörpern gegen das Protein von Interesse, wobei auf das Vorhandensein entsprechender Banden in der Eluatspur geachtet wurde.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für den „pulldown“ His-,„getaggt“ Proteine.

Bestandteile	„pulldown“-Lysepuffer	Elutionspuffer
HEPES, pH 7,5	20 mM	20 mM
KCl	150 mM	150 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
ADP	1 mM	1 mM
EDTA, pH 7,0	1 mM	1 mM
CHAPS	0,65 % (w/v)	0,65 % (w/v)
PMSF	1:1.000	1:1.000
PLAC	1:10.000	1:10.000
Imidazol	10 mM	250 mM

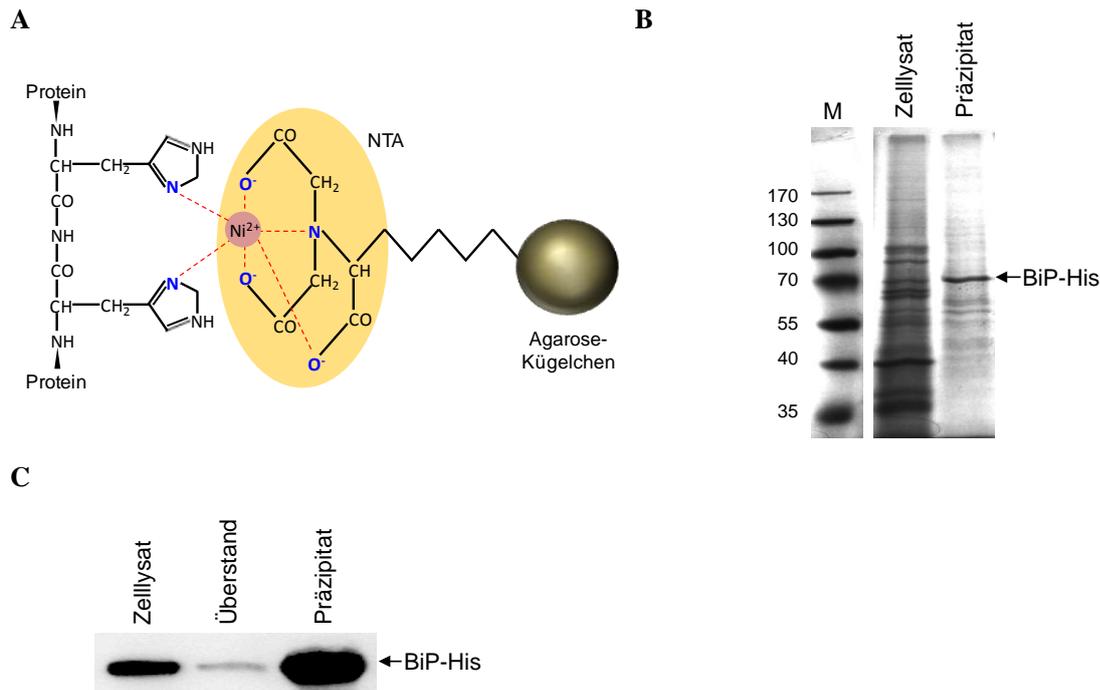


Abbildung 7: Prinzip des „pulldowns“ mittels Ni^{2+} NTA Magnetagarose. **A)** Schematische Darstellung des Aufbaus der NTA Magnetagarose mit chelatiertem Nickelion, gebunden an zwei Histidinreste eines Proteins. **B)** „pulldown“ des C-terminal 6xHis-,getaggten“ BiP-Proteins und anschließende SDS-PAGE und Färbung mittels kolloidalem Coomassie (V.2.1.3) (Zellysat \cong 500.000 Zellen; Präzipitat \cong 5.000.000 Zellen) **C)** Vergleichbarer Versuchsaufbau wie in (B) jedoch mit anschließendem Western-Blot und Immundetektion mittels anti-Penta-His-HRP-Antikörper (Tabelle 1) und ECL (Zellysat \cong 500.000 Zellen; Überstand \cong 500.000 Zellen; Präzipitat \cong 5.000.000 Zellen). M = Marker.

V.2.1.10. Präzipitation ATP-bindender Proteine mittels ATP-C⁸-Agarose

Analog zur unter Punkt V.2.1.9 beschriebenen Prozedur können bestimmte Proteingruppen aus einem Zellysat auch basierend auf deren spezifischen Bindungseigenschaften an biologische Moleküle, unabhängig von Antikörpern sowie der Notwendigkeit einer „tag“-Fusion, präzipitiert werden. Neben der Möglichkeit das aus der Riesenbohne (*Canavalia ensiformis*) isolierte Lektin Concanavalin A zur spezifischen Bindung glykosylierter Proteine zu verwenden (Agrawal und Goldstein, 1965; Sumner und Howell, 1936) kann auch ATP, welches kovalent über das γ -Phosphat an eine Agarose-Matrix gebunden vorliegt, zur Präzipitation ATP-Bindender Proteine herangezogen werden. Zu solchen Polypeptiden gehören beispielsweise Kinasen oder auch Hitzeschockproteine. Entsprechende „pulldown“-Experimente wurden mit Hilfe von ATP-C⁸-Agarose (Sigma) gemäß einem nach Dierks *et al.* modifizierten Protokoll durchgeführt (Dierks *et al.*, 1996).

Zur Präzipitation von Proteinen mittels ATP-C⁸-Agarose wurden HeLa-Zellen (V.1.7) 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Am Folgetag, bei einer Konfluenz von ca. 70-80 %, wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und ausgezählt. Die Zellen wurden entsprechend der unter Punkt V.2.1.11 beschriebenen Prozedur mit dem Plasmid pcAGGSM2-BIP-IRES-GFP transfiziert, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert sowie einer UV-induzierten Protein-

V. Material und Methoden

Quervernetzung unterzogen (Gesamtzeit der Plasmidexpression: 48 h). Nach erfolgter UV-Bestrahlung wurden die Zellen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen geerntet, ausgezählt und anschließend zentrifugiert (5 min bei 1.000 rpm und 4 °C; GS-6KR Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in Lysepuffer für ATP-Agarose aufgenommen (20.000 Zellen/ μ l), die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übernommen und für 15 min auf Eis lysiert. Währenddessen wurden 50 μ l ATP-C⁸-Agarose zweimal 5 min in 1 ml Äquilibriumspuffer (Tabelle 10) gewaschen (Zentrifugation bei 2.000 rpm für 10 min bei 4 °C; Kühlzentrifuge 5415 R). Nach Abpipettieren des Äquilibriumspuffers erfolgte die Zugabe von 100 μ l Zelllysat auf die ATP-Agarosekügelchen. Diese Suspension wurde zusätzlich mit 250 μ l Äquilibriumspuffer aufgefüllt und bei 4 °C über Nacht gerollt. Der Ansatz wurde am darauffolgenden Tag mit 2.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand gesammelt und die ATP-C⁸-Agarose zweimal mit 1 ml Niedrigsalzpuffer (Tabelle 10) waschen (2.000 rpm für 10 min bei 4 °C). Zur Elution gebundener Proteine wurde die ATP-C⁸-Agarose mit 100 μ l Elutionspuffer (Tabelle 10) überschichtet und für 1 h bei RT gerollt. Nach einer Zentrifugation (2.000 rpm für 10 min bei 4 °C) wurde der Überstand (Eluat) gesammelt und die Agarosekügelchen zusätzlich mit 100 μ l Hochsalz-Elutionspuffer (Tabelle 10) erneut 1 h bei RT unter kontinuierlichem Rollen inkubiert. Danach erfolgte wiederum eine Zentrifugation mit 2.000 rpm für 10 min bei 4 °C, woraufhin der Überstand (Hochsalz-Eluat) erneut gesammelt wurde. Alle erhaltenen Überstände wurden bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert und anschließend in 5-fach konzentriertem Lämmli-Probenpuffer resuspendiert sowie bei 56 °C für 15 min zur Denaturierung enthaltender Proteine erhitzt (Überstand_{Äquilibriumspuffer} \cong 2.500 Zellen/ μ l; Eluat \cong 20.000 Zellen/ μ l; Hochsalz-Eluat \cong 20.000 Zellen/ μ l). Zum Nachweis des präzipitierten Proteins wurden die Proben auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (für die Massenspektrometrie) aufgetrennt und mittels sensitiver Proteinfärbung mit kolloidalem Coomassie G-250 für 7 Tage gefärbt (V.2.1.3). Relevante Proteinbanden wurden nach der Färbung möglichst kontaminationsfrei mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert, was freundlichst durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Claudia Fecher-Trost (Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes) übernommen wurde.

Lysepuffer für ATP-Agarose

Tris, pH 8,0	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
MgCl ₂	5 mM
Nonidet-P40	1 %
PLAC	1 : 10.000

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer zur Präzipitation von Proteinen mit C⁸-ATP-Agarose.

Bestandteile	Äquilibrierungs- puffer	Niedrigsalzpuffer	Elutionspuffer	Hochsalz- Elutionspuffer
Tris/NaOH, pH 7,5	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	400 mM	-	400 mM	2 M
MgCl ₂	1,5 mM	4 mM	1,5 mM	1,5 mM
EDTA	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
DTT	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Glycerin	30 % (w/v)	30 % (w/v)	30 % (w/v)	-
Mg ²⁺ -ATP	-	-	4 mM	10 mM
Nonidet-P40	0,65	0,65	0,65	0,50

V.2.1.11. UV-induzierte *in vivo* Quervernetzung von Proteinen

Um stabile wie auch transiente Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren stellt die Quervernetzung eine beliebte und aussagekräftige Methode dar. Im Gegensatz zu Co-Präzipitationen (V.2.1.9), welche Zelllysate als Ausgangsmaterial verwenden und sich auch eher zum Nachweis stabiler Interaktionen eignen, kann eine Quervernetzung von Proteinen direkt in der lebenden Zelle, also in ihrem nativen Umfeld, erfolgen und schließt auch schwächere Wechselwirkungen mit ein. Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Ansätze eine solche kovalente Bindung zwischen interagierenden Proteinen zu induzieren. Die konventionelle Variante basiert auf chemischen Substanzen, die meist zwei über eine Verbindungsregion gekoppelte reaktive Moleküle gleicher oder unterschiedlicher Natur (homo- oder heterobifunktional) besitzen, welche spezifisch an bestimmte funktionelle Gruppen von Proteinen kovalent binden können (z.B. Sulfhydryl- oder Aminogruppen). Eine etwas neuere wie auch elegantere Methode ist die UV-induzierte *in vivo* Protein-Quervernetzung. Die hierfür verwendeten photo-reaktiven Aminosäuren L-Photo-Methionin (L-2-Amino-5,5-azi-Hexansäure) und L-Photo-Leucin (L-2-Amino-4,4-azi-pentansäure) ähneln strukturell und funktionell stark ihren natürlichen Aminosäuren-Pendants (Abbildung 8, A), was ihnen ermöglicht ohne Weiteres von der Zelle aufgenommen zu werden, die Kontrollmechanismen während der Proteinsynthese zu umgehen und letztlich ganz natürlich über die entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in Proteine inkorporiert zu werden. Durch Aktivierung der Photo-instabilen Diazirinalkylgruppe mittels UV-Licht, wird ein reaktives Carbenintermediat erzeugt, welches durch seine zwei freien Elektronen direkt eine kovalente Bindung zwischen interagierenden Proteinen bildet. Dies setzt jedoch voraus, dass die Interaktionsdomäne mindestens eines Interaktionspartners eine der modifizierten Aminosäuren enthält, welche sich in molekularer Reichweite zu benachbarten Molekülen des anderen Proteins befindet (MacKinnon *et al.*,

V. Material und Methoden

2007; Suchanek *et al.*, 2005). Solche Quervernetzungsprodukte können über eine SDS-PAGE (V.2.1.1) oder einen Western-Blot (V.2.1.4) und anschließende immunologische Detektion (V.2.1.5) aufgrund des höheren Molekulargewichtes nachgewiesen werden (Abbildung 8, B). Die Photo-Aminosäuren können zwar ihre jeweiligen natürlichen Varianten ersetzen, allerdings wird ihr Einbau in Gegenwart der endogenen Aminosäuren kompetiert, da sie aufgrund der leicht unterschiedlichen Struktur von der Zelle mit geringerer Präferenz genutzt werden. Daher werden die Zellen in Medium ohne die essentiellen Aminosäuren L-Methionin und L-Leucin kultiviert, welches stattdessen mit den modifizierten Aminosäuren supplementiert wurde. Darüber hinaus enthält dieses Medium dialysiertes FCS (V.2.4.2), welches ebenfalls keine Aminosäuren enthält.

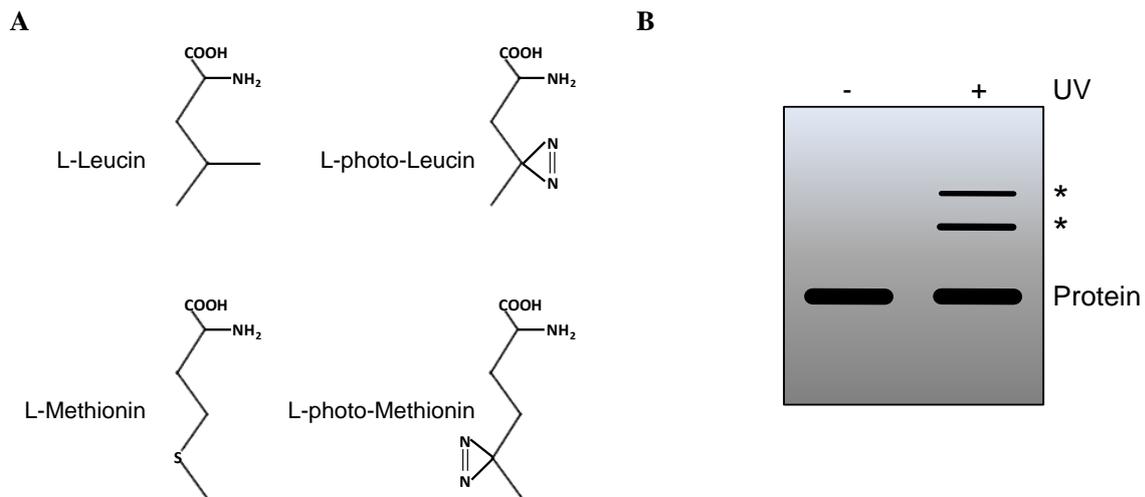


Abbildung 8: Photo-Aminosäuren für *in vivo* Quervernetzungen von Proteinen **A)** Schematische Darstellung der Aminosäuren L-Methionin und L-Leucin sowie ihrer UV-sensitiven Diazirin-Derivate L-Photo-Methionin und L-Photo-Leucin. **B)** Illustration eines Western-Blot-Bandenmusters eines fiktiven Proteins vor (-) und nach (+) UV-Bestrahlung von Zellen, die in Gegenwart von Photo-Aminosäuren kultiviert wurden (* = Quervernetzung).

Für ein Photo-Quervernetzungsexperiment wurden HeLa-Zellen 1:2 in eine 75 cm² Zellkulturflasche aufgeteilt, damit sich diese am Folgetag in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Nach Ablösen mit Trypsin/EDTA und Aufnahme in frisches DMEM wurden die Zellen ausgezählt (V.2.4.3.2) und auf 1,5 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden entweder in 3,5 cm (300.000 Zellen; 2 ml) oder 6 cm (600.000 Zellen; 4 ml) Zellkulturschalen ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Falls gewünscht wurden diese Zellen darüber hinaus mit siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Optional wurde am nächsten Tag eine Plasmidtransfektion (V.2.4.6.2) oder eine siRNA-Nachtransfektion durchgeführt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Am nächsten Tag sollten die Zellen eine Konfluenz von etwa 70-80 % besitzen. Nachdem das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden erhielten diese entsprechende Volumina LM-2 (Thermo Scientific, DMEM-LM ohne L-Leucin und L-Methionin, mit Glutamin, 5 % dialysiertes FCS, 1 % P/S), welchem L-Photo-Methionin (2 mM) und L-Photo-Methionin (4 mM) zugesetzt wurde. Diese Zellen wurden zur Aufnahme der Photo-Aminosäuren weitere 24 h inkubiert. Das Medium wurde daraufhin verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Fall der 6 cm Kulturschalen wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung abgelöst, in 1 ml PBS resuspendiert und in eine 3,5 cm Schale übertragen. Die anfänglich in 3,5 cm Schalen aus-

säten Zellen blieben adhären und wurden lediglich mit 1 ml PBS überschichtet. Die UV-Bestrahlung der adhären oder in Suspension befindlichen Zellen erfolgte mit geöffnetem Deckel auf einem Rotationsschüttler mit Hilfe einer 100 Watt Hochdruck-UV/Vis-Quecksilberlampe (UVICO Longlife; Firma Rapp OptoElectronic; mit Filter zur Reduktion der Wellenlängen: 315-395 nm; am Ausgang gemessene Leistung: 1,3 Watt). Hierbei wurden ein Abstand von 4,5 cm zur Probe und eine Bestrahlungsdauer von 15 min gewählt. Die Zellen wurden anschließend gesammelt bzw. im Fall der adhären Zellen zuvor mit Trypsin/EDTA abgelöst und mittels Zellextraktzubereitung (V.2.4.4) für eine nachfolgende SDS-PAGE (V.2.1.3) und Western-Blot-Analyse (V.2.1.4) vorbereitet. Für die eigentlichen Experimente wurden zuerst geeignete Bedingungen durch Vorversuche etabliert. Zunächst wurde ein „WST-1-Assay“ (V.2.5.2.2) zur Überprüfung der Zellviabilität durchgeführt, welche zuvor 24 h in DMEM mit unterschiedlicher FCS-Menge und/oder -qualität kultiviert wurden (Abbildung 9, A). Zudem wurde die Zellproliferation nach 24-stündiger Inkubation in LM-2 mit Photo-Aminosäuren oder LM-2 mit nur einer der beiden Photo-Aminosäuren (die jeweils fehlende AS wurde durch die natürliche Form ersetzt; Konzentration entsprechend standardmäßigem DMEM) im Vergleich zu Kontrollzellen (DMEM) untersucht (Abbildung 9, B). Sowohl die Zugabe von 5 % dialysiertem FCS als auch die Supplementation mit Photo-Aminosäuren führte zu leichten Viabilitäts- bzw. Proliferationsdefiziten, welche jedoch in einem tolerierbaren Bereich lagen. Zur Bestimmung der Halbwertszeit ($T_{1/2}$) der Photo-Aminosäuren unter den genannten Versuchsbedingungen wurden 2 mM L-Photo-Methionin in PBS gelöst und jeweils 1 ml davon in einer 3,5 cm Zellkulturschale mit ansteigenden Zeiten bestrahlt. Anschließend wurde die Absorption aller Ansätze bei 345 nm (NanoDrop® ND-1000 UV/Vis, Peqlab) gemessen. Die $T_{1/2}$ gibt den Zeitpunkt an bei dem die Absorption und somit die Stoffmenge im Vergleich zur nicht-bestrahlten Probe zu 50 % reduziert ist. Bei dem verwendeten Aufbau lag die $T_{1/2}$ bei 19 s (Abbildung 9, C). Dem Hersteller (Thermo Scientific) zufolge soll die Bestrahlung der Zellen mindestens das Vierfache der $T_{1/2}$ betragen und 20 min nicht überschreiten. Eine Messung der Temperatur von PBS unter den gleichen Voraussetzungen über einen Bestrahlungszeitraum von 30 min ergab eine Erwärmung des Puffers von lediglich 5 °C (Abbildung 9, D). Eine zusätzliche Kühlung während der Bestrahlung war somit nicht erforderlich. Nach diesen Messungen wurde für die folgenden Experimente, wie oben beschrieben, eine Bestrahlungsdauer von 15 min festgelegt. In Abbildung 9, E und F sind beispielhaft die mit dem beschriebenen Versuchsaufbau erhaltenen Resultate in Form einer Immundetektion nach einem Western-Blot dargestellt (V.2.1.4, V.2.1.5). Durch die Bestrahlung kommt im Falle des β -Aktins (42 kDa) eine deutliche Bande auf Höhe von 130 kDa zum Vorschein, was somit die erfolgreiche Etablierung der Prozedur belegt. Weiterhin zeigen die Ergebnisse in Abbildung 9 die Abhängigkeit der effizienten Quervernetzung von der jeweiligen Interaktionsdomäne beider interagierender Proteine und damit die Spezifität dieser Methode. Wie deutlich zu erkennen ist, vermag L-Photo-Leucin, jedoch nicht L-Photo-Methionin, die β -Aktin-Quervernetzung zu generieren. L-Photo-Methionin ist jedoch grundsätzlich funktional, was deutlich an der Quervernetzung des Proteins Grp170 in der gleichen Gelspur zu erkennen ist.

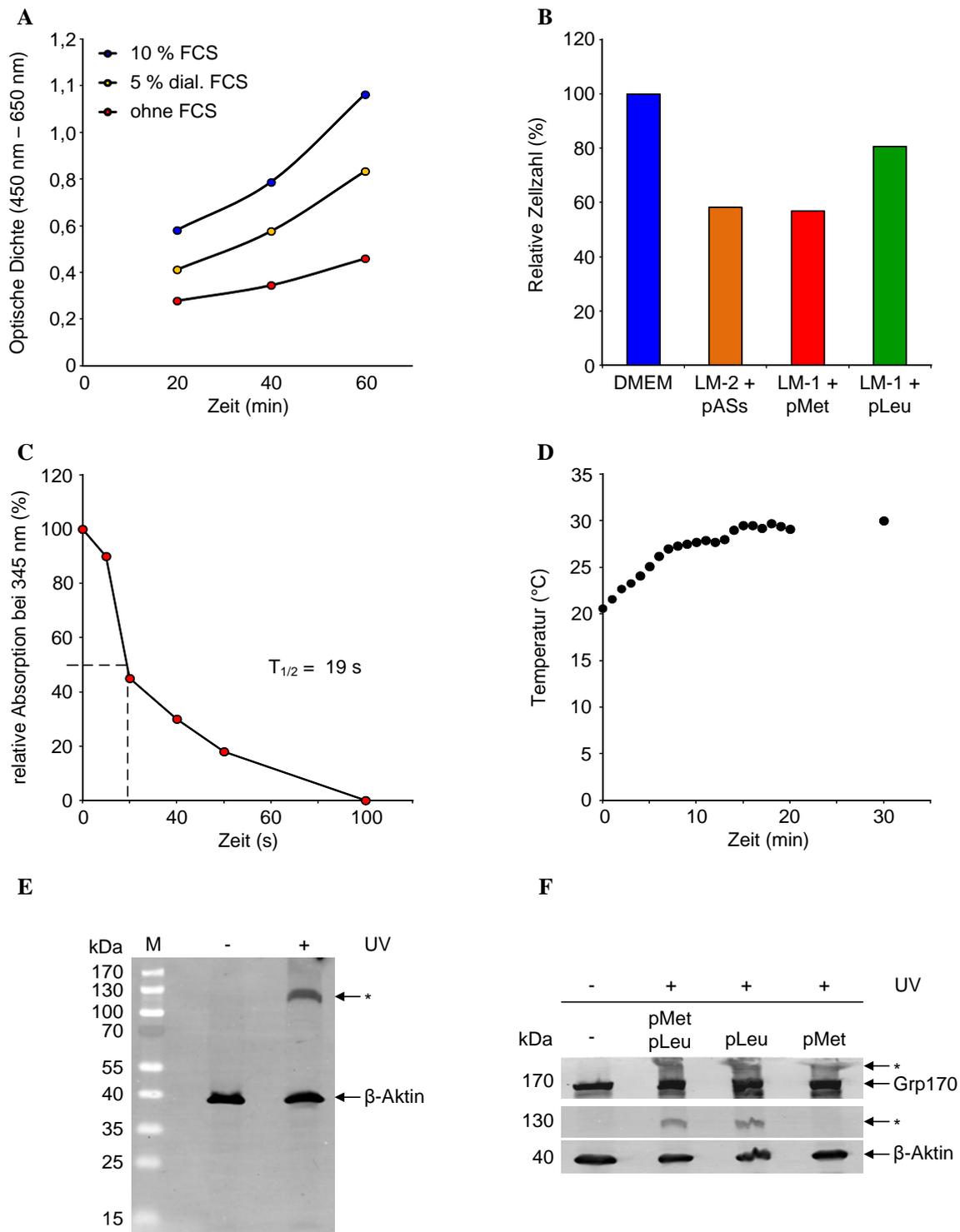


Abbildung 9: Ermittlung der geeigneten experimentellen Bedingungen für die UV-induzierte *in vivo* Quervernetzung von Proteinen mit Hilfe photo-reaktiver Aminosäuren. **A)** Überprüfung der Vitalität von HeLa-Zellen mittels „WST-1-Assay“ (V.2.5.2.2) nach Inkubation (24 h) mit DMEM + 5 % dialysiertes FCS oder DMEM ohne FCS im Vergleich zur Kontrolle (DMEM + 10 % FCS). **B)** Bestimmung der Zellzahl nach Kultivierung (24 h) von HeLa-Zellen in DMEM + 5 % dialysiertes FCS, in welchem je eine (LM-1 + pMet, LM-1 + pLeu) oder beide natürlichen AS (LM-2 + pASs) durch pASs ersetzt wurden (pAS = photo-Aminosäuren) **C)** Bestrahlung von 2 mM pMet in 1 ml PBS (Abstand: 4,5 cm) mit der UVICO Longlife UV/Vis-Lampe (Rapp OptoElectronic) zur Bestimmung der Halbwertszeit $T_{1/2}$ der pASs **D)** Analoge Bestrahlung von PBS zur Überprüfung der Erwärmung über einen bestimmten Zeitraum **E)** Repräsentatives Quervernetzungsexperiment (Western-Blot) am Beispiel von β -Aktin (* = Quervernetzung; M = Marker; kDa = Kilodalton). **F)** Gleicher Aufbau wie in (E) mit zusätzlichen Versuchen mit nur einer pAS und Detektion eines weiteren Proteins (Grp170) (* = Quervernetzung).

V.2.2. Molekularbiologische Analysemethoden

V.2.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1986 von Kary B. Mullis entwickelt und ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten, deren Nukleotidsequenz oder zumindest die flankierenden DNA-Abschnitte bekannt sein müssen (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Die Methode beruht auf der Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, wie beispielsweise der *Pfu*-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*. Sie besitzt neben ihrer 5'→3'-Polymeraseaktivität zudem eine 3'→5'-Exonukleasefunktion, welche sie zum Korrekturlesen („proof reading“) neu synthetisierter DNA befähigt. Die niedrige Fehlerrate von ca. $3,2 \times 10^{-6}$ pro Nukleotid verleiht ihr damit eine äußerst hohe Genauigkeit bei hohen Temperaturen, welche im Laufe einer PCR auftreten. Sie ist dabei in der Lage mit Hilfe von DNA-Einzelsträngen komplementäre Nukleinsäurestränge zu synthetisieren und damit die Bildung neuer DNA-Doppelstränge zu bewirken (Cline *et al.*, 1996). Um eine PCR durchzuführen werden zudem kurze Einzelstrang-DNA-Fragmente, sogenannte „primer“ benötigt (V.1.5.1). Diese synthetischen Oligonukleotide, welche komplementär zu den Enden oder den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind, können an die zuvor denaturierten, korrespondierenden DNA-Sequenzen binden und einen Startpunkt für die DNA-Polymerase bilden, die hiervon ausgehend die Amplifikation des Zweitstrangs bewerkstelligen kann. Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert.

Plasmid-DNA [1 µg/µl]	0,5 µl
+ Strang-Primer [50 µM]	1 µl
- Strang-Primer [50 µM]	1 µl
10 x PCR Puffer (mit MgCl ₂)	5 µl
dNTPs [10 mM]	2 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [2,5 U/µl]	0,5 µl
<hr/>	
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µl

Die PCR besteht im Allgemeinen aus einer variablen Anzahl von Zyklen, welche wiederum in drei Phasen mit unterschiedlichen Temperaturen gegliedert werden kann. Dabei begünstigt jede der Phasen eine bestimmte Reaktion. Die erste Phase, die Denaturierung, verläuft bei 94 °C und bewirkt das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Strängen der doppelsträngigen DNA, was auch als Schmelzen der DNA bezeichnet wird. Dies ermöglicht den nächsten Schritt, das „annealing“, bei dem sich die PCR-„primer“ spezifisch, bei einer von ihrer Nukleinsäuresequenz abhängigen Temperatur (typischerweise 2-3 °C unterhalb ihrer Schmelztemperatur), an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize anlagern. Die Schmelztemperatur (T_m) von PCR-

V. Material und Methoden

„primern“ liegt im Allgemeinen bei 50-65 °C und wird nach folgender Formel berechnet (s. Webseite der Firma Eurofins MWG Operon):

$$T_m (\text{°C}) = 69,3 + [41 \times (nG + nC) / s - (650 / s)]$$

n = Anzahl des Nukleotids X
s = Menge aller Nukleotide der Sequenz

Bei der Elongation, der letzten Phase, welche in einem Temperaturbereich von 68-74 °C durchgeführt wird, werden die eingesetzten Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), ausgehend vom gebundenen PCR-„primer“, durch die Polymerase komplementär zur DNA-Matrize jeweils an die freie Hydroxidgruppe (-OH) des letzten 3'-Nukleotids gebunden. Die dadurch neu synthetisierten DNA-Einzelstränge lagern sich aufgrund ihrer Komplementarität automatisch an die jeweilige Matrize und bilden so zwei neue zum Ausgangsstrang identische DNA-Doppelstränge. Diese können nun in den darauffolgenden Zyklen in gleicher Weise getrennt und wieder amplifiziert werden, wodurch sich theoretisch eine exponentielle Amplifikation der DNA ergibt. Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-„primer“ sind in Tabelle 2 unter Punkt V.1.5.1 zu finden.

Die PCR erfolgte im Thermocycler Primus 96 (Peqlab), wofür das folgende Programm verwendet wurde:

94 °C	2 min	} 25 Zyklen
94 °C	30 s	
52 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

Im Anschluss an eine Reaktion wurde 10 µl des PCR-Ansatzes mit DNA-Probenpuffer versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (V.2.2.4), um zu überprüfen, ob die DNA-Amplifikation erfolgreich war.

V.2.2.2. DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche bestimmte palindromische Sequenzen (meist zwischen vier und acht Basenpaaren) innerhalb doppelsträngiger DNA spezifisch spalten können, indem sie die Phosphodiesterbindung zwischen zwei benachbarten Nukleotiden trennen. Innerhalb der Zelle treten Restriktionsendonukleasen stets in Verbindung mit entsprechenden DNA-Methylasen auf. Dieses System dient dem Bakterium als Schutz vor Fremd-DNA (z.B. viral), da die endogene DNA durch Methylierung maskiert wird während entsprechende Erkennungssequenzen auf exogener DNA

V. Material und Methoden

zugänglich sind. Infolgedessen werden solche von den korrespondierenden Restriktionsendonukleasen fragmentiert. In der Molekularbiologie eignen sich Restriktionsenzyme insbesondere zur gezielten Spaltung von DNA, um diese auf Vorhandensein bestimmter Sequenzen zu untersuchen oder als initialer Schritt einer Klonierung. Sowohl der analytische (zur Kontrolle der Insertion eines DNA-Fragmentes in einen Vektor) als auch der präparative (zur nachfolgenden Isolation der gespaltenen DNA für eine Ligation) Restriktionsverdau von DNA wurde mit Enzymen und Puffern der Firma Fermentas durchgeführt und standardmäßig folgendermaßen pipettiert:

<i>Analytischer Ansatz</i>		<i>Präparativer Ansatz</i>	
Puffer	2 µl	10 x Puffer	6 µl
DNA	0,5 - 2 µl	DNA	5 -10 µl
Restriktionsenzym I	0,5 µl	Restriktionsenzym I	1,5 µl
Restriktionsenzym II	0,5 µl	Restriktionsenzym II	1,5 µl
<hr/>		<hr/>	
H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl	H ₂ O _{bidest.}	ad 60 µl

Weniger gut geeignete Enzymkombinationen wurden individuell nach Angaben des Herstellers pipettiert (www.fermentas.de). Der analytische Verdau erfolgte 60-90 min bei 37 °C. Ein präparativer Verdau hingegen wurde mindestens 2-3 h oder über Nacht bei gleicher Temperatur inkubiert. Zur Überprüfung einer korrekten Spaltung nach erfolgreicher Insertion von DNA in einen Vektor (analytischer Ansatz) oder zur Trennung und nachfolgenden Aufreinigung (V.2.2.5) der Spaltprodukte nach präparativem Restriktionsverdau wurden die Ansätze in einem 1 %-igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (V.2.2.4).

V.2.2.3. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren ATP- bzw. NAD⁺-abhängig die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen von Nukleotiden zweier linearer DNA-Moleküle. Diese Fähigkeit wird molekularbiologisch genutzt um restringierte DNA-Fragmente (V.2.2.2) in ebenso enzymatisch gesplante Plasmide zu inserieren. Die in dieser Arbeit verwendete T4-DNA-Ligase (Fermentas) bietet zusätzlich die Eigenschaft, sogenannte „sticky-ends“ (kohäsive Enden) zu ligieren. Dies hat den Vorteil, dass DNA-Fragmente, die mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten wurden, die „sticky-ends“ bilden, gerichtet in ein linearisiertes Plasmid (in gleicher Weise geschnitten) kloniert werden können.

V. Material und Methoden

Allgemein gilt als Faustregel für die Ligation:

$$\text{Insertmenge (ng)} = \frac{\text{Vektormenge (ng)} \times \text{Insertgröße (kb)}}{\text{Vektorgröße (kb)}} \times \text{Insert zu Vektor-Verhältnis}$$

Je nach Größe von Vektor und Insert wurde demnach ein molares Verhältnis (Vektor zu Insert) von 1:1 bis zu 1:3 eingesetzt.

Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 x Ligationspuffer	1 µl
Vektor (0,2 µg/µl)	1 µl
Insert (0,2 µg/µl)	1-3 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	0,5 µl
<hr/>	
H ₂ O _{bidest.}	ad 10 µl

Der Ligationsansatz wurde 1 h bei RT oder über Nacht bei 20 °C inkubiert und die Ligase anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert. 5-10 µl eines Ligationsansatzes wurden in *E. coli* JM101 oder XL1-Blue transformiert (V.2.2.7), entsprechend gewachsene Klone zur Amplifikation von Plasmid-DNA kultiviert und die Plasmid-DNA präpariert (V.2.2.9). Zur Kontrolle der korrekten Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes in den Vektor wurde ein geeigneter Restriktionsverdau (V.2.2.2) sowie eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (V.2.2.4).

V.2.2.4. Agarosegelelektrophorese

Um ein Gemisch von Nukleinsäuren nach der Größe seiner einzelnen Bestandteile aufzutrennen und zu analysieren, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das Grundprinzip ist hierbei das gleiche wie bei der SDS-PAGE (V.2.1.1). In einem elektrischen Feld wird ein Analyt aufgrund seiner vorhandenen Nettoladung in eine bestimmte Richtung bewegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei durch eine Gelmatrix bestimmt, in diesem Fall aus erstarrter Agarose, durch die er sich bewegen muss. Da das Phosphatrückgrat von Nukleinsäuren eine negative Ladung trägt, liegen DNA- und RNA-Moleküle unter elektrophoretischen Bedingungen als Poly-Anionen vor. Deswegen wandern diese unter solchen Bedingungen zur positiven Elektrode (Anode). Da die negative Ladung proportional zur Größe der Moleküle ist, bestimmt vor allem die Porengröße des Gels, welche von der verwendeten Agarosekonzentration abhängt, die Mobilität der Nukleinsäuremoleküle. Demnach können kleinere Moleküle das Gel schneller passieren als größere. Neben der Anzahl an Basenpaare, spielt auch die Konformation der Moleküle eine wichtige Rolle, da lineare DNA weniger mit der Gelmatrix kollidiert

V. Material und Methoden

als zirkuläre DNA. Zur Auftrennung von PCR-Produkten (V.2.2.1) und geschnittener Plasmid-DNA (V.2.2.2) wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Hierfür wurden 1,2 g Agarose in 120 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf etwa 60 °C mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Diese Substanz interkaliert zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix und dient später der Sichtbarmachung der DNA-Banden im Agarosegel, da sie nach Anregung mit UV-Licht orangerotes Licht im Bereich von 590 nm emittiert. Die vorbereitete Agaroselösung wurde anschließend in eine zuvor entsprechend abgedichtete horizontale Gelkammer gegossen und mit einem speziellen Kamm zur Aussparung der Probenaschen versehen. Nach dem Aushärten wurde der Probenkamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit TAE-Puffer aufgefüllt. Aufzutrennende DNA-Proben wurden zur Markierung der Lauffront und zur Erhöhung der Viskosität im Verhältnis 1:6 mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Aussparungen des Agarosegels pipettiert. Für die nachfolgende Größenbestimmung der Nukleinsäuren wurde zudem als DNA-Längenstandard der Marker „O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ der Firma Fermentas mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für ca. 1-2 h mit einer Stromstärke von 200 mA durchgeführt. Zur Dokumentation der Fluoreszenzemission der aufgetrennten DNA-Ethidiumbromid-Komplexe wurde der „Image Master® VDS“ verwendet.

<u>DNA-Probenpuffer (6x)</u>		<u>TAE-Puffer</u>	
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	Tris	40 mM
Xylencyanol	0,25 % (w/v)	EDTA	1 mM
Saccharose	40,0 % (w/v)	Essigsäure, pH 8	20 mM

V.2.2.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Fällung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung eines präparativen DNA-Restriktionsansatzes (V.2.2.2) mittels Agarosegel (V.2.2.4) wurde die DNA wieder aus der Matrix extrahiert. Zu diesem Zweck wurde das „Perfectprep® Gel Cleanup“ (Eppendorf) verwendet.

Das Agarosegel wurde nach der Elektrophorese und der Dokumentation auf einen zuvor mit Ethanol gereinigten UV-Tisch aufgelegt und die unter dem UV-Licht sichtbare, gewünschte DNA-Bande mittels eines Skalpell aus geschnitten. Das Gelstückchen wurde in einen Filtereinsatz gelegt, welcher seinerseits in ein 2 ml „SpinX“-Reaktionsgefäß eingesetzt wurde. Durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm wurde die Agarose von der in Puffer gelösten DNA getrennt. Der Filtereinsatz wurde anschließend verworfen und das Filtrat mit 1/10 Teilen 3 M NaAc (pH 5,2) versetzt. Hierzu wurde wiederum 96 % Ethanol (2,5-faches Filtratvolumen) hinzugegeben und die DNA für 30 min oder über Nacht bei -80 °C gefällt. Der Ansatz wurde daraufhin für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl 70 %-igem Ethanol wurde der Ansatz ein letztes Mal für 5 min bei

V. Material und Methoden

14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die DNA anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

TE-Puffer

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

V.2.2.6. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Als Transformationskompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet exogene DNA aufzunehmen. Um die unter Punkt V.1.8 genannten *E. coli*-Stämme artifiziell kompetent zu machen, wurden diese entsprechend einer abgewandelten Prozedur nach Hanahan und Meselson vorbehandelt (Hanahan und Meselson, 1983). *E. coli*-Zellen wurden hierfür auf einer LB-Agarplatte mittels Verdünnungsausstrich ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Eine Einzelkolonie dieser Platte wurde zum Inokulieren von 2 ml LB-Medium verwendet (Reagenzglas), welches ebenfalls über Nacht bei 37°C auf einem Drehrad inkubiert wurde. Anschließend wurden 200 ml LB-Medium mit dieser Vorkultur angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 in einem Rotationsinkubator bei 250 rpm und 37 °C kultiviert. Die Zellsuspension wurde in einen vorgekühlten Zentrifugenbecher überführt, 10 min auf Eis gekühlt und danach 10 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (J2 MC-Zentrifuge mit JA-10-Rotor, Beckmann). Der Überstand wurde verworfen und das *E. coli*-Pellet in 80 ml vorgekühlten Puffer 1 vorsichtig resuspendiert. Nachdem diese Suspension nochmals 10 min auf Eis inkubiert wurde erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 5.000 rpm und 4 °C. Danach wurde das Pellet in 8 ml Puffer 2 aufgenommen und die Zellsuspension zu je 100 µl aliquotiert. Diese Aliquots wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Puffer 1

KaAc	30 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

pH 5,8 mit CH₃COOH

Puffer 2

MOPS (freie Säure)	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH 6,5 mit KOH	

Beide Puffer wurden nach dem Ansetzen sterilfiltriert.

V.2.2.7. Transformation von *E.coli* Zellen mit Plasmid-DNA

Transformation bezeichnet die genetische Veränderung eines einzelligen Organismus durch horizontalen Gentransfer. Da gram-negative Bakterien wie *E. coli* auf natürliche Weise keine DNA aufnehmen können, müssen diese Zellen zuvor transformationskompetent gemacht (V.2.2.6) und die DNA mittels Hitzeschock eingebracht werden (Cohen *et al.*, 1973; Inoue *et al.*, 1990). Für eine Transformation wurden auf 100 µl Suspension kompetenter *E. coli* Zellen (DH5α, JM101) ca. 100 ng Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl Ligationsansatz (V.2.2.3) pipettiert und der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C (Wasserbad) wurden Zellen direkt wieder auf Eis gekühlt. Danach wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert, wodurch alle erfolgreich transfizierten *E. coli* Zellen ausreichend Zeit hatten, die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz auszubilden. Die Zellen wurden daraufhin kurz zentrifugiert und 750 µl des Überstandes verworfen. Die restlichen Zellen wurden im Übrigen Volumen LB-Medium suspendiert und mittels Drigalskispatel und Drehtisch auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten (V.2.2.8) ausgestrichen. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Transformation der XL1-Blue *E. coli*-Zellen (Agilent Technologies) wurde entsprechend nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

V.2.2.8. Kultivierung von Bakterien

E. coli Zellen wurden zur Kultivierung in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm im Rotationsinkubator oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion von Zellen, die erfolgreich mit einem Plasmid transformiert wurden, welches ein Resistenzgen besitzt, wurde dem Medium Antibiotika (Ampicillin oder Kanamycin, 100 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:1.000 hinzugegeben.

<u>LB-Medium</u>	<u>LB-Agarplatten</u>
LB-Medium 25 g	LB-Agar 35 g
ad 1 l H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l H ₂ O _{bidest.}

Das Medium und der Agar wurden nach dem Ansetzen autoklaviert. Der LB-Agar wurde in sterile 10 cm Petrischalen gegossen und erstarren gelassen. Optional wurde dem LB-Agar nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C 1 ml einer Ampicillin- oder Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) zugefügt.

V.2.2.9. Plasmid-DNA-Präparation aus Bakterien mittels Midi- und Mega-Kit

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde entweder mit dem Midi-Kit „Jetstar“ (Genomed) oder Maxi-Kit (Qiagen) durchgeführt. Beide Varianten beruhen dabei auf einer optimierten Form der alkalischen Zellyse nach Birnboim und Doly (Birnboim, 1983; Birnboim und Doly, 1979).

Ein entscheidender Unterschied zur konventionellen Variante ist die nachfolgende Reinigung der DNA mittels einer Silikamembran, die nach dem Anionenaustauschprinzip funktioniert. Die mit einem gewünschten Plasmid transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen (V.2.2.7) wurden, statt auf eine LB-Agarplatte, direkt in einen Erlenmeyerkolben in größere Volumina LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert (150 ml bei einer Midi- und 500 ml bei einer Mega-Präparation). Nach Kultivierung der Bakterien bei 37 °C und 220 rpm über Nacht wurden diese auf mehrere 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und für 5 min bei 3750 rpm (GS-6KR Zentrifuge) pelletiert. Die jeweilige Durchführung der Plasmid-Präparationen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Im Anschluss wurde die Konzentration der in TE-Puffer (V.2.2.5) gelösten Plasmid-DNA photometrisch bestimmt (V.2.2.10).

V.2.2.10. Bestimmung von Reinheit und Konzentration isolierter DNA

Vergleichbar zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen (V.2.1.8.1) wurde auch die Bestimmung der Konzentration von DNA-Präparationen mit Hilfe des NanoDrop[®]ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Peqlab) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Messung der optischen Dichte zum einen bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm (OD_{260}), was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht und zum anderen bei OD_{280} , dem Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren und demnach von Proteinen. Die Bestimmung der OD_{280} gibt zusätzlich zur eigentlichen DNA-Konzentration eine Aussage darüber, wie rein die Präparation ist und ob keine größeren Proteinkontaminationen enthalten sind. Typischerweise wird hierfür das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} angegeben, was direkt von der zugehörigen Software berechnet wird. Liegt der Wert unterhalb von ca. 1,8, deutet dies auf Proteinverunreinigungen hin. Umgekehrt kann die Probe auch mit RNA kontaminiert sein, was sich in zu hohen Ratio-Werten niederschlägt, das heißt oberhalb von 1,9. Dies liegt an der Tatsache, dass RNA Uracil anstelle von Thymin als Nukleinbase besitzt, welche eine wesentlich höhere Absorption bei 260 nm aufweist und somit die Ratio 260/280 für RNA gegenüber der für DNA erhöht.

V.2.3. *In vitro* Proteinsynthese und Transportstudien

Die *in vitro* Proteinsynthese ist eine Methode, die eine einfache wie auch effiziente Plattform für eine Reihe biochemischer Fragestellungen bietet, wie beispielsweise die Messung von Enzymaktivitäten, Proteinfaltungsstudien oder wie in dieser Arbeit, der Transport präsekretorischer Proteine (V.2.3.3) in das ER. Der Vorteil gegenüber dem zellulären System ist die Unabhängigkeit von Antikörpern zum spezifischen Proteinnachweis, denn durch die gezielte Zugabe einer ausgewählten mRNA-Spezies und die Verwendung radioaktiv markierter Aminosäuren ($[^{35}\text{S}]$ -Methionin) kann in einem definierten Translationssystem jedes beliebige Protein von Interesse synthetisiert und mit hoher Sensitivität

nachgewiesen werden (V.2.1.6). Da kein Zellwachstum erforderlich ist bietet die Methode darüber hinaus eine äußerst schnelle Durchführbarkeit und zuletzt eine einfache Manipulierbarkeit, da das Translationssystem (z.B. Retikulozytenlysat), welches als zytosolische Fraktion dient, problemlos durch beliebige zelluläre Komponenten (z.B. Enzyme) oder andere Substanzen (z.B. Inhibitoren) ergänzt werden kann.

V.2.3.1. *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription von mRNA wurde mit Hilfe der in Tabelle 5 aufgelisteten Plasmide bzw. PCR-Produkte durchgeführt, welche die jeweilige Sequenz der zu synthetisierenden Vorläuferproteine in Form von cDNA kodieren. Diese DNA-Sequenz befindet sich unter der Kontrolle eines in 5'-Richtung lokalisierten bakteriellen T7- oder SP6-Promotors, an welche die korrespondierenden DNA-Polymerasen binden können, um eine entsprechende mRNA (Transkript) generieren zu können (Krieg und Melton, 1984; van der Werf *et al.*, 1986). Um die Effizienz der *in vitro* Transkription zu erhöhen wurde in manchen Fällen linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Diese Linearisierung wurde durch Spaltung mit Hilfe einer geeigneten Restriktionsendonuklease durchgeführt (Tabelle 5). In gesonderten Fällen wurde solch eine Spaltung innerhalb der kodierenden Region der entsprechenden DNA durchgeführt, was in der folgenden *in vitro* Translation zu einer trunkierten, im Ribosom arretierten Polypeptidkette führt (ppl₈₆).

Ein *in vitro* Transkriptionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Prämix A	30 µl
Plasmid-DNA (1 µg/µl)	1 µl
bzw. PCR-Produkt	12 µl
m ⁷ GpppG-Lösung	2,5 µl
RNasin (40 U/µl)	1,5 µl
RNA-Polymerase (20 U/µl)	1 µl
<hr/>	
ad H ₂ O _{bidest.}	50 µl

Der Transkriptionsansatz wurde anschließend im vorgeheizten Wasserbad bei 40 °C für 3 h inkubiert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren sowie bei -80 °C gelagert. Bei Bedarf wurde das Transkript auf Eis aufgetaut, das gewünschte Volumen entnommen und umgehend wieder, wie oben beschrieben, aufbewahrt.

<u>Prämix A</u>		<u>m⁷GpppG-Lösung:</u>
DTT	8,3 mM	5 U m ⁷ GpppG
BSA	167 mg/ml	in 300 µl 10 mM HEPES/ KOH, pH 7,9
GTP	0,17 mM	
ATP, CTP, UTP	0,83 mM	
Spermidin-Lösung	10 % (v/v)	

Spermidin-Lösung

Spermidin	20 mM
HEPES/KOH pH 7,4	400 mM
MgAc ₂	60 mM

V.2.3.2. *In vitro* Translation

Für eine zellfreie Translation wird meist ein Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten, Weizenkeimen oder *E. coli*-Zellen verwendet. Diese Extrakte enthalten alle makromolekularen Komponenten, die für eine Translation von mRNA erforderlich sind (Ribosomen, tRNA, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren, etc.). Ergänzt wird das Ganze durch zusätzliche Aminosäuren, energieliefernde Nukleotide (ATP, GTP) sowie weitere Co-Faktoren (z.B. Mg²⁺, Ca²⁺). Es gibt zwei Varianten eine *in vitro* Synthese von Proteinen durchzuführen, entweder ausgehend von isolierter bzw. *in vitro* synthetisierter mRNA (V.2.3.1) oder mit DNA als Ausgangsmaterial in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem. In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich mit getrennten Systemen gearbeitet. Für alle durchgeführten *in vitro* Synthesen wurde das Kaninchen-Retikulozytenlysat verwendet, da es sich besonders gut zur effizienten Translation exogener, eukaryotischer mRNA eignet. Retikulozyten, die Vorläufer von Erythrozyten, haben bereits ihren Nukleus, und somit ihre DNA, und zum Teil auch andere Zellorganellen verloren, enthalten aber eine voll funktionstüchtige Proteinsynthesemaschinerie. Jedoch besitzen sie auch endogene mRNA (insbesondere kodierend für Globin), die jedoch nach der Zellyse durch die Ca²⁺-abhängige S1-Nuklease abgebaut werden kann. Die Nuklease kann anschließend durch Chelatierung von Ca²⁺ mittels EGTA wieder inaktiviert werden. Ein in dieser Form vorbehandeltes Retikulozytenlysat-basierendes *in vitro* Translationssystem der Firma Promega („Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated“) wurde zur Synthese präsekretorischer Proteine verwendet. Um die Vorläufer radioaktiv zu markieren wurde dem Translationsmix [³⁵S]-Methionin (1.000 Ci/mmol) anstelle der nicht-radioaktiven Aminosäure beigefügt. Für einen cotranslationalen *in vitro* Transport von Proteinen (V.2.3.3.1) wurden RM oder semi-permeabilisierte HeLa-Zellen (SPZ) anstelle der entsprechenden

V. Material und Methoden

Volumina $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ hinzugegeben. Sollte weiterhin der Einfluss inhibitorischer Substanzen auf den Proteintransport getestet werden, wurde zusätzlich ein weiterer Anteil $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ durch das gewünschte Volumen ersetzt.

Ein *in vitro* Translationsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Retikulozytenlysatsat	12,5 μl
AS-Mix ohne Methionin	0,5 μl
RNasin (40 U/ μl)	0,5 μl
mRNA	1 μl
[^{35}S]-Methionin (1.000 Ci/mmol)	1 μl
<hr/>	
ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	25 μl

Aufgrund einer geringeren Transkriptionseffizienz wurden im Fall von ppcecA 3 μl mRNA eingesetzt.

Alle Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert und sorgfältig gemischt. In Abwesenheit von ER-Membranen sowie unter cotranslationalen ER-Transportbedingungen (V.2.3.3.1) wurde ein Ansatz 60 min bei 30 °C inkubiert. Für einen posttranslationalen ER-Transport (V.2.3.3.2) erfolgte die Proteinsynthese lediglich für 15 min (ohne Membranfraktionen) und wurde anschließend abgestoppt. Die synthetisierten, radioaktiv markierten Proteine wurden nachfolgend mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt und autoradiographisch (V.2.1.6) detektiert.

V.2.3.3. *In vitro* Transport von Vorläuferproteinen in raue Hundepankreasmikrosomen (RM) und semi-permeabilisierte Säugetierzellen (SPZ)

Wie bereits unter Punkt V.2.3.2 erwähnt, wurden den *in vitro* Translationsansätzen zum Zweck von Transportstudien während der Proteinsynthese (cotranslational) oder hinterher (posttranslational) entweder Präparationen von rauen Hundepankreasmikrosomen oder semi-permeabilisierte HeLa-Zellen hinzugefügt, die zur Vereinfachung in der Folge stets mit dem Überbegriff ER-Membranen bezeichnet werden.

V.2.3.3.1. Cotranslationaler Transport *in vitro* synthetisierter Proteine

Da der cotranslationale Proteintransport simultan zur Proteinbiogenese am Ribosom erfolgt, und somit der RNC-Komplex (Ribosom-naszierende-Kette-Komplex) im Laufe der Synthese an den für den ER-Import essentiellen ER-Membran-ständigen Sec61-Komplex bindet, wurden die ER-Membranen, um diesen Vorgang unter zellfreien Bedingungen zu imitieren, direkt in den *in vitro* Translationsansatz

(V.2.3.2) hinzugegeben (Zimmermann *et al.*, 2011). Hierzu wurde die entsprechende Menge $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ durch das erforderliche Volumen RM (6 % v/v) oder SPZ (32 % v/v) ersetzt. Kontrollansätze wurden mit gleichen Volumina der jeweiligen Suspendierungs-Puffer für die ER-Membranen (Mikrosomenverdünnungspuffer (MVP) bei RM oder KHM-Puffer (V.2.4.5) bei SPZ) angesetzt. Die Ansätze wurden wie unter Punkt V.2.3.2 beschrieben 60 min bei 30 °C inkubiert und falls erforderlich einer Sequestrierung unterzogen (V.2.3.3.3). Die Proben wurden schließlich mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, bei 56 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) und „phosphorimaging“ (V.2.1.6) analysiert.

MVP

HEPES/KOH, pH 7,5	20 mM
Saccharose	200 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	2 mM

V.2.3.3.2. Posttranslatonaler Transport *in vitro* synthetisierter Proteine

Der posttranslationale Proteintransport bedarf einer gewissen Abwandlung des oben beschriebenen Protokolls. Da sichergestellt werden musste, dass der Transport tatsächlich nach erfolgter Proteinsynthese stattfindet, wurde die *in vitro* Synthese entsprechender Vorläufer zuerst in Abwesenheit von ER-Membranen durchgeführt. Nachdem ein solcher Ansatz für 15 min bei 30 °C inkubiert wurde, erfolgte die Zugabe von 80 ng/μl RNase A, um die das präsekretorische Protein kodierende mRNA zu degradieren, sowie von 0,1 μg/μl Cycloheximid, welches den Elongationsschritt der Proteinsynthese inhibiert (Cho *et al.*, 2005; Ennis und Lubin, 1964). Nach Inkubation für weitere 5 min bei 30 °C wurden entweder 6 % (v/v) Hundepankreas-mikrosomen (RM) oder 32 % (v/v) semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) hinzupipettiert, wobei in diesem Fall die Berechnung der Volumina ohne anfänglichen Abzug des entsprechenden Volumens $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ erfolgte. Stattdessen wurde der Proteinsyntheseansatz als 100 % abzüglich des Membranvolumens (%) angesehen und somit das nachträglich errechnete Volumen RM oder SPZ beigefügt. Für die posttranslationale Insertion von C-terminal verankerten Membranproteinen (Cytochrom b5 und Synaptobrevin 2) wurden im Gegensatz zum üblichen Syntheseansatz nur 16 % SPZ verwendet, da oberhalb dieser Konzentration eine Sättigung mit ER-Membranen eintritt und somit keine deutliche Steigerung der Insertion mehr detektierbar ist (Lang, 2012). Entsprechend mit ER-Membranen versetzte Transportansätze wurden für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert.

Für *in vitro* Experimente mit der trunkierten Variante ppl₈₆ wurde eine modifizierte Prozedur durchgeführt. Da die mRNA-Sequenz dieses Vorläufers durch die vorangegangene enzymatische Spaltung des Plasmids kein Stopcodon enthält, wird dieses Polypeptid während seiner Synthese im

Ribosom arretiert. Aufgrund seines eigentlich cotranslationalen Transportmodus assoziiert es auch nach dieser Arretierung in Anwesenheit von rauem ER mit der Translokationspore des Sec61-Komplexes. Das resultierende Translokationsintermediat kann mit Hilfe einer chemischen Quervernetzung nachgewiesen werden (Connolly und Gilmore, 1986; Zimmermann *et al.*, 1991). Diese Form der *in vitro* Translokation bietet zudem die Möglichkeit ein eigentlich cotranslational transportiertes Substrat unter posttranslationalen Bedingungen zu testen, falls die Zugabe bestimmter Substanzen wie Ca^{2+} (Aktivierung der S1 Nuklease) oder Stoffe, welche die Proteinsynthese hemmen, während der Translation nicht möglich ist. Entsprechende Ansätze wurden nach 20 min Translation auf Eis abgestoppt, mit 6 % (v/v) RM versetzt, weitere 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend für 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in 12 µl Quervernetzungspuffer resuspendiert, in zwei separate Aliquots zu 6 µl aufgeteilt und für weitere 20 min bei 30 °C in An- oder Abwesenheit von Puromycin-Lösung (Puromycin-Endkonzentration: 1,25 mM) inkubiert, welche die Freisetzung des Intermediates vom Ribosom bewirkt (Puhka *et al.*, 2007). Anschließend wurde allen Ansätzen 335 mM SMCC (Pierce) hinzugegeben und weitere 30 min bei 0 °C inkubiert.

Sollte der Einfluss inhibitorischer Substanzen auf den posttranslationalen Proteintransport getestet werden, wurde das gewünschte Volumen (1,1 µl) zusammen mit den ER-Membranen zum Ansatz hinzupipettiert und die Konzentration aller hinzugegebenen Komponenten (einschließlich Membranfraktionen) bezogen auf das Endvolumen des Transportansatzes berechnet. Folgte im Anschluss keine Sequestrierung (V.2.3.3.3), wurden die Proben mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, bei 56 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) und „phosphorimaging“ (V.2.1.6) analysiert.

Puromycin-Lösung

Puromycin/HCl	12,5 mM
Tris/HCl, pH 7,0	20 mM
GTP	12,5 mM
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	

Quervernetzungspuffer

Saccharose	200 mM
KOAc	50 mM
MgOAc	5 mM
Triethanolamin/HCl	50 mM
pH 7.4	

V.2.3.3.3. Proteaseresistenz und Sequestrierung

Ein erster Hinweis, dass der *in vitro* Import präsekretorischer Proteine in das ER-Lumen erfolgreich war, ist das Vorhandensein posttranslationaler Modifikation (z.B. Signalsequenzabspaltung oder N-Glykosylierung). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und „phosphorimaging“ der Transportansätze lassen sich derartige Veränderungen eindeutig identifizieren, da sich ein gewisser Anteil des radioaktiv markierten Proteins aufgrund eines veränderten Molekulargewichtes in Form einer Bande ober- oder unterhalb des Vorläuferproteins befindet. Dennoch ist die Tatsache, dass ein Protein

modifiziert wurde kein Beweis für einen Transport des selbigen über die ER-Membran. Daher wird sich zur weiteren Verifizierung der sogenannten Sequestrierung bedient. Ein Teil der Proben wird hierzu mit Proteinase K inkubiert und anschließend mit dem unbehandelten Ansatz verglichen. Wurde das Protein tatsächlich in ein schützendes, für die Protease unzugängliches membranumgebenes Kompartiment transportiert, dann sollte der modifizierte Anteil dieses Proteins resistent gegenüber proteolytischer Degradation sein (im Falle eines Transmembranproteins eine partielle Resistenz). Um ein falsch positives Ergebnis auszuschließen wird in einem zusätzlichen Ansatz Proteinase K in Kombination mit Triton X-100 hinzugefügt. Durch die Membran-solubilisierende Wirkung des nicht-ionischen Detergenz geht der Schutz gegenüber einer Spaltung wieder verloren und somit werden, falls das getestete Protein keine intrinsische Resistenz aufweist, alle Peptide degradiert.

Zur Durchführung einer Sequestrierung wurde ein *in vitro* Transportansatz (co- oder posttranslational) nach erfolgter Inkubation auf Eis abgestoppt und auf drei gleiche Volumina aufgeteilt. Diese wurden wiederum 1:2 entweder mit Saccharose-, mit Proteinase K- oder mit Proteinase K/TX-Lösung versetzt und sorgfältig gemischt. Nach Inkubation für 60 min auf Eis wurde 20 % (v/v) 100 mM PMSF (1 M in Ethanol) hinzugegeben und für weitere 5 min bei 0 °C inkubiert, um die Protease zu inhibieren. Die Ansätze wurden daraufhin mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert (V.2.1.1; V.2.1.6). In Abbildung 10 ist exemplarisch die *in vitro* Synthese (in MVP) bzw. der cotranslationale Transport (6 % RM) sowie die Sequestrierung des Präpro- α -Faktors (pp α F) in RM dargestellt. In Gegenwart von ER-Membranen erscheinen zwei prominente Banden (gekennzeichnet mit p α F und gp α F), welche im Gegensatz zum Vorläufer (pp α F) auch durch Proteinase K-Behandlung nicht verschwinden. Dabei handelt es sich unterhalb des Vorläufers um die durch die Signalpeptidase gespaltene und oberhalb um die zusätzlich N-glykosylierte Form. Zudem werden in Gegenwart von Detergenz (P + TX) alle Proteinfragmente degradiert. Die Triton X-100-Kontrolle wurde nur zur Etablierung eines Transportsubstrates verwendet und fand in den anschließenden Experimenten keine Anwendung mehr.

Im Fall von ppecA musste eine von der zuvor beschriebenen Prozedur abweichende Behandlung durchgeführt werden. Da die alleinige Verwendung von Proteinase K ein proteaseresistentes Fragment generiert, welches der Größe der prozessierten Form ppecA entspricht, war die Zugabe einer weiteren Protease (Trypsin) erforderlich. Diese Erweiterung des Spektrums an Schnittstellen bedurfte jedoch auch einer verstärkten Hemmung der proteolytischen Aktivität nach der Sequestrierung. Daher wurde zusätzlich zum verwendeten PMSF der Protease-Inhibitor PLAC, in einer 1:1.000-Verdünnung, (V.2.4.4) hinzugegeben.

V. Material und Methoden

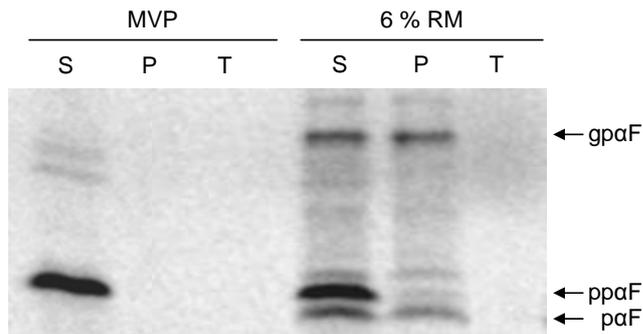


Abbildung 10: *In vitro* Synthese und Transport (cotranslational) von ppaF (Präpro- α -Faktor) in RM (6 %) mit anschließender Sequestrierung. (g = glykosyliert; MVP = Mikrosomenverdünnungspuffer; S = Saccharose-Lösung; P = Proteinase K-Lösung; T = Proteinase K/TX-Lösung). Bei paF handelt es sich um das in die ER-Vesikel importierte und durch die Signalpeptidase gesplante ppaF. gpaF wurde darüber hinaus N-glykosyliert.

Sequestrierlösungen:

Saccharose-Lösung

Saccharose 162,5 mM
in H₂O_{bidest.}

Proteinase K-Lösung

Saccharose 162,5 mM
Proteinase K 340 μ g/ml
in H₂O_{bidest.}

Proteinase K/TX-Lösung

Saccharose 162,5 mM
Proteinase K 340 μ g/ml
Triton X-100 0,2 % (w/v)
in H₂O_{bidest.}

Sequestrierlösungen für ppceca:

Proteinase K/Trypsin-Lösung

Saccharose 162,5 mM
Proteinase K 100 μ g/ml
Trypsin 100 μ g/ml
in H₂O_{bidest.}

Proteinase K/Trypsin/TX-Lösung

Saccharose 162,5 mM
Proteinase K 100 μ g/ml
Trypsin 100 μ g/ml
Triton X-100 0,2 % (w/v)
in H₂O_{bidest.}

V.2.4. Zellkulturtechniken

Werden Zellen aus einem Gewebe isoliert, können diese unter geeigneten Bedingungen und bei Versorgung mit entsprechenden Nährstoffen weiterwachsen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts gab es erste Ansätze, in denen Säugetierzellen in einer physiologischen Lösung mehrere Tage vom Organismus getrennt am Leben erhalten wurden (Wilhelm Roux). Diese Prozedur, die mittlerweile ein Standardverfahren in vielen Labors darstellt und allgemein als Zellkultur bezeichnet wird, wurde in den darauffolgenden Jahrzehnten immer weiter entwickelt. Dabei muss zwischen primären, also unmittelbar aus einem Gewebe entnommen Zellen und kontinuierlichen Zelllinien unterschieden werden. Denn um 1951 wurden mit der Cervixkarzinomzelllinie HeLa erstmals immortalisierte Zellen etabliert. Primäre Zellen ähneln zwar in ihren Eigenschaften stärker dem natürlichen Zustand, haben jedoch nur eine begrenzte Lebensdauer. Kontinuierliche Zelllinien hingegen, welche sich meist durch wachstumsbegünstigende Mutationen aus einer kleinen Population der primären Zellen nach vielfacher Subkultivierung heraus entwickeln können, sind jedoch in der Lage praktisch unendlich lang zu leben und sind meist leicht zu kultivieren. Nachteilig ist jedoch die Tatsache, dass diese Zellen meist im Zuge der Immortalisierung verschiedene genetische Transformationen erfahren haben, weswegen sie sich oft von den Ausgangszellen in ihrer Morphologie, der chromosomalen Zusammensetzung, ihrem Wachstumsverhalten und weiteren Eigenschaften unterscheiden (Cieciura *et al.*, 1956; Earle *et al.*, 1954; Puck *et al.*, 1956). Da Kulturzellen allgemein unter sehr definierten Bedingungen wachsen und einfach zu manipulieren sind (genetisch oder pharmakologisch), bietet dieses System neben einer hohen Reproduzierbarkeit etliche Möglichkeiten zur Erforschung physiologischer und biochemischer Prozesse auf zellulärer Ebene, welche im kompletten Organismus nicht oder zumindest schwer durchführbar wären. So lassen sich beispielsweise auch neue Wirkstoffe für die Krebstherapie entwickeln oder erste Hinweise auf die Pathogenität von Erregern gewinnen.

V.2.4.1. Kultivierung von Säugetierzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der adhärenenten Zelllinie HeLa bzw. HeLa-CES2 gearbeitet (V.1.7). Diese Zellen wurden der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes entnommen und in DMEM („Dulbecco's Modified Eagle's Medium“) mit GlutaMAXTM (L-Alanyl-L-Glutamin) kultiviert. Dem Medium wurde darüber hinaus 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) beigefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchte in 75 cm² Zellkulturflaschen. Um ein zu dichtes Wachstum der Zellen in der Kulturflasche zu verhindern und dadurch einen Nährstoffmangel zu vermeiden, wurden die HeLa-Zellen etwa alle zwei bis drei Tage, bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70-90 % ausgedünnt (subkultiviert). Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5-10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA (PBS mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA) für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Während Trypsin zur Plastikoberfläche gebundene Adhäsions-

proteine spaltet bewirkt EDTA als Chelator die Komplexierung von Ca^{2+} und begünstigt damit ebenfalls die Ablösung von Zellen, da die Struktur von bestimmten Oberflächenadhäsionsproteinen, wie den Cadherinen, ohne Ca^{2+} instabil wird und sie dadurch empfänglicher für einen proteolytischen Abbau werden. Nach Ablösen der Zellen wurde die Zellkulturflasche mit 8 ml Medium (auf insgesamt 10 ml) aufgefüllt und 1/5 des Volumens der Zellsuspension in der Flasche belassen. Diese Suspension wurde anschließend wieder mit ca. 15 ml Medium befüllt und die Zellen weiterkultiviert.

Zur Langzeitkonservierung von Zellen wurden Kryokulturen (in flüssigem Stickstoff) angefertigt. Hierzu wurden die Zellen für 3 min bei 2.000 rpm (GS-6KR Zentrifuge) in einem 15 ml Röhrchen zentrifugiert, in Kulturmedium (ohne FCS und P/S) gewaschen und dann in DMEM mit 10 % DMSO sowie 20 % FCS zu je 1,5 ml Aliquots mit $2,5 \times 10^6$ Zellen in vorgekühlte Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig durch Bedampfung mit evaporierendem Stickstoff eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff gelagert. Um entsprechende Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden diese rasch aufgetaut, in 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und 3 min bei 2.000 rpm zentrifugiert, um restliches DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in frisches Kulturmedium aufgenommen und in einer 75 cm² Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert. Vor einem Experiment wurden die Zellen nochmals 1:2 in zwei Zellkulturflaschen subkultiviert, damit sich die Zellen zwecks einer verbesserten Vergleichbarkeit, stets in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

V.2.4.2. Herstellung von dialysiertem fetalen Kälberserum

Fetales Kälberserum (FCS) wird als einer der Hauptbestandteile von Nährmedien hinzugesetzt. Es enthält neben einer Vielzahl anderer Proteine verschiedene Wachstumsfaktoren, die für das Kultivieren von Zellen erforderlich sind (Tozer und Pirt, 1964). Zudem beinhaltet es auch freie Aminosäuren, die jedoch den effizienten Einbau modifizierter Aminosäuren (V.2.1.11) während der Biosynthese eines Proteins stören können. Durch eine Dialyse können solche Aminosäuren aus dem FCS entfernt werden. Ein Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvermögen von 10 kDa wurde zunächst in einer Lösung mit 2 % Natriumbicarbonat und 1 mM EDTA ausgekocht und dann über Nacht in 1 l autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ unter Zugabe von 1 mM EDTA inkubiert. Anschließend wurde der Schlauch unter der Sterilbank mit autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen, an einem Ende verknotet, mit 40 ml FCS gefüllt und das andere Ende mit einer Schlauchklemme geschlossen. Das FCS wurde 3 h bei 4 °C gegen 1 l PBS dialysiert, wobei das PBS jede Stunde gewechselt wurde. Anschließend wurde die Dialyse in 2 l PBS über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde das FCS unter keimfreien Bedingungen zu je 5 ml aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

V.2.4.3. Zellzählungsmethoden

Die Quantifizierung von Zellen war unter mehreren Gesichtspunkten erforderlich. Zum einen musste gewährleistet werden, dass die Anzahl ausgesäter Zellen vor einer Transfektion (V.2.4.6) im optimalen Verhältnis zum Volumen sowie der Konzentration zugesetzter Reagenzien vorlag, um eine maximale Effizienz zu garantieren. Zudem konnte dadurch eine gewisse Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Experimenten erreicht werden. Eine Zellzählung nach einem Experiment diente einerseits der Bestimmung der Viabilität unterschiedlich behandelter Ansätze sowie der Erlangung der Kenntnis über die einzusetzenden Volumina an Puffer für eine nachfolgende SPZ-Präparation bzw. eine Zellextrakt-aufbereitung. Die Auszählung von Zellen wurde stets in Form einer lichtmikroskopischen Bestimmung der Teilchenzahl pro Volumeneinheit mit Hilfe einer Zählkammer durchgeführt. Hierbei wurde nach je nach Bedarf entweder die Zählung per Neubauerzählkammer oder aber die elektronisch unterstützte Zellzählung mittels „Countess[®] Automated Cell Counter“ angewendet. In beiden Fällen wurde die Zellsuspension in Trypanblaulösung verdünnt, wodurch neben der eigentlichen Gesamtzellzahl der Anteil toter Zellen (blau gefärbt) bestimmt werden konnte, da der Farbstoff die Plasmamembran nur bei fehlender zellulärer Integrität passieren kann.

V.2.4.3.1. Neubauerzählkammer

Durch Trypsin/EDTA abgelöste Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und ein Aliquot von 10 µl je nach Zelldichte in einem Verhältnis von 1:4 bzw. 1:8 mit Trypanblaulösung (Gibco) gemischt. In gleicher Form wurden auch mit Digitonin behandelte Zellen in KHM-Puffer (V.2.4.5) vorbereitet. Die möglichst staubfreie Neubauerzählkammer wurde auf einen stabilen Untergrund gelegt und ein Deckglas mit leichtem Druck im Querformat auf die beiden Trägerstege aufgeschoben. Sitzt das Deckglas richtig, sind die sogenannten Newton'schen Ringe zu erkennen. Unter diesen Bedingungen verrutscht das Deckglas nicht mehr und der Abstand zwischen den Glasflächen ist korrekt. Dann wurden ca. 10 µl der nochmals sorgfältig gemischten Trypanblau-Zellsuspension am Rand des Deckglases in die Öffnung zwischen diesem und der Zählkammer pipettiert. Dabei zieht sich die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte von selbst in die Öffnung und das zu pipettierende Volumen sollte dem zur Verfügung stehenden Volumen des Zwischenraums entsprechen, um eine anschließend verlässliche Bestimmung der Zellzahl gewährleisten zu können. Nach mikroskopischer Auszählung der vier vorgegebenen, quadratischen Felder wurden die Werte gemittelt und mit dem o.g. Verdünnungsfaktor multipliziert. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten wurde diese Zahl wiederum mit dem Faktor 10.000 multipliziert, da jedes der Zählfelder einem Flüssigkeitsvolumen von 0,1 µl entspricht.

V.2.4.3.2. „Countess[®] Automated Cell Counter“

Für die Zellzählung mittels „Countess[®]“ wurden die Zellen in gleicher Weise wie für die Zählung mit der Neubauerzählkammer (V.2.4.3.1) vorbereitet, mit dem Unterschied, dass hierbei eine Verdünnung der Zellsuspension von lediglich 1:2 in sterilfiltrierter Trypanblaulösung (Invitrogen) angesetzt wurde. Nach dem Einsetzen der Zählkammer, die in ähnlicher Weise wie unter Punkt V.2.4.3.1 beschrieben befüllt wird, kann über einen Monitor, der mit einer Kamera verbundenen ist, der Bildfokus nachjustiert werden, so dass die Kontur der Zellen scharf zu sehen ist. Die anschließende, automatisierte Zellzählung (Verdünnungsfaktor eingerechnet) durch das Gerät, die im Prinzip der Zählung mittels Neubauer-kammer gleicht, lieferte neben der Gesamtzellzahl den prozentualen Anteil lebender und toter Zellen sowie den mittleren Zelldurchmesser als weiteren Parameter.

V.2.4.4. Zellextraktzubereitung

Um die Zellen nach der Ernte und dem Auszählen für eine Auftrennung mittels SDS-PAGE vorzubereiten, wurden diese für 2 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in Lysepuffer resuspendiert, so dass eine Konzentration von 12.500 Zellen/ μ l resultierte. Nach Lyse der Zellen für 10 min auf Eis wurde 5-fach konzentrierter Lämmli-Probenpuffer (V.2.1.1) in einem Verhältnis von 1:4 hinzugegeben, was letztlich eine Zellkonzentration von 10.000 Zellen pro μ l ergab. Die Probe wurde anschließend zur Denaturierung für 15 min bei 56 °C erhitzt und zur Fragmentierung genomischer DNA weitere 20 min mit „Glasbeads“ auf dem Vortex-Mixer geschüttelt.

Lysepuffer

NaCl	100 mM
Tris, pH 8,0	100 mM
MgCl ₂	30 mM
Nonidet-P40	5 %
PLAC	1:10.000

in H₂O_{bidest.}

PLAC-Lösung

Pepstatin A	3 mg/ml
Leupeptin	3 mg/ml
Antipain	3 mg/ml
Chymostatin	3 mg/ml
in DMSO	

V.2.4.5. Herstellung semi-permeabilisierter Zellen (SPZ)

Semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) stellen neben Hundepankreasmikrosomen (RM) ein weiteres Testsystem für den co- oder posttranslationalen *in vitro* ER-Import diverser Vorstufenproteine dar. Der Vorteil dieser Variante besteht in der Möglichkeit die Genexpression der Zellen zuvor mittels Plasmid- oder siRNA-Transfektion transient zu manipulieren und somit ein weitaus breiteres Spektrum an potentiellen Fragestellungen bearbeiten zu können. Zur Präparation dieses zellulären ER wurde ein Verfahren, basierend auf einer Methode von Wilson *et al.*, angewandt (Wilson *et al.*, 1995). Ein ent-

scheidender Schritt hierbei ist die Verwendung des nicht-ionischen Detergenzes Digitonin. Neben seiner Fähigkeit biologische Membranen zu solubilisieren, weist es die besondere Eigenschaft auf mit hoher Affinität an Cholesterin zu binden (Eilenberg *et al.*, 1989). Dieses Sterol befindet sich fast ausschließlich in der Plasmamembran von Säugetierzellen und dient dort insbesondere der Stabilisierung. In geeigneter Konzentration verabreicht lagert sich Digitonin somit nur an das in der Plasmamembran befindliche Cholesterin und permeabilisiert ausschließlich diese Lipiddoppelschicht, nicht jedoch die nahezu cholesterinfreie, intrazelluläre ER-Membran. Durch mehrere Waschschrte kann nun die zytosolische Fraktion entfernt werden und übrig bleibt ein intaktes ER-Kompartiment, umgeben von einer perforierten Plasmamembran. Da verbleibende mRNA in einer anschließenden *in vitro* Translation stören würde, wird diese durch eine zusätzliche Nukleasebehandlung (S7 Nuklease, Roche) vollständig degradiert. Die SPZ können nun in ähnlicher Weise wie die RM zusammen mit Kaninchen-Retikulozytenlysat für die kombinierte *in vitro* Synthese und den ER-Transport von Proteinen eingesetzt werden (V.2.3.3).

Für die Präparation von SPZ wurden unbehandelte oder zuvor transfizierte HeLa-Zellen (V.2.4.6) in 6 cm Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ für eine gewünschte Dauer kultiviert, mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA überschichtet. Nach Ablösen der adhärenen Zellen durch Inkubation für 5 min bei 37 °C wurden diese in 9 ml KHM-Puffer mit 100 µg/ml Trypsin-Inhibitor aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übernommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels „Countess[®]“ erfolgte eine Zentrifugation (GS-6KR Zentrifuge) für 3 min bei 2.000 rpm. Das Zellpellet wurde daraufhin in 6 ml eiskaltem KHM-Puffer resuspendiert und 1 µl Digitonin-Lösung pro 1 x 10⁶ Zellen hinzugegeben. Somit konnte die Konzentration an Digitonin der jeweiligen Zellzahl unterschiedlicher Ansätze angepasst werden. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 0 °C inkubiert, mit 8 ml eiskaltem KHM-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Überstand, der nun die zytosolische Fraktion der Zellen enthalten sollte, wurde verworfen und die permeabilisierten Zellen in 14 ml eiskaltem HEPES-Puffer aufgenommen, welche wiederum für 10 min auf Eis inkubiert wurden. Nach anschließender Zentrifugation für 3 min bei 2.000 rpm wurde das Zellpellet, nach Verwerfen des Überstandes, in 1 ml KHM-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals 3 min bei 4.500 rpm in der Kühlzentrifuge 5415 R zentrifugiert. Die Zellen wurden in 150 µl KHM-Puffer aufgenommen und mit 0,5 µl CaCl₂-Lösung sowie 1 µl Nuklease-Lösung versetzt und 12 min bei RT zum Abbau zellulärer RNA inkubiert. Zum Abstoppen der Ca²⁺-abhängigen Reaktion wurden 2 µl EGTA-Lösung hinzugegeben. Die Suspension wurde mit 1 ml eiskaltem KHM-Puffer aufgefüllt und erneut 3 min bei 4.500 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Pellet sorgfältig, unter Berücksichtigung des Eigenvolumens in 1 ml eiskaltem KHM-Puffer resuspendiert und die Zellen mittels „Countess[®]“ ausgezählt (3-fache Bestimmung). Dabei diente das Trypanblau in diesem Fall als Kontrolle einer adäquaten Permeabilisierung, da entsprechende Zellen aufgrund fehlender Integrität der Plasmamembran eine deutliche Blaufärbung aufweisen sollten. Nach abschließender Zentrifugation für 3 min bei 4.500 rpm wurden die SPZ in einer Konzentration von 40.000 Zellen/µl in KHM-Puffer

V. Material und Methoden

resuspendiert (auch hier muss das Eigenvolumen des Pellets einkalkuliert werden) und konnten nun für ein *in vitro* Translokations-Experiment verwendet werden. Um den Gehalt bestimmter Proteine in diesen Zellen mittels Western-Blot und Immundetektion (V.2.1.4, V.2.1.5) zu überprüfen wurden die SPZ vor einer gelelektrophoretischen Auftrennung (V.2.1.11) 1:3 in Lämmli-Probenpuffer (Endkonzentration: 10.000 Zellen/ μ l) verdünnt und für 15 min bei 56 °C erhitzt.

KHM-Puffer

Kaliumacetat	110 mM
Magnesiumacetat	2 mM
HEPES/KOH, pH 7,2	20 mM

HEPES-Puffer

Kaliumacetat	50 mM
HEPES/KOH, pH 7,2	90 mM

Trypsininhibitor-Lösung

Trypsin-Inhibitor	50 mg/ml
in H ₂ O _{bidest.}	

Digitonin-Lösung

Digitonin	40 mg/ml
in DMSO	

CaCl₂-Lösung

CaCl ₂	200 mM
in H ₂ O _{bidest.}	

EGTA-Lösung

EGTA	200 mM
in H ₂ O _{bidest.}	

Nuklease-Lösung

S7 Nuklease	4.000 U/ml
in H ₂ O _{bidest.}	

V.2.4.6. Transfektionsmethoden

Das Einbringen exogener DNA oder RNA in Säugetierzellen wird als Transfektion bezeichnet. Diese kann entweder transient (vorübergehend) oder auch stabil erfolgen (z.B. durch Integration ins Genom der Wirtszelle oder mittels Plasmid-kodierter Antibiotikaresistenz), wobei im Folgenden ausschließlich auf die erste Variante eingegangen wird. Neben gängigen Methoden wie der Calciumphosphat-Präzipitation und der Elektroporation wird auch häufig die als Lipofektion bezeichnete Art der Transfektion angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Formen der Transfektion, die von siRNA (V.2.4.6.1) oder Plasmid-DNA (V.2.4.6.2), basierend auf dem Prinzip der Lipofektion durchgeführt. Diese Methode ermöglicht das Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen mit Hilfe von Liposomen. Dabei kann die DNA oder RNA entweder in Vesikeln eingeschlossen oder an der Oberfläche kationischer Vesikel angelagert sein. In beiden Fällen wird der Inhalt bzw. die Fracht durch Fusion mit der Plasmamembran in die Wirtszelle abgegeben.

V.2.4.6.1. siRNA-Transfektion

Um die Expression ausgewählter Gene und damit die Synthese der korrespondierenden Proteine in Säugetierzellen signifikant zu reduzieren, ohne dabei aufwendige Manipulationen des Genoms mit potentiell letalem Phänotyp durchführen zu müssen („gene knockout“), wurden Zellen mit siRNA („small interfering“ RNA) transfiziert. Diese nichtkodierende, doppelsträngige RNA (dsRNA) mit einer Länge von 21-22 Nukleotiden (nt) spielt eine entscheidende Rolle bei der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi), einer sequenzspezifischen, posttranskriptionalen Form der Genstilllegung (Elbashir, 2001). Dieser ursprünglich im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckte hochkonservierte Mechanismus tritt in allen mehrzelligen, eukaryotischen Organismen auf und übt verschiedenste regulatorische Funktionen aus (Fire *et al.*, 1998; Hannon, 2002). Dazu gehört die Regulation der zelleigenen Genexpression, sowohl im adulten Organismus als auch bereits während der Entwicklung. Und darüber hinaus bietet die RNAi auch einen Schutz gegenüber schädlicher dsRNA, wie beispielsweise nach einer viralen Infektion oder auch gegenüber endogener dsRNA, wie die RNA-Zwischenstufe mobiler Genabschnitte, sogenannter Transposons (Hamilton und Baulcombe, 1999; Moazed, 2009; Pressman *et al.*, 2007). Grundsätzlich werden alle dsRNA-Moleküle, unabhängig von Herkunft und Länge, durch den sogenannten Dicer-Enzymkomplex, welcher zwei RNase III-Domänen enthält, in 21-22 bp Fragmente mit charakteristischen Zwei-Basen-Überhängen am 3'-Ende prozessiert (Filipowicz *et al.*, 2005; Tomari und Zamore, 2005). Diese kurzen dsRNA-Fragmente besitzen zwei komplementäre RNA-Stränge, den Sinnstrang („passenger“) und den Antisinnstrang („guide“). Die gespaltenen, kurzen dsRNA-Moleküle werden anschließend vom Dicer-Enzymkomplex auf den RISC-Komplex („RNA-induced silencing complex“) übertragen, wodurch der sogenannte prä-RISC-Komplex entsteht. Dort wird die Degradation des Sinnstranges durch das Argonautprotein, einer Untereinheit des RISC-Komplexes, vermittelt, welches über seine PAZ-Domäne an die dsRNA bindet. Der übriggebliebene Antisinnstrang rekrutiert den so entstandenen Holo-RISC-Komplex, in Form eines Adapters, zur entsprechenden Ziel-mRNA, wo er über komplementäre Basenpaarung bindet. Durch eine Endonuklease-spezifische Spaltung der mRNA mit Hilfe der RNaseH-ähnlichen PIWI-Domäne des Argonautproteins wird die mRNA letztlich vollständig abgebaut und somit indirekt eine spezifische Inhibition der Proteinsynthese herbeigeführt (Kim *et al.*, 2007). Wie Andrew Fire und Craig C. Mello 1998 zeigen konnten, ist es möglich, durch Einführen synthetischer siRNA, also kurzer dsRNA, in Säugetierzellen ebenfalls RNAi artifiziell zu induzieren, was diese Moleküle zu einem ausgezeichneten molekularbiologischen Werkzeug zur Untersuchung zellulärer Funktionen macht (Elbashir *et al.*, 2001; Fire *et al.*, 1998).

Zu transfizierende Zellen wurden einen Tag vor dem Experiment 1:2 in eine 75 cm² Zellkulturflasche passagiert, damit sich diese am Folgetag in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Entsprechende Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst, in frisches Kulturmedium aufgenommen und ausgezählt (V.2.4.3.2). In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde eine Verdünnung der Zellsuspension auf 1,55 x 10⁵ Zellen/ml hergestellt und die Zellen entweder in 3,5 cm

V. Material und Methoden

(ca. 300.000 Zellen; 1,9 ml) oder 6 cm (ca. 600.000 Zellen; 3,9 ml) Zellkulturschalen ausgesät. Zur Transfektion wurde pro Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 106 µl zuerst ein entsprechendes Volumen OptiMem (ohne Serum und Antibiotika) vorgelegt und dann die gewünschte Konzentration an einer zuvor gelösten siRNA (V.1.5.2) hinzugegeben, wobei diese stets als Stocklösung mit einer Konzentration von 20 µM angesetzt wurde und finale Konzentrationen (kompletter Ansatz) zwischen 10 und 35 nM verwendet wurden. Zuletzt wurden 20 µl des kationischen Lipidtransfektionsreagenzes HiPerFect® (Qiagen) hinzugegeben, 5 s mittels Vortex-Mixer gemischt und der Ansatz zur Komplexbildung 10 min bei RT inkubiert.

Transfektionsansatz:

OptiMEM®	ad 100 µl
siRNA (20 µM)	10-35 µl
HiPerFect®	20 µl
<hr/>	
Gesamt	106 µl

Zusätzlich wurde auch stets ein identischer Ansatz mit einer Kontroll siRNA pipettiert. Diese besitzt keinerlei Homologie zu potentiellen Zielsequenzen im humanen Genom und wurde daher immer als Referenz mitgeführt. Nach erfolgter Inkubation der Transfektionsansätze wurden diese tropfenweise auf die bereits ausgesäten Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschale gleichmäßig in der Zellsuspension verteilt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und bei Inkubationen darüber hinaus, zur Erhöhung der Depletionseffizienz, mit einem zweiten Transfektionsansatz (in gleicher Weise vorbereitet) transfiziert. Hierbei wurde lediglich das Kulturmedium von den bereits adhärennten Zellen abgesaugt, durch frisches Medium ersetzt und der Ansatz, wie oben beschrieben, hinzupipettiert. Die Kultivierung erfolgte je nach Bedarf und Effizienz der Depletion 24-144 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Zellen wurden zu entsprechenden Zeitpunkten entweder vollständig, oder teilweise, im Fall von Ca²⁺-Messungen (V.2.6.1, V.2.6.3), geerntet, ausgezählt (V.2.4.3.2) und nach SDS-PAGE (V.2.1.1) und Western-Blot (V.2.1.4) mittels immunologischer Detektion mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (V.2.1.5). Zur Etablierung neuer siRNAs wurden unterschiedliche Konzentrationen sowie Inkubationszeitpunkte in Form einer Kinetik getestet, um die individuell optimalen Bedingungen (geringstmögliche Konzentration und Dauer bei gleichzeitig hoher Depletionseffizienz) zu ermitteln. Zudem wurden verschiedene siRNAs (mindestens zwei) gegen die gleiche mRNA verwendet, um die Spezifität resultierender Phänotypen zu gewährleisten. Dabei spielt es keine Rolle, ob die siRNA gegen den ORF („open reading frame“) oder die UTR („untranslated region“) der mRNA von Interesse gerichtet ist. In Abbildung 11 ist eine derartige Kinetik bzw. Titration für die Behandlung von HeLa-Zellen mit zwei verschiedenen *BIP*-UTR siRNAs dargestellt.

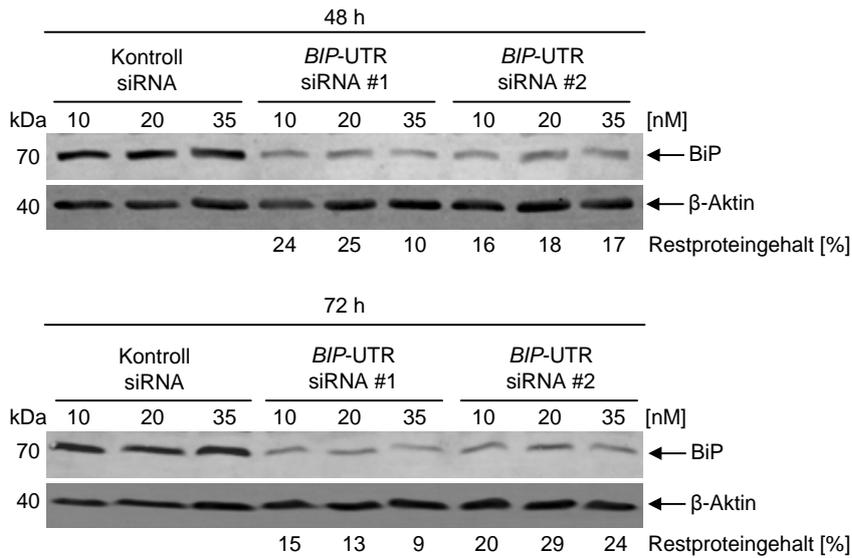


Abbildung 11: Immundetektion einer mittels SDS-PAGE aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran transferierten Konzentrationsreihe siRNA transfizierter HeLa-Zellen ($3,0 \times 10^5$ Zellen pro Spur). 6×10^5 Zellen wurden jeweils in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und entweder mit einer Kontroll siRNA oder einer von zwei BIP-UTR siRNAs (10-35 nM) für 48 und 72 h transfiziert. Zum immunologischen Nachweis wurde ein Kaninchen-anti-BiP-Antiserum (1:500, in 3 % Magermilch) sowie ein Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Als Ladekontrolle diente das Zytoskelettprotein β -Aktin. Hierfür wurde ein monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und ein sekundärer Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte jeweils mittels Typhoon TrioTM Scanner. Der jeweils unter den Gelspuren angezeigte Restproteingehalt (%) bezieht sich immer auf die entsprechende Kontroll siRNA mit der gleichen Konzentration.

V.2.4.6.2. Plasmid-Transfektion

Plasmide sind extragenomische, zirkuläre DNA-Moleküle und können als Vektoren zur Amplifikation und Expression diverser Gene dienen. Durch die autonome Replikation, die variable Kopienzahl („single“ oder „multi copy“ Vektoren) und die individuelle Wahl unterschiedlich starker Promotoren kann je nach System eine gewünschte Expression von Genen bzw. cDNAs erfolgen. Um einen effizienten Transfer von Plasmiden in Kulturzellen zu gewährleisten wurde in dieser Arbeit das Lipidtransfektionsreagenz FuGENE[®] HD (Roche) verwendet. Durch Komplexierung der DNA mit Lipidmolekülen wird eine wirkungsvolle Passage ins Zellinnere und letztlich zum Nukleus, dem Ort der Transkription der genetischen Information, ermöglicht. Die Transfektion von Zelllinien hatte im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich den Zweck eine cDNA mit wildtypischer oder mutierter Information eines Gens von Interesse entweder überzuexprimieren oder die Rettung einer parallel verlaufenden Genstilllegung (V.2.4.6.1) zu bezwecken. Ein Rettungsexperiment gilt auch allgemein als eine der zuverlässigsten Kontrollen auf Spezifität einer siRNA-vermittelten Proteindepletion und wurde daher, wenn möglich, immer durchgeführt. Darüber hinaus bietet diese Kontrolle die Möglichkeit gezielt Punkt- oder Deletionsmutanten des wildtypischen Allels im Depletionshintergrund auf Funktionalität spezifischer Domänen zu testen.

V. Material und Methoden

Zur Transfektion von mit einem aus *E. coli* DH5 α aufgereinigten Expressionsplasmid (V.1.6.1, V.1.8, V.2.2.9) wurden HeLa-Zellen 1:2 in eine 75 cm² Zellkulturfalsche passagiert und am nächsten Tag, bei einer Konfluenz von ca. 80 %, mittels Trypsin/ETDA-Behandlung (V.2.4.4) abgelöst und zum Auszählen (V.2.4.3) in frischem Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen auf eine Zellzahl von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt und 4 ml (600.000 Zellen) in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Diese wurden anschließend vor der eigentlichen Transfektionsprozedur für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde der Transfektionsansatz wie folgt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

OptiMEM [®]	ad 180 μ l
Plasmid-DNA (1 μ g/ml)	4 μ l
FuGENE [®] HD	16 μ l
<hr/>	
Gesamt	200 μ l

Der Ansatz wurde mittels Vortex-Mixer gemischt und zur Komplexbildung für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dieser tropfenweise auf die bereits am Vortag ausgesäten adhärenen HeLa-Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der Kulturschale gleichmäßig im Medium verteilt. Die transfizierten Zellen wurden zur Expression des Plasmids je nach Bedarf 48-120 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für ein Rettungsexperiment wurden zuvor mit entsprechender siRNA transfizierte (entweder 24 oder 32 h nach Ersttransfektion, abhängig vom Experiment), adhärenen Zellen (V.2.4.6.1) in gleicher Weise wie oben beschrieben zusätzlich mit Plasmid transfiziert und gemäß der Restdauer der siRNA-vermittelten Proteindepletion weiterkultiviert.

Nahezu alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide verfügen über eine sogenannte IRES-Sequenz („internal ribosome entry site“) die zwischen der multiplen Klonierungstelle (MCS), im Falle des Kontrollvektors, bzw. der einklonierten cDNA-Sequenz und einer in 3'-Richtung befindlichen GFP-Sequenz lokalisiert ist. Diese Sequenz erlaubt eine Translationsinitiation, und somit die Bindung eines Ribosoms, innerhalb der mRNA-Sequenz unabhängig von der 5'-Cap-Struktur. Dadurch sind die genannten Plasmide in der Lage die GFP-Sequenz zu exprimieren und zeigen dadurch eine grüne Fluoreszenz. Diese kann dazu genutzt werden die Transfektionseffizienz der Plasmide in den Zellen mikroskopisch zu bestimmen. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, lag diese durchschnittlich bei 70-80 %. Die Zellen wurden nach erfolgter Kultivierung für entsprechende Experimente eingesetzt und ein Teil der Probe zur Expressionkontrolle mittels SDS-PAGE aufgetrennt (V.2.1.1) und nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (V.2.1.4) immunologisch analysiert (V.2.1.5).

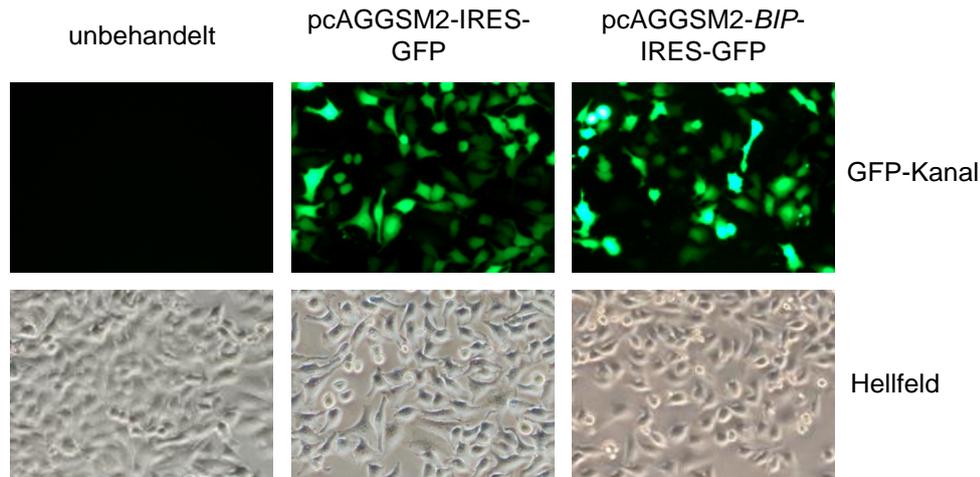


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Plasmidtransfektionseffizienz von HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und entweder mit Kontroll-Plasmid (pcAGGSM2-IRES-GFP) oder *BIP*-Expressionsplasmid (pcAGGSM2-*BIP*-IRES-GFP) transfiziert bzw. keiner weiteren Behandlung (unbehandelt) unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Danach wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv). Zellen mit GFP-Fluoreszenz repräsentieren hierbei erfolgreich mit Plasmid transfizierte HeLa-Zellen. (GFP = Grün fluoreszierendes Protein; IRES = interne Ribosomen-Eintrittsstelle).

V.2.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Fluoreszenz stellt ein optisches Phänomen dar, bei dem ein System (Fluorophor) Energie in Form von Photonen absorbiert und infolgedessen wieder Photonen niedrigerer Energie (größerer Wellenlänge) emittiert. Gemäß der sogenannten Stokes-Verschiebung, werden die delokalisierten π -Elektronen eines Fluorophors durch die Absorption der Photonen in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Dieser hält jedoch nur für sehr kurze Zeit an, woraufhin diese Elektronen wieder in den günstigeren Grundzustand zurückversetzt werden. Bei diesem Vorgang wird die überschüssige Energie in Form von Wärme sowie einer Emission von Licht einer für den Fluorophor spezifischen Wellenlänge abgegeben, welche folglich, aufgrund der niedrigeren Energie, höher ist als die Absorptionswellenlänge. Für standardmäßige Fluoreszenzaufnahmen wurde das Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE 2000-S (Nikon) verwendet.

Verwendete Filter:

<i>Filter</i>	<i>Exzitation (nm)</i>	<i>Dichroische Trennung (nm)</i>	<i>Emission (nm)</i>
DAPI	340-380	400	435-485
FITC	465-495	505	515-555
TRITC	528-552	565	582-627
TexR	540-580	595	600-660

Verwendete Objektive:

- Plan Fluor 10x/0,3
- Plan Fluor ELWD 20x/0,45
- Plan Fluor 60x oil/1,25

Zur digitalen Visualisierung und Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde die vom Hersteller mitgelieferte Software NIS Elements AR 2.3 oder 3.0 verwendet.

V.2.5.1. ER-Tracker™- Färbung zur Untersuchung der ER-Morphologie

Zur Visualisierung der ER-Struktur wurde der im blauen Wellenlängenbereich fluoreszierende Lebzell-Farbstoff „ER-Tracker™ Blue-White DPX“ verwendet. Um Auswirkung einer Protein-depletion auf die ER-Morphologie zu untersuchen wurden die Zellen nach erfolgter siRNA Behandlung (V.2.4.6.1) mit dem Farbstoff gefärbt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die zuvor frisch angesetzte Färbelösung („ER-Tracker™ Blue-White DPX“ 1:1.000 in HBSS) wurde auf 37 °C vorgewärmt und auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die folgende Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen und mit dem gleichen Puffer überschichtet. HBSS („hanks buffered salt solution“) wird vom Hersteller als Puffer für die „ER-Tracker™ Blue-White DPX“-Färbung empfohlen. Dieser Puffer ist relativ komplex zusammengesetzt und wurde bei Bedarf frisch aus fünf dafür vorbereiteten Stocklösungen angesetzt, welche stets bei 4 °C gelagert wurden.

Stocklösung 1

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
ad H ₂ O _{bidest.}	100 ml

Stocklösung 2

Na ₂ HPO ₄	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
ad H ₂ O _{bidest.}	100 ml

Stocklösung 3

CaCl ₂	0,72 g
ad H ₂ O _{bidest.}	50 ml

Stocklösung 4

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,23 g
ad H ₂ O _{bidest.}	50 ml

Stocklösung 5

NaHCO ₃	0,35 g
ad H ₂ O _{bidest.}	10 ml

<u>Hank's Prämix</u> (Lösungen in folgender Reihenfolge pipettieren)		<u>HBSS (vollständig)</u> (vor Verwendung pipettieren)	
Stocklösung 1	10 ml	Hank's Prämix	9,9 ml
Stocklösung 2	1 ml	Stocklösung 5	0,1 ml
Stocklösung 3	1 ml		
H ₂ O _{bidest.}	86 ml		
Stocklösung 4	1 ml		

V.2.5.2. Untersuchung der Zellviabilität und -vitalität

Die Viabilität oder auch Lebensfähigkeit von Zellen gibt an, wie hoch der Anteil lebender und toter Zellen in einer Zellpopulation ist. Dieses Verhältnis kann über Auszählen und Vergleichen unterschiedlicher Ansätze sowie durch den Anteil Trypanblau-gefärbter Zellen ermittelt werden (V.2.4.3). Eine weitere Möglichkeit der Viabilitätsbestimmung, die auf dem gleichen Grundprinzip wie die Trypanblau-Färbung basiert, jedoch etwas genauer ist, stellt die Färbung und fluoreszenzmikroskopische Analyse mittels Nuclear-ID™ Reagenz dar (V.2.5.2.1). Die Vitalität hingegen gibt den physiologischen Zustand von lebenden Zellen wieder und somit deren metabolische Aktivität. Zur Messung dieser Aktivität kann der unter Punkt V.2.5.2.2 beschriebene WST-1-„assay“ zurate gezogen werden.

V.2.5.2.1. Bestimmung der Zellviabilität mittels Nuclear-ID™ Reagenz

Das „Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability“-Reagenz ermöglicht die Bestimmung der Viabilität von Kulturzellen. Dieser „assay“ beruht, wie die Trypanblau-Färbung, auf dem Fakt, dass tote Zellen die Integrität ihrer Plasmamembran verlieren. Die Lösung enthält daher zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlicher Absorptions- bzw. Emissionswelle, die beide in der Lage sind, an Chromatin zu binden und somit den Kern einer Zelle zu visualisieren. Während der im DAPI-Bereich fluoreszierende (blaue) Farbstoff (V.2.5) zellpermeabel ist und somit stets alle Zellkerne anzufärben vermag handelt es sich beim zweiten, grünfluoreszierenden Farbstoff um eine zellimpermeable Substanz. Somit ist der letztere lediglich imstande Zellkerne toter Zellen anzufärben, da deren Plasmamembran defekt ist. Werden nun alle blau- sowie grünfluoreszierenden Kerne ausgezählt und ins Verhältnis (grün/blau) gesetzt ergibt sich der prozentuale Anteil toter Zellen bzw. durch Subtraktion von der Gesamtzellzahl der prozentuale Anteil lebender Zellen.

Zur Durchführung einer Viabilitätsbestimmung mit dem Nuclear-ID™-Reagenz wurden HeLa-Zellen einer siRNA- oder Plasmid-Transfektionsprozedur unterzogen (V.2.4.6), mit dem Unterschied, dass vor dem Aussäen der Zellen ein autoklaviertes 25 mm Deckglas in eine 6 cm Zellkulturschale ausgelegt und für 1-2 h mit 200 µl Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet wurde. Dieses wurde anschließend zweimal mit sterilem H₂O_{bidest} gewaschen. Nach erfolgter Inkubation entsprechender Zellen, wurden diese

zweimal mit PBS gewaschen und in 1 ml Färbelösung (Nuclear-ID™ 1:1.000 in PBS) für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das feuchte Deckglas wurde umgedreht auf einen Objektträger gelegt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Ein Ansatz wurde hierfür stets doppelt bestimmt.

V.2.5.2.2. Bestimmung der Zellvitalität mittels WST-1-„assay“

Der WST-1-„assay“ („water soluble tetrazolium“) ist ein kolorimetrischer Zellvitalitätstest der auf der Spaltung des wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) durch mitochondriale Dehydrogenasen, insbesondere der Succinat-Dehydrogenase (Enzymkomplex II der Atmungskette), basiert. Das schwach gelb gefärbte WST-1 wird durch die enzymatische Reaktion in das dunkelgelbe Formazan umgesetzt (Abbildung 13), welches mit Hilfe eines Spektralphotometers quantifiziert werden kann. Da gesunde Zellen eine höhere metabolische Aktivität aufweisen als weniger vitale Zellen ist dieser Substratumsatz direkt proportional zur Vitalität der Zellen (Francoeur A, 1996). Für einen WST-1-„assay“ wurden HeLa-Zellen wie unter Punkt V.2.1.11 beschrieben unter verschiedenen Bedingungen in einer 6 well-Zellkultur-Multiwellplatte kultiviert. Vor einer photometrischen Messung wurde das Kulturmedium von den adhären Zellen entfernt und 2 ml 10 % WST-1-Reagenz (in DMEM + 10 % FCS und 1 % P/S) hinzupipettiert. Die Ansätze wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und nach 20, 40 und 60 min mittels Spektralphotometer mit integriertem Plattenleser (Tecan) gemessen. Hierzu wurde die Absorption der Proben bei 450 nm gegen eine Referenz bei 650 nm bestimmt und zusätzlich mit einer parallel mitgeführten Mediumkontrolle abgeglichen. Zur Bestimmung der Vitalität konnten nun die erhaltenen Absorptionswerte der zu untersuchenden Ansätze ins Verhältnis zu denen eines Kontrollansatzes gesetzt werden (siehe Abbildung 8). Zur statistischen Absicherung der Messdaten wurde stets eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

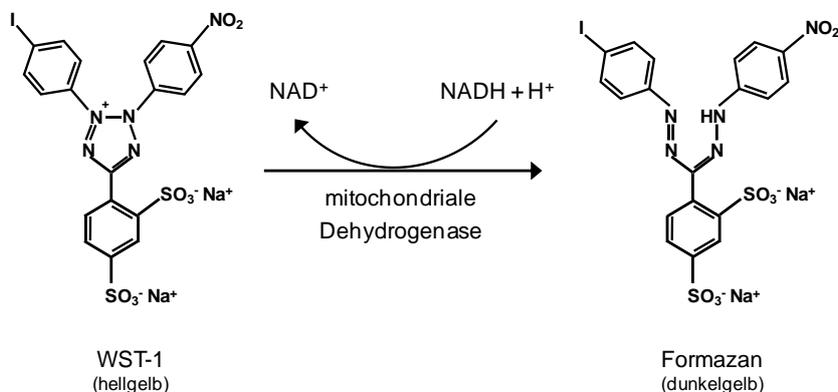


Abbildung 13: Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zu Formazan.

V.2.6. Echtzeit-Messungen von zellulärem Calcium - Ca²⁺-„imaging“

Bei der intrazellulären Übermittlung von Signalen spielt Calcium (Ca²⁺) als sekundärer Botenstoff eine entscheidende Rolle. Eine räumlich wie auch zeitlich hochauflösende Methode zur Untersuchung von Ca²⁺-Fluktuationen ist daher eine wichtige Voraussetzung zum besseren Verständnis zellulärer Abläufe. Zur Visualisierung von Änderungen der Ca²⁺-Konzentration innerhalb von Zellen wurde das sogenannte Ca²⁺-„imaging“ als bildgebendes Verfahren angewendet. Diese Technik nutzt die Eigenheit sogenannter Ca²⁺-Indikatoren, ihre Fluoreszenzeigenschaften infolge einer Ca²⁺-Binding zu ändern und somit zu jedem Zeitpunkt den aktuellen, zellulären Ca²⁺-Status wiederzugeben zu können, was sich entweder in der Erhöhung der Fluoreszenzintensität oder zusätzlich der Änderung der Exzitations- und Emissionsspektren ausprägen kann. Generell existieren zwei Hauptklassen von Ca²⁺-Indikatoren: Chemische und genetisch kodierte Indikatoren oder auch GECIs („genetically encoded calcium indicators“) genannt. Beide Formen basieren auf einem ionensensitiven Molekül, welches infolge einer reversiblen Bindung von Ca²⁺, durch eine Strukturänderung, die Eigenschaften eines kovalent assoziierten Fluoreszenzmoleküls modulieren kann. GECIs besitzen den Vorteil, dass sie nicht wie chemische Indikatoren in Zellen geladen werden müssen, sondern in der Zelle exprimiert werden und zudem über spezielle Signalsequenzen gezielt in ein gewünschtes Kompartiment dirigiert werden können. Chemische Indikatoren sind zwar insbesondere bei längerer Behandlungsdauer moderat toxisch für Zellen, jedoch sind diese sehr gut etabliert, einfach zu handhaben und bestechen insbesondere durch ihre hohe Sensitivität und ihren weiten, dynamischen Fluoreszenzbereich (Miyawaki *et al.*, 1997). Diese Ca²⁺-sensitiven Substanzen, welche im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurden, stellen Derivate Ca²⁺-chelatierender Moleküle, wie beispielsweise BAPTA (1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethanol, N,N,N',N'-Tetraessigsäure) dar, die chemisch an ein Chromophor gekoppelt wurden (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Damit solche Stoffe einfach über die Plasmamembran diffundieren können, werden die Ca²⁺-bindenden Carboxylgruppen als AM-Ester (Acetoxymethylester) maskiert, wodurch die Substanz hydrophober und somit membrangängig wird. Innerhalb der Zelle wird diese Estergruppe dann durch unspezifische Esterasen abgespalten und der Indikator durch die wieder erhöhte Hydrophilie in der Zelle eingeschlossen (Dieser Vorgang wird auch als Beladung bezeichnet). Letztlich ist die eigentliche Messprozedur, unabhängig davon, ob genetische oder chemische Indikatoren verwendet werden, äußerst simpel, da entsprechende Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop in Echtzeit beobachtet werden können.

Die Durchführung der „Ca²⁺-imaging“-Experimente im Rahmen dieser Arbeit erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Adolfo Cavalieri (Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes), welche ihr vor Ort befindliches „imaging“-System, bestehend aus dem iMIC-Fluoreszenzmikroskop (TILL photonics) und dem Monochromator Polychrome V, freundlichst zur Verfügung gestellt hatten. Das iMIC-Mikroskop besitzt ein Fura-2 und ein eGFP (= Fluo-5N) Filterset sowie ein Fluor 20x/0,75 M27 Objektiv und ein Fluor 40x/1,25 Ölimmersionsobjektiv (Zeiss), welche für die folgenden Messungen von Interesse waren. Zur Steuerung der Einheit sowie zur

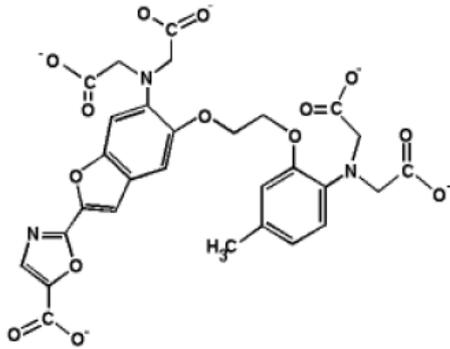
Visualisierung und Analyse der erhobenen Daten wurde die Software TILLvisION Version 4.5 (TILL photonics) in Kombination mit Excel 2007 (Microsoft) verwendet.

V.2.6.1. Zytosolische Ca^{2+} -Messungen mittels Fura-2

Unter physiologischen Bedingungen liegt die zytosolische Konzentration von Ca^{2+} in einem äußerst niedrigen Bereich (50-100 nM), welcher etwa 20.000-fach unterhalb dem des extrazellulären Milieus liegt. Dieser Zustand wird stetig durch eine Vielzahl von Ca^{2+} -Pumpen und Austauschern aufrechterhalten (Thomas, 2008). Da jedoch viele Änderungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase, wie die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER, mit einem transienten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration einhergehen, wurde ein Großteil der Ca^{2+} -„imaging“-Experimente mit Hilfe des etablierten Ca^{2+} -Indikators Fura-2 durchgeführt (Abbildung 14, A). Dieser Fluoreszenzfarbstoff besitzt mit einer Ca^{2+} -Affinität im nanomolaren Bereich (Literatur $K_d \approx 224$ nM) eine äußerst niedrige Detektionsgrenze für Ca^{2+} und eignet sich daher hervorragend für zytosolische Messungen. Ein weiteres Charakteristikum dieses, auch als ratiometrisch bezeichneten, Ca^{2+} -Indikators liegt in seinen spektroskopischen Eigenschaften. So verschiebt sich nach Bindung von Ca^{2+} dessen Exzitationsmaximum von 362 zu 340 nm, wohingegen die Emissionswellenlänge in beiden Fällen bei 510 nm liegt. Diese Tatsache bietet den Vorteil, eine von der Indikatorkonzentration bzw. dessen zellspezifischen Fluoreszenzintensität nahezu unabhängige Bestimmung der Ca^{2+} -Veränderungen zwischen verschiedenen Zellen durchführen zu können. Denn mit steigender Fura-2-Konzentration steigt zwar die Intensität der Fluoreszenz-emission infolge der Anregung bei 340 nm, jedoch fällt auch im Gegenzug die Emissionsintensität nach Anregung bei 380 nm. Wird nun das Verhältnis (Ratio) 340 nm/380 nm gebildet, resultiert ein Wert, der lediglich von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist.

Für ein Ca^{2+} -„imaging“-Experiment wurden HeLa-Zellen einen Tag zuvor 1:2 in eine 75 cm² Zellkulturflasche passagiert und bei einer Konfluenz von ca. 80 % mittels Trypsin/EDTA abgelöst sowie in frischem DMEM ausgezählt (V.2.4.3). In eine 6 cm Zellkulturschale wurde ein steriles 25 mm Deckglas ausgelegt und für 1-2 h mit 200 µl Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) überschichtet. Danach wurde das Deckglas zweimal mit autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen und die Zellen entsprechend der gewünschten Kultivierungs- bzw. Manipulationsprozedur (V.2.4.1, V.2.4.6) in die Zellkulturschale ausgesät und behandelt. Nach Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 für die erforderliche Dauer wurde das Deckglas mit den adhären Zellen in eine 3,5 cm Zellkulturschale transferiert und mit 3,5 µM Fura-2 AM (1 mM Stocklösung in DMSO) in 1 ml Kulturmedium für 45 min lichtgeschützt beladen. Anschließend wurde das Deckglas mittels Pinzette aus der Schale entnommen, in die Messkammer des iMIC-Mikroskops eingesetzt und die beiden Hälften der Kammer zusammenschraubt. Die Zellen wurden umgehend zweimal mit 300 µl Ca^{2+} -freiem Puffer vorsichtig gewaschen und schließlich im gleichen Volumen desselben Puffers inkubiert. Die Kammer wurde daraufhin in die, im Strahlengang des Mikroskops befindliche, Halterung eingesetzt und die Messung gestartet (Abbildung 14, B).

A



B

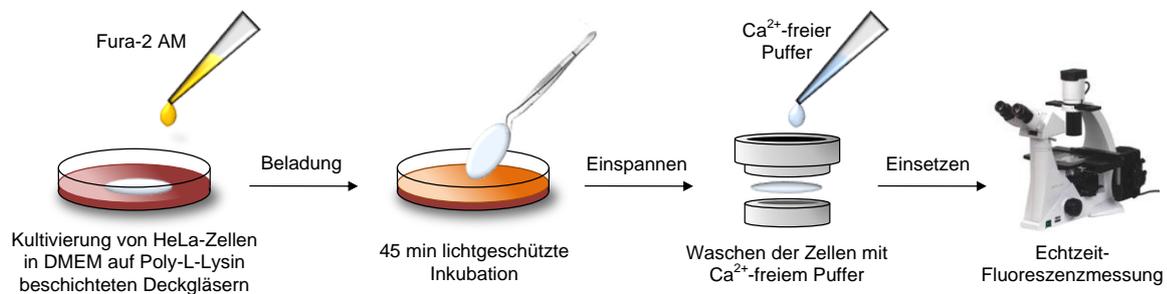


Abbildung 14: Durchführung einer zytosolischen Ca²⁺-Messung. **A)** Struktur des zytosolischen, ratiometrischen Ca²⁺-Indikators Fura-2. Das Molekül ist ein Derivat des Ca²⁺-Chelators BAPTA, welches an ein Chromophor gekoppelt ist. Typischerweise wird es als Acetoxymethylester (AM) verwendet, da so die hydrophilen Ca²⁺-bindenden Carboxylgruppen maskiert werden und die Substanz leicht über die Plasmamembran diffundieren kann, woraufhin innerhalb der Zelle die Estergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten werden und der Indikator gefangen wird (= Beladung) **B)** HeLa-Zellen werden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern (0,1 mg/ml) kultiviert und gegebenenfalls manipuliert. Diese werden anschließend bei RT mit 3,5 µM Fura-2 AM in frischem DMEM inkubiert (dunkel) und daraufhin mittels Pinzette in eine Messkammer eingesetzt und festgespannt. Nach zweimaligem Waschen mit 300 µl Ca²⁺-freiem Puffer und anschließendem Inkubieren der Zellen in 300 µl Ca²⁺-freiem Puffer wird die Kammer in die Fassung über dem Objektiv ins iMIC-Mikroskop eingesetzt und die Messung gestartet.

Die Steuerung des Mikroskops erfolgte über die TILLvision Software mit der die Fura-2 Signale bei 340 und 380 nm über einen gewünschten Zeitraum mit einer Frequenz von einem Bild pro 3 s aufgezeichnet wurden. Die Werte entsprechen dabei den Emissionen bei jeweils 510 nm nach Exzitation bei 340 und 380 nm, welche alternierend innerhalb von 5 ms gemessen wurden. Im Anschluss an eine Messung wurden 30-90 Zellen manuell ausgewählt und durch Subtraktion der zeitgleich gemessenen Hintergrundwerte bei jeweils 340 und 380 nm korrigiert. Die daraus resultierenden Ratio 340/380-Werte geben somit indirekt die zytosolische Ca²⁺-Änderung jeder Zelle zu jedem Messpunkt im Vergleich zum Grundzustand wieder. Die Werte wurden in Form eines Diagramms dargestellt, indem die Ratio 340/380 (oder nach einer Kalibrierung die Ca²⁺-Konzentration; siehe hierzu V.2.6.2) auf der Ordinate gegen die Zeit auf der Abszisse aufgetragen wurden. Eine Form der Experimente, welche im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, war die Applikation von Thapsigargin, einem Inhibitor der SERCA (Ca^{2+} -ATPase des ER), welche zu einer transienten Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dadurch zu einem Anstieg der Ratio führt. Weiterhin wurde in bestimmten Fällen vor der Zugabe von Thapsigargin zusätzlich eine weitere Substanz appliziert, mit der die Zellen für eine bestimmte Dauer (z.B. 3 oder 10 min) vorinkubiert wurden. Wenn nicht gesondert angegeben, wurde die initiale Inkubation der Zellen in der Messkammer sowie jede weitere Zugabe diverser Substanzen stets in einem Volumen von 300 μl Ca^{2+} -freiem Puffer vorgenommen. Je nach vorgelegtem Volumen, d.h. je nachdem wann in einer Abfolge mehrerer Applikationen eine Substanz verabreicht werden sollte, musste daher die Konzentration der Lösung entsprechend angepasst werden, um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten (Liegt beispielsweise ein Lösungsvolumen von 600 μl vor, werden 300 μl Thapsigargin-Lösung mit einer Konzentration von 3 μM in die Messkammer pipettiert, um eine Endkonzentration von 1 μM zu erhalten) Zur Vereinfachung wird im Folgenden nur noch die Endkonzentration zu applizierender Substanzen angegeben. In Abbildung 15, A ist ein Beispiel eines Ca^{2+} -„imaging“-Experimentes mit untransfizierten HeLa-Zellen (96 h Inkubation) dargestellt. Nach 1 min Messzeit wurden entweder 0,1 % DMSO (Kontrolle) oder einer der beiden ER-Stressoren Tunicamycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1 mg/ml Stocklösung in DMSO) oder Dithiothreitol (1 mM ; 1 M Stocklösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) hinzugegeben. Nach 3 min Inkubation wurde 1 μM Thapsigargin (1 mM Stocklösung in DMSO) verabreicht. Wie zu sehen ist steigt nach Zugabe von Thapsigargin die Ratio 340/380 an und fällt nach wenigen Minuten wieder auf das Grundniveau zurück. Um einzelne Experimenttypen untereinander vergleichen zu können wurde meist eine Kombination verschiedener Messungen in einem Diagramm dargestellt. Die Kurven geben dabei die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der jeweiligen Messpunkte wieder (V.2.7). Weiterhin wurde ein Großteil der Messungen statistisch ausgewertet, indem die Amplitude der Graphen der einzelnen Zellen (ΔRatio oder $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$; siehe V.2.6.2) bestimmt und der entsprechende Mittelwert zusammen mit dem ermittelten Standardfehler in einem Diagramm angegeben wurde (Abbildung 15, B).

Bestimmung der Gesamtmenge an freiem zellulärem Ca^{2+} mittels Ionomycin

Zur vollständigen Freisetzung von ungebundenem Ca^{2+} aus allen zellulären Speichern, wurde eine Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Ionomycin durchgeführt. Dieses Ionophor lagert sich in biologische Membranen ein und vermag Ca^{2+} über solche zu transportieren (Abramov und Duchen, 2003). Für eine entsprechende ratiometrische Messung wurden die Zellen standardmäßig in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und nach 1 min Messdauer mit 5 μM Ionomycin (1 mM Stocklösung in DMSO) behandelt. Falls erwünscht, erfolgte nach 6,5 min eine zusätzliche Zugabe von 1 μM Thapsigargin, um eine vollständige Freisetzung von ER-luminalem Ca^{2+} zu demonstrieren. In späteren Experimenten wurde diese Kontrolle jedoch verworfen und die Messdauer auf 300 s verkürzt, da in keinem der Fälle ein Effekt durch das Thapsigargin zu beobachten war.

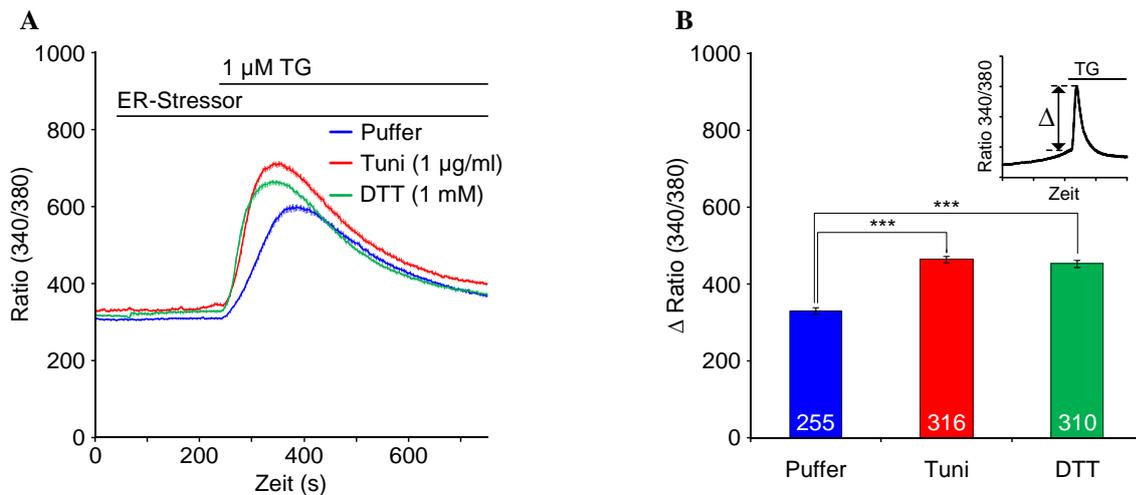


Abbildung 15: Auswertung und graphische Darstellung zytosolischer Ca^{2+} -Messungen. **A)** Mit Fura-2 AM beladene HeLa-Zellen wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt und 1 min nach Beginn der ratiometrischen Messung mit Puffer (0,1 % DMSO), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin (Tuni; Stocklösung: 1 mM in DMSO) oder 1 mM Dithiothreitol (DTT; Stocklösung: 1 M in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) behandelt. Nach 3 min wurde 1 μM Thapsigargin (TG; Stocklösung: 1 mM in DMSO) hinzugegeben und die Messung für weitere 8,5 min fortgeführt. Die y-Achse stellt die gemessenen Ratio 340/380-Werte dar, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurden. Die Graphen repräsentieren die Mittelwerte der einzelnen Messungen mit dem jeweiligen Standardfehler jedes Messpunktes. **B)** Statistische Auswertung der in (A) dargestellten Messungen in Form eines Balkendiagramms. Hierzu wurde die Änderung der Ratio 340/380 jeder Einzelzelle bestimmt (siehe Muster, oben rechts) und anschließend der Mittelwert sowie der Standardfehler dieser Werte für jedes Experiment ermittelt. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte $< 0,001$ wurden dabei als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb eines Versuchs (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert ($n_{\text{Puffer}} = 5$; $n_{\text{Tuni}} = 6$; $n_{\text{DTT}} = 6$). Die Anzahl analysierter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

Indirekte Überprüfung der ER- Ca^{2+} -Freisetzung mittels SOCE

Eine Möglichkeit zur Überprüfung, ob diverse Substanzen einen stimulierenden Effekt auf den Ca^{2+} -Ausstrom und aus dem ER ausüben und somit eine Speicherentleerung bewirken, bietet das Phänomen des Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE). Die experimentelle Prozedur wurde hierbei analog zu den oben genannten Thapsigargin-Versuchen mit Vorbehandlung durchgeführt. Jedoch wurde zum Zeitpunkt der eigentlichen Thapsigargin-Applikation Ca^{2+} -Puffer verabreicht, welcher durch den vorgelegten Ca^{2+} -freien Puffer (mit Ca^{2+} -chelatierendem EGTA) auf eine theoretische Ca^{2+} -Endkonzentration von 2,5 mM verdünnt wurde. Als Kontrollexperiment wurde zunächst das etablierte Thapsigargin verwendet, das durch seine Hemmung der SERCA passiv zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER-Lumen führt und damit zur Öffnung von CRAC-Kanälen in der Plasmamembran führt. Nach 1 min Messdauer in Ca^{2+} -freiem Puffer wurden demnach 1 μM Thapsigargin und nach weiteren 10 min 600 μl Ca^{2+} -Puffer hinzugegeben. Danach wurde die Messung für weitere 9 min fortgeführt (Abbildung 16, A). Als Negativkontrolle wurde ein analoges Experiment durchgeführt, in welchem lediglich der korrespondierende Puffer (0,1 % DMSO) verabreicht wurde. Hierbei kann nur ein basaler Anstieg der Ratio, um einen Wert von ca. 50, beobachtet werden. Abbildung 16, B zeigt die Untersuchung des

Faltungsantagonisten DTT im Vergleich zur genannten Pufferkontrolle. Wie zu sehen ist bewirkt eine 10-minütige Vorbehandlung mit 1 mM DTT eine deutliche Aktivierung des SOCE.

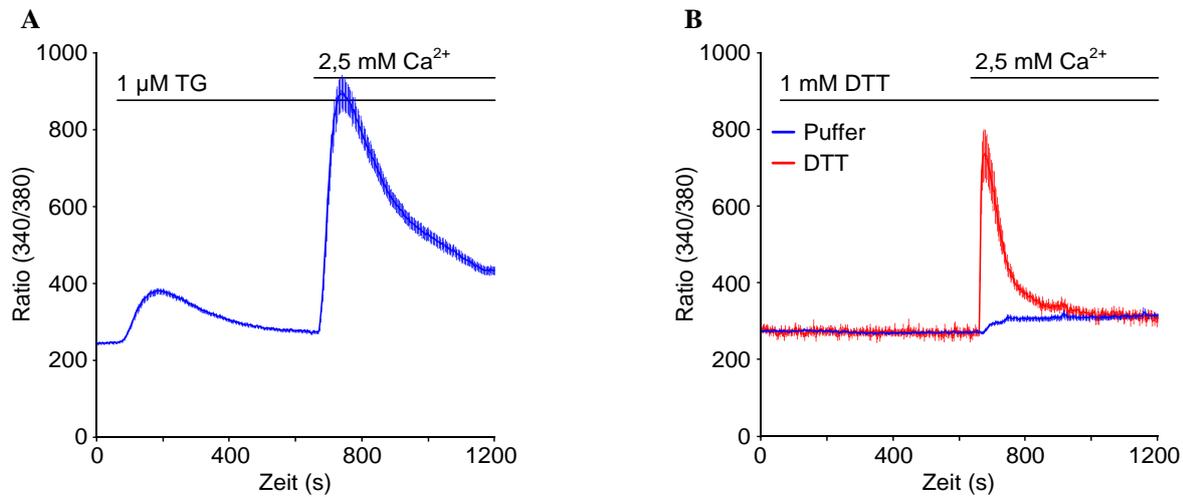


Abbildung 16: Ratiometrische Messung zum Nachweis der Aktivierung des SOCE durch unterschiedliche Substanzen. Auf einem Poly-L-Lysin-vorbehandelten (0,1 mg/ml) Deckglas wurden HeLa-Zellen in DMEM für 96 h kultiviert und anschließend mit Fura-2 AM für 45 min (dunkel) beladen. Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in selbigem inkubiert und die Kammer in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Start der ratiometrischen Messung wurde entweder **A)** 1 μM Thapsigargin oder **B)** 1 mM DTT bzw. 0,1 % DMSO (Negativkontrolle) appliziert und die Messung weitere 10 min durchgeführt. Danach wurde Ca^{2+} -Puffer hinzugegeben (theoretische Ca^{2+} -Endkonzentration: 2,5 mM) und weitere 9 min gemessen. Für eine Messung wurden 20-50 Zellen analysiert und die Graphen als Mittelwert mit Standardfehlern dargestellt.

<u>Externe Lösung</u>		<u>Ca^{2+}-freier Puffer</u>	
NaCl	140 mM	EGTA	0,5 mM
KCl	5 mM	in Externer Lösung	
MgCl_2	1 mM		
Glukose	10 mM	<u>Ca^{2+}-Puffer</u>	
HEPES/KOH, pH7,35	10 mM	CaCl_2	10 mM
		in Externer Lösung	

V.2.6.2. Kalibrierung von Fura-2 Messungen

Die Kalibrierung stellt eine Möglichkeit dar, die experimentell gemessenen Ratio 340/380-Werte in systemunabhängige, vergleichbare Ca^{2+} -Konzentrationen umzuwandeln. Hierfür wurde eine von Lomax und Mitarbeitern etablierte Prozedur angewandt, mit der eine systemspezifische Dissoziationskonstante K_d von Fura-2 für Ca^{2+} sowie zelltypspezifische Minimum- (R_{\min}) und Maximum-Ratiowerte (R_{\max}) für Extrema der Ca^{2+} -Konzentrationen ermittelt wurden. Werden diese Werte in eine geeignete Umrechnungsformel eingesetzt, kann eine zuverlässige Ca^{2+} -Konzentration für beliebige Ratio-Werte im linearen Bereich berechnet werden (Lomax *et al.*, 2002). Da dieser Lineare Bereich oberhalb einer Ratio von etwa 1.000 ungenau wird, wurde für Messungen mit Ionomycin zugunsten einer besseren

V. Material und Methoden

Vergleichbarkeit von einer Kalibrierung abgesehen. Um generell die spezifische, von der Messapparatur abhängige K_d (K'_d) von Fura-2 für Ca^{2+} zu bestimmen, wurde ein Kalibrier-Kit (Molecular Probes) verwendet. Es enthält eine Ca^{2+} -Verdünnungsreihe (0-39 μM), dessen Lösungen mit jeweils 50 μM Fura-2 versetzt sind und zusätzlich eine weitere Probe ohne Fura-2, die dem Abgleich der Hintergrundfluoreszenz dient (Tabelle 11). Zudem beinhalten die Lösungen Polystyren-Kügelchen mit einem Durchmesser von 15 μm , wodurch die Flüssigkeit, nach Pipettieren zwischen zwei Deckgläser, stets eine einheitliche Schichtdicke besitzt. Außerdem dienen die Kügelchen dem Auffinden einer geeigneten, reproduzierbaren Fokusebene. Für eine Kalibrierung wurde jeweils ein 25 mm Deckglas in die iMIC-Messkammer eingespannt und 5 μl einer Kalibrierlösung auf die Oberfläche pipettiert. Auf diesen Tropfen wurde ein zweites 10 mm Deckglas aufgelegt, die Messkammer in die Vorrichtung am Mikroskop eingesetzt und die Emissionsintensitäten bei 510 nm nach Exzitation bei jeweils 340 nm (F_{340}) und 380 nm (F_{380}) gemessen.

Hierbei ist die Messung der Lösungen

- A ($F_{340 \text{ max}}$ und $F_{380 \text{ max}}$, Ca^{2+} -frei)
- K ($F_{340 \text{ min}}$ und $F_{380 \text{ min}}$; gesättigte Ca^{2+} -Konzentration) und
- L ($F_{340 \text{ BG}}$ und $F_{380 \text{ BG}}$, Hintergrundfluoreszenz; BG = „background“)

obligatorisch, während die Messwerte für B-J (F_{380} und F_{340} intermediärer Ca^{2+} -Konzentrationen) zwar unbedingt erhoben werden sollten, jedoch insbesondere die Genauigkeit der Kalibrierung erhöhen.

Tabelle 11: Kalibrierlösungen des Kalibrier-Kits der Firma Molecular Probes.

Bezeichnung	freies Ca^{2+} [μM]	Ca^{2+} -EGTA [μM]	Fura-2 [μM]
A	0,000	0	50
B	0,017	1	50
C	0,038	2	50
D	0,065	3	50
E	0,100	4	50
F	0,150	5	50
G	0,225	6	50
H	0,351	7	50
I	0,602	8	50
J	1,350	9	50
K	39,00	10	50
L	39,00 (Kontrollpuffer ohne Fura-2)	10	-

V. Material und Methoden

Um anhand der experimentell ermittelten Fluoreszenzintensitäten nun die entsprechenden Ca^{2+} -Konzentrationen berechnen zu können, werden die gemessenen Werte in die folgende durch Gryniewicz *et al.* etablierte Formel (1) eingesetzt (Gryniewicz *et al.*, 1985):

$$(1) \quad [\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} = K_d \times \alpha \times \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right)$$

hierbei ist

$$(2) \quad R = \frac{F_{340} - F_{340} \text{ BG}}{F_{380} - F_{380} \text{ BG}}$$

und

$$(3) \quad \alpha = \left(\frac{F_{380 \text{ max}}}{F_{380 \text{ min}}} \right)$$

Wird die Formel (1) nun logarithmiert und in eine lineare Geradengleichung der Form $y = mx + b$ umgestellt, liefert die Nullstelle dieser Geraden ($y = 0$), also der Schnittpunkt der erhaltenen Geraden mit der x-Achse, den Logarithmus der K'_d , welcher letztlich durch Exponenzieren den gewünschten Wert ergibt (Abbildung 17).

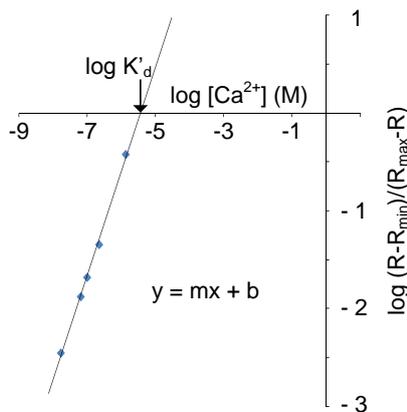


Abbildung 17: Kalibriergerade zur Ermittlung der systemspezifischen K_d (K'_d) von Fura-2 für Ca^{2+} . Die Ratio-Werte auf der y-Achse und die $[\text{Ca}^{2+}]$ -Werte auf der x-Achse sind jeweils als Logarithmus angegeben, um den sigmoidalen Kurvenverlauf des Verhältnisses zwischen Fluoreszenz und Ca^{2+} -Konzentration als lineare Geradengleichung darstellen zu können. Der Schnittpunkt der interpolierten Geraden mit der x-Achse, d.h. die Nullstelle ($y = 0$) ergibt den $\log K'_d$, der schließlich durch Exponenzieren die gewünschte K'_d liefert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei unterschiedlichen Monochromatoren gearbeitet, weswegen für beide Geräte eine K'_d ermittelt wurde:

- 1) $K'_d = 3,54 \mu\text{M}$
- 2) $K'_d = 3,62 \mu\text{M}$

V. Material und Methoden

Um die systemunabhängigen K_d -Werte von Fura-2 für Ca^{2+} zu erhalten wurden die K'_d -Werte jeweils durch den in Formel (3) definierten Korrekturfaktor α dividiert:

- 1) $K_d = 716,4 \text{ nM}$
- 2) $K_d = 484,8 \text{ nM}$

Zur Bestimmung der zelltypspezifischen Minimum- und Maximum-Ratiowerte (R_{\min} und R_{\max}) wurden auf einem Deckglas kultivierte, unbehandelte oder zuvor manipulierte HeLa-Zellen 45 min mit Fura-2 AM beladen, in die Messkammer eingesetzt und zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen 15 min mit $10 \mu\text{M}$ Ionomycin behandelt. Der Puffer wurde währenddessen zweimal gewechselt. Nach Inkubation der Zellen in frischem Puffer mit $10 \mu\text{M}$ Ionomycin wurde die Messkammer in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt und die Messung gestartet. Nach Bestimmung der Ratio der Ca^{2+} -entladenen Zellen durch konstante Messung für 5 min wurden 52 mM Ca^{2+} -Puffer (theoretische Endkonzentration: 13 mM) mit $10 \mu\text{M}$ Ionomycin hinzugegeben und die Messung für weitere 10 min fortgeführt, um die Fluoreszenz-Ratio der gesättigten Ca^{2+} -Konzentration in Zellen zu ermitteln. Pro Ansatz wurden mindestens 40 Einzelzellen ausgewertet, wobei als R_{\min} der Mittelwert der drei Graphen mit den niedrigsten Ratiowerten im Messfenster von 0-90 s und als R_{\max} der entsprechende Mittelwert der drei Graphen mit den höchsten Ratiowerten zwischen Messpunkt 255 s und 345 s angesehen wurde (Abbildung 18).

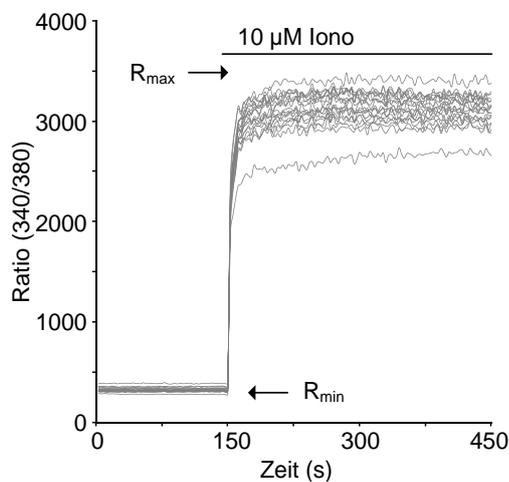


Abbildung 18: Bestimmung der minimalen und maximalen Ratiowerte (R_{\min} und R_{\max}) zur Kalibrierung von ratiometrischen Fura-2-Messungen. Unbehandelte oder zuvor transfizierte HeLa-Zellen unterschiedlicher Inkubationsdauer wurden nach 45-minütiger Beladung mit Fura-2 AM (dunkel) in die Messkammer eingespannt, zweimal mit $300 \mu\text{l}$ Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen und in $300 \mu\text{l}$ Ca^{2+} -freiem Puffer mit $10 \mu\text{M}$ Ionomycin (Stocklösung: 1 mM in DMSO) für 15 min im dunkeln inkubiert (dabei wurde der Puffer alle 5 min gewechselt). Die Messkammer wurde anschließend erneut mit $300 \mu\text{l}$ frischem Ca^{2+} -freiem Puffer mit $10 \mu\text{M}$ Ionomycin befüllt, in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt und die ratiometrische Messung gestartet. Zur Bestimmung des R_{\min} -Wertes wurde für 5 min konstant gemessen während für den R_{\max} -Wert die Zugabe von $300 \mu\text{l}$ 52 mM Ca^{2+} -Puffer (theoretische Endkonzentration: 13 mM) mit ebenfalls $10 \mu\text{M}$ Ionomycin erfolgte. Die Messung wurde anschließend für weitere 10 min fortgeführt. Für die nachfolgende Kalibrierung wurde jeweils der Mittelwert der drei niedrigsten sowie der drei höchsten Ratiowerte im jeweiligen stabilen Messfenster für den Ca^{2+} -freien Puffer (1-90 s) sowie den Ca^{2+} -Puffer (255-345 s) herangezogen. Für eine Messung wurden mindestens 40 Zellen untersucht.

V. Material und Methoden

Da die Verwendung unterschiedlicher Monochromatoren auch mit einer Veränderung des R_{\min} - und R_{\max} -Wertes bestimmter Zelltypen einhergeht, wurden diese Werte in beiden Fällen für alle zu kalibrierenden Zellen bestimmt. Die Bestimmung der R_{\min}/R_{\max} -Werte mittels Monochromator 1 sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Auflistung der mittels Monochromator 1 ermittelten R_{\min}/R_{\max} -Werte.

Bezeichnung	R_{\min}	R_{\max}
unbehandelt	229	2528
Kontroll siRNA	235	2385
<i>SEC61</i> siRNA	199	2332
<i>SEC61</i> -UTR siRNA	185	2453
Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid	209	2411

Da sich die Werte im allgemeinen nicht erheblich voneinander unterschieden haben, wurde für die Kalibrierung aller ratiometrischen Messungen, in denen sowohl siRNA und Plasmid transfiziert wurden stets die R_{\min}/R_{\max} -Werte für den Zelltyp Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid verwendet. Die R_{\min}/R_{\max} -Werte die mittels Monochromator 2 erhoben wurden sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Auflistung der R_{\min}/R_{\max} -Werte, die mittels Monochromator 2 ermittelt wurden

Bezeichnung	R_{\min}	R_{\max}	Bezeichnung	R_{\min}	R_{\max}
unbehandelt 24 h	284	3107	<i>BIP</i> siRNA 72 h	270	3140
Kontroll siRNA 24 h	283	3404	<i>BIP</i> -UTR siRNA 72 h	264	3236
<i>BIP</i> siRNA 24 h	271	3203	Kontroll siRNA 96 h	287	2897
<i>BIP</i> -UTR siRNA 24 h	277	3203	<i>BIP</i> siRNA 96 h	263	3075
Kontroll siRNA 48 h	284	2967	<i>BIP</i> -UTR siRNA 96 h	274	3450
<i>BIP</i> siRNA 48 h	263	3193	Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid	287	3127
<i>BIP</i> -UTR siRNA 48 h	288	3079	<i>SEC61</i> -UTR siRNA + Kontroll-Plasmid	281	3264
Kontroll siRNA 72 h	279	3038	<i>SEC61</i> -UTR siRNA + <i>SEC61</i> -Plasmid	279	2984

In diesem Fall wurden die Werte aufgrund geringfügiger messungsabhängiger Schwankungen allesamt gemittelt und für die Kalibrierung aller ratiometrischen Messungen mit dem Monochromator 2 verwendet. Die Mittelwert waren hierbei: $R_{\min} = 275$ und $R_{\max} = 3163$

V.2.6.3. ER-luminale Ca^{2+} -Messungen mittels Fluo-5N

Da die Ca^{2+} -Messungen in dieser Arbeit darauf abzielten den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER-Lumen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, war zur Verifizierung der erhobenen zytosolischen Daten mittels Fura-2 ein direkteres Messverfahren gefordert. Eine etablierte Methode zur Bestimmung ER-luminaler Ca^{2+} -Fluktuationen basiert auf der Verwendung von Indikatoren mit niedriger Ca^{2+} -Affinität (z.B. Mag-Fura-2), welche die Ca^{2+} -Änderungen im hohen Konzentrationsbereich des ER-Lumens ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}} \approx 10\text{-}1.000 \mu\text{M}$) zu registrieren vermögen (Bygrave und Benedetti, 1996; Hofer *et al.*, 1995; Tse *et al.*, 1994). Bei diesem Verfahren wird die Plasmamembran der Zellen nach der Beladung mit einem milden, cholesterolspezifischen Agens (z.B. Streptolysin-O) permeabilisiert, was das Auswaschen des störenden, noch im Zytosol befindlichen Indikators bewirkt. Dieser Schritt ist erforderlich, da sich AM-Esterfarbstoffe relativ gleichmäßig in der Zelle verteilen und schließlich nach Abspaltung der AM-Gruppe innerhalb eines membranumschlossenen Bereichs, und somit auch im Zytosol, verbleiben. Grundsätzlich zeigen niedrigaffine Indikatoren für die Messung ER-luminaler Ca^{2+} -Änderungen jedoch vergleichbare Eigenschaften wie die unter Punkt V.2.6.1 beschriebenen zytosolischen Ca^{2+} -Indikatoren. Daher kann via Ca^{2+} -„imaging“ die Abnahme der ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe entsprechender Stimuli in Form einer Erniedrigung der Fluoreszenzintensität bestimmt werden (Camello *et al.*, 2002; Lomax *et al.*, 2002). Da die oben beschriebene Vorgehensweise der Zerstörung der Plasmamembran und dem Ersetzen des Zytosols durch physiologischen Puffer ein sehr artifizielles Messmilieu schafft, wurde in dieser Arbeit ein neues, eleganteres Verfahren angewandt. Diese Prozedur kombiniert die Vorteile genetisch kodierter Ca^{2+} -Indikatoren hinsichtlich ihrer Lokalisierbarkeit mit den biochemischen Vorzügen synthetischer Indikatoren bezüglich ihrer hohen Sensitivität und ihren Fluoreszenz-dynamischen Eigenschaften. Basierend auf der durch Rehberg *et al.* etablierten Methode wurde eine stabil transfizierte HeLa-Zelllinie verwendet, die freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe um Prof. Robert Blum (Institut für Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg) generiert und zur Verfügung gestellt wurde (Rehberg *et al.*, 2008). Diese sogenannten Hela-CES2-Zellen (V.1.7) exprimieren die cDNA-Sequenz einer ER-dirigierten Carboxylesterase und bieten damit den Vorteil, dass sie durch die resultierende, lokal stark erhöhte Esteraseaktivität AM-Esterfarbstoffe, nach deren Diffusion in die Zelle, zu einem hohen Grad im ER-Lumen akkumulieren. Eine anschließende Permeabilisierung der Zellen zur Entfernung von Indikatorrückständen im Zytosol ist somit nicht mehr erforderlich. Ein für dieses System geeigneter, etablierter Ca^{2+} -Indikator stellt hierbei das Fluo-5N (K_d für Ca^{2+} in Puffer $\approx 90 \mu\text{M}$) dar, welches in dieser Arbeit zum Einsatz kam (Ziman *et al.*, 2010). Dieser Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff ist im Gegensatz zu Fura-2 nicht ratiometrisch, weswegen nur die relative

Änderung der Fluoreszenz im Vergleich zum Ausgangssignal gemessen werden kann, jedoch bietet er den Vorteil, dass er mit einer 100-fachen Fluoreszenzintensitätssteigerung nach Ca^{2+} -Bindung ein starkes und dynamisches Signal liefert. Das Exzitations- und Emissionsmaximum für die Ca^{2+} -gebundene Form von Fluo-5N liegt bei 494 bzw. 516 nm (Abbildung 19, A).

Zur fluoreszenzmikroskopischen Echtzeit-Messung ER-luminaler Ca^{2+} -Änderungen wurden HeLa-CES2-Zellen identisch zur unter Punkt V.2.6.1 beschriebenen Prozedur kultiviert und gegebenenfalls manipuliert (V.2.4.1). Nach gewünschter Inkubationsdauer wurde das Deckglas mit den adhären Zellen in eine 3,5 cm Zellkulturschale transferiert und die Zellen mit 4 μM Fluo-5N AM (1 mM Stocklösung in Pluronic F-127) in 1 ml HBSS (Gibco) für 15 min lichtgeschützt bei 37 °C beladen. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit 1 ml HBSS gewaschen und in selbigem Volumen HBSS für weitere 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Das Deckglas wurde anschließend in die Messkammer eingespannt, die Zellen zweimal mit 300 μl Ca^{2+} -freiem Puffer vorsichtig gewaschen und schließlich im gleichen Volumen Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. Die Kammer wurde daraufhin in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt, wobei zwecks einer verbesserten Auflösung der ER-Struktur ein 40 x Ölimmersionsobjektiv verwendet wurde. Wie im Falle der zytosolischen Ca^{2+} -Messungen wurde das Mikroskop mittels TILLvisION Software gesteuert und die Fluo-5N-Signale bei 490 nm Exzitations- und 530 nm Emissionswellenlänge (eGFP-Filter) über einen gewünschten Zeitraum mit einer Bildfrequenz von 1/6 Hz aufgezeichnet. Dabei wurde ein „binning“ (Zusammenfassen benachbarter Pixel zur Verstärkung der abgebildeten Signale) von 4 x 4 verwendet. Im Anschluss an eine Messung wurden 10-30 Zellen manuell ausgewählt und alle Intensitätssignale (F^*) durch Subtraktion des mitgemessenen Hintergrundwertes F' korrigiert. Weiterhin wurde zur Berechnung der relativen Fluoreszenzänderung der Startwert F_0 jeweils von den Messwerten subtrahiert und die erhaltene Differenz zur Normierung der Daten nochmals durch F_0 dividiert, wodurch sich für diese Berechnung folgender Term ergab:

$$\frac{[(F^* - F') - (F^*_0 - F')]}{(F^*_0 - F')} \quad \text{oder vereinfacht dargestellt:} \quad \frac{\Delta F}{F_0}$$

Die Werte wurden in Form eines Diagramms dargestellt, in welchem die relative Fluoreszenzabnahme ($\Delta F/F_0$) auf der y-Achse gegen die Zeit (s) auf der x-Achse aufgetragen wurden. Abbildung 19, B zeigt die graphische Auswertung eines Experimentes mit untransfizierten Zellen. Nach 1 min wurden 1 μM Thapsigargin hinzugegeben, um den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER zu stimulieren (zu sehen als relative Abnahme der Fluoreszenzintensität). Nach weiteren 9 min wurden 5 μM Ionomycin appliziert, wodurch restliches Ca^{2+} mobilisiert wird. Dies dient als indirekter Hinweis, wie viel Ca^{2+} durch die Thapsigargin-Behandlung bereits aus dem ER freigesetzt wurde. Letztlich können entsprechende Datensätze, ähnlich der unter Punkt V.2.6.1 beschriebenen Auswertung, zusätzlich statistisch analysiert werden, sofern ein zweiter zu vergleichender Datensatz verfügbar ist. In diesem Fall wird der Wert $\tau_{1/2}$ berechnet, welcher den Zeitpunkt der relativen Fluoreszenzabnahme um 50 % angibt (ab TG-

V. Material und Methoden

Applikation bis zum Ende der Messung) und somit ein Maß für die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER darstellt (Abbildung 19, C). Analog zu den zuvor geschilderten Berechnungen können diese Werte als Mittelwert mit Standardfehler angegeben werden und zwei Datensätze mittels ungepaartem t-Test verglichen werden.

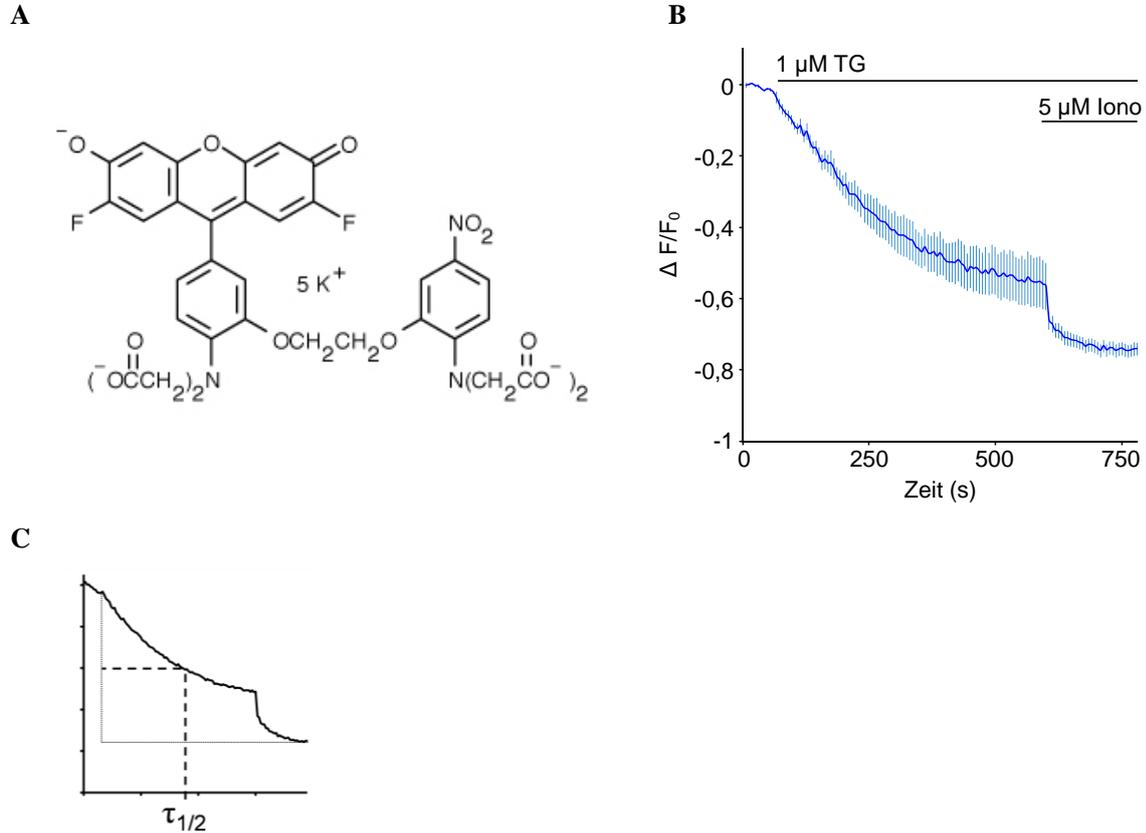


Abbildung 19: Messung von ER-luminalen Ca^{2+} . **A)** Struktur des Calcium-Indikators Fluo-5N vorliegend als Kaliumsalz. **B)** HeLa-CES2-Zellen (stabil transfiziert mit ER-luminal dirigierter Carboxylesterase zur verbesserten AM-Ester-Beladung) wurden 15 min bei 37 °C (dunkel) mit 4 μM Fluo-5N AM (Stocklösung 1 mM in Pluronic F-127) in HBSS beladen und anschließend für weitere 30 min bei RT (dunkel) in HBSS inkubiert. Das Deckglas mit den Zellen wurde in der Messkammer fixiert und nach zweimaligem Waschen in Ca^{2+} -freiem Puffer mit 300 μl Ca^{2+} -freiem Puffer überschichtet. Danach erfolgte die Echtzeit-Fluoreszenz-Messung mittels iMIC-Mikroskop bei einer Exzitation von 490 nm und einer Fluoreszenzemission von 530 nm mit einem Puls alle 6 s. Die Zellen wurden für 1 min gemessen und anschließend die Ca^{2+} -Freisetzung durch Zugabe von 1 μM Thapsigargin induziert. Nach weiteren 9 min wurden 5 μM Ionomycin hinzugegeben und weitere 4 min gemessen. Das Diagramm zeigt den Mittelwert der relativen Fluoreszenzabnahme ($\Delta F/F_0$) inklusive des Standardfehlers aus 10-25 Zellen (AM = Acetoxymethylester; F = Fluoreszenzintensität) **C)** Darstellung einer statistischen Analyse der Änderung der ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Thapsigargin und Ionomycin. Um unterschiedliche Datensätze miteinander vergleichen zu können wurde der Wert $\tau_{1/2}$ verwendet. Dieser gibt den Zeitpunkt nach TG-Zugabe an bei 50 %-iger der Fluoreszenzabnahme an. Diese Werte können analog zu den statistischen Auswertungen der zytosolischen Ca^{2+} -Messungen als Balkendiagramm mit Standardfehler dargestellt werden und mittels ungepaartem t-Test analysiert werden.

V.2.7. Statistische Analyse von Daten

Zur statistischen Auswertung größerer Datenmengen, wurde der ungepaarte t-Test (Zweistichproben-t-Test) durchgeführt. Hierbei wird überprüft, ob sich zwei unabhängige Stichprobensätze anhand ihrer Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden. Der klassische t-Test setzt dabei voraus, dass beide Stichproben normalverteilten Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz entstammen, was generell auf die in dieser Arbeit erhobenen biologischen Daten zutrifft. Die aus einem t-Test ermittelte Wahrscheinlichkeit (p-Wert oder Signifikanzwert), welche Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann, muss dabei oberhalb eines festgelegten Signifikanzniveaus α (maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit) liegen, um die Nullhypothese (d.h. der Fall, dass kein Unterschied zwischen den Stichprobensätzen besteht) zu widerlegen. Diese Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert:

$$p > 0,05 \quad \triangleq \text{ n.s. (nicht signifikant)}$$

$$p < 0,05 \quad \triangleq *$$

$$p < 0,01 \quad \triangleq **$$

$$p < 0,001 \quad \triangleq ***$$

Die in den Diagrammen angegebenen Fehlerbalken geben stets den Standardfehler („standard error of the mean“, s.e.m.) einer Grundgesamtheit von Stichproben an, also das Maß für die Streuung um den entsprechenden Mittelwert der analysierten Daten. Dieser wurde mit dem Programm Excel 2007 (Microsoft) wie folgt berechnet:

$$\text{s.e.m.} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

dabei ist σ die Standardabweichung der Stichproben und definiert als:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$$

n = Anzahl der Stichproben

x = Wert einer Stichprobe

\bar{x} = Mittelwert aller Stichproben

VI. Ergebnisse

Der Sec61-Komplex repräsentiert die Kernkomponente der hochdynamischen und flexiblen Proteintranslokase des endoplasmatischen Retikulums (Crowley *et al.*, 1994; Crowley *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994; Rapoport, 1986; Simon *et al.*, 1989). Neben dem Import von Polypeptidvorläufern ins Lumen oder der Integration von Proteinen in die ER-Membran wurden seit dessen Identifikation mindestens zwei weitere potentielle Funktionen charakterisiert. Während einige Studien eine Rolle bei der Dislokation fehlgefalteter Proteine ins Zytosol (ERAD) postulieren (Hammond und Helenius, 1994, 1995; Klausner und Sitia, 1990; Römisch, 1999; Schäfer und Wolf, 2009) ist insbesondere in der letzten Dekade das Interesse an einem Einfluss des Translokons auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase gestiegen. Der Sec61-Komplex weist dabei eine Permeabilität für diverse Ionen und kleine Moleküle auf (Heritage und Wonderlin, 2001; Le Gall *et al.*, 2004; Roy und Wonderlin, 2003; Simon *et al.*, 1989; Wirth *et al.*, 2003) und vermag über die hydrophile Translokationspore demnach auch Ca^{2+} -Ionen zu leiten. Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung, da das ER einen Hauptspeicherort für zelluläres Ca^{2+} darstellt (Clapham, 2007; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007). Eine Vereinbarung derartiger Eigenschaften ohne Beeinträchtigung des zellulären Milieus wirft jedoch die Frage nach potentiellen Regulationsmechanismen auf. Denn während einerseits eine Vielzahl von Proteinen ins ER importiert wird, muss zur gleichen Zeit eine adäquate Permeabilitätsbarriere gegenüber Ca^{2+} garantiert werden. Basierend auf *in vitro* Experimenten leistet das ER-luminale, molekulare Chaperon BiP einen wichtigen Beitrag zum Schließen der Pore vor und in der frühen Phase der Translokation (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollten potentielle Modulatoren der Sec61-Translokase pharmakologisch oder mittels Expressionsmanipulation auf zellulärer Ebene charakterisiert werden, wobei der Schwerpunkt auf dem *in vitro* Proteinimport (Blobel und Dobberstein, 1975b; Walter und Blobel, 1983a; Wilson *et al.*, 1995) sowie dem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER lag (Grynkiewicz *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1985; Ziman *et al.*, 2010).

VI.1. Einfluss von Calmodulin auf den Sec61-Komplex

Calmodulin (CaM) ist ein Ca^{2+} -abhängiges, zytosolisches Protein, welches die Aktivität einer Vielzahl von Zielproteinen zu modulieren vermag. Dabei stellen Ionenkanäle eine der Hauptklassen CaM-regulierter Proteine dar (Dick *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 1995; Zuhlke *et al.*, 1999). Elektrophysiologische Untersuchungen (Biophysik, Universität Osnabrück) haben gezeigt, dass CaM die Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes in rauen Mikrosomen Ca^{2+} -abhängig inhibieren kann. Gestützt werden diese Daten durch die Identifikation eines IQ-Motivs im zytosolischen N-Terminus von Sec61 α in Säugetierzellen (Punternvoll *et al.*, 2003; Yap *et al.*, 2000), welches *in vitro* Ca^{2+} -

abhängig mit CaM interagiert (Erdmann *et al.*, 2011). Hierauf basierend sollte die Bedeutung von CaM für die Regulation des Proteintransportes und die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase untersucht werden. Zur Inhibition von CaM wurden die CaM-Antagonisten Ophiobolin A, Trifluoperazin, Calmidazolium, Phenoxybenzamin und CaMKII verwendet, welche über unterschiedliche Mechanismen der CaM-Hemmung verfügen. Diese können sowohl allosterisch oder kompetitiv sein und entweder über elektrostatische oder kovalente Interaktion erfolgen (Jan und Tseng, 2000; Leung *et al.*, 1984; Meador *et al.*, 1993; Ning und Sanchez, 1996; Vandonselaar *et al.*, 1994). Die Strukturen der vier verwendeten Xenobiotika sind in Abbildung 20 dargestellt.

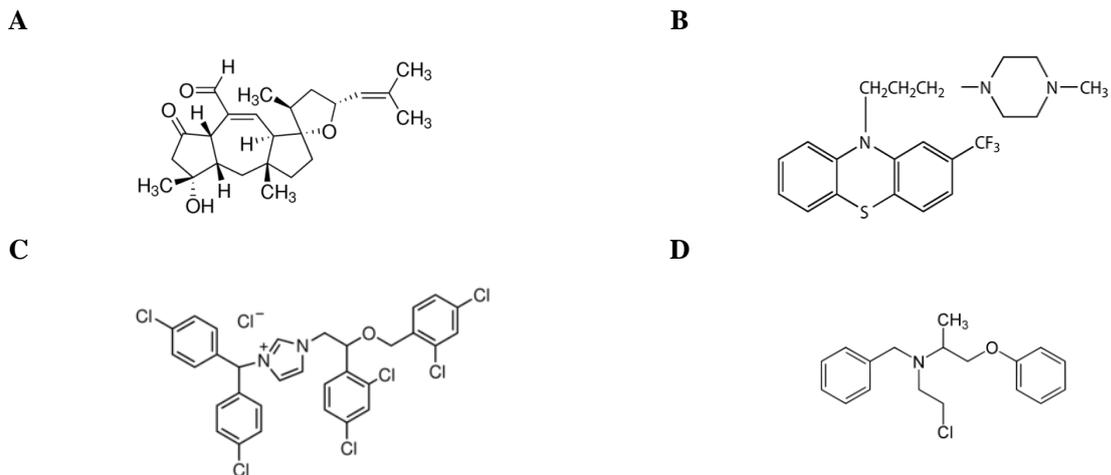


Abbildung 20: Chemische Strukturen der vier verwendeten xenobiotischen Calmodulin-Antagonisten A) Ophiobolin A, B) Trifluoperazin, C) Calmidazolium und D) Phenoxybenzamin.

VI.1.1. Einfluss von CaM-Inhibitoren auf den *in vitro* Proteinimport ins ER

Zur Untersuchung eines Einflusses von CaM-Antagonisten auf den Proteintransport ins ER wurde das etablierte *in vitro* Transportsystem, bestehend aus rauen Mikrosomen (RM) und Retikulozytenlysats verwendet. Die Supplementierung mit [^{35}S]-Methionin sowie einer mRNA, kodierend für ein gewünschtes Modells substrat (Blobel und Dobberstein, 1975b), bietet dabei eine hohe Sensitivität für die nachfolgende Detektion (V.2.1.6). Das offene, definierte System ermöglicht ferner eine beliebige Manipulierbarkeit während oder nach der Synthese, indem Substanzen wie die CaM-Inhibitoren hinzugefügt werden können. Das Retikulozytenlysats enthält zwar einen Überschuss an EGTA (ca. 400 μM), dennoch kann eine Restaktivität von CaM nicht ausgeschlossen werden, auch weil CaM in der Lage ist Ca^{2+} -unabhängig (Apo-CaM) an diverse Zielproteine zu binden (Rhoads und Friedberg, 1997). Da eine Zugabe von Ca^{2+} in das Retikulozytenlysats die Ca^{2+} -abhängige S1 Nuklease aktiviert und damit eine Degradierung der zugesetzten mRNA bewirken würde, wurde im Fall des cotranslationalen Transportes auf einen Zusatz von Ca^{2+} verzichtet. Neben der eigentlichen CaM-Inhibition sollte auch allgemein der Einfluss der CaM-Antagonisten auf den *in vitro* Transport *per se* und somit deren Spezifität untersucht werden.

VI.1.1.1. Diverse CaM-Inhibitoren hemmen den cotranslationalen *in vitro* Transport Sec61-abhängiger Substrate ins ER

Um einen Effekt der verschiedenen CaM-Antagonisten auf den cotranslationalen Proteinimport ins ER zu untersuchen, wurde, wie unter Punkt V.2.3.3.1 beschrieben, die zuvor von den entsprechenden Plasmiden transkribierte mRNA (V.2.3.1) diverser präsekretorischer Proteine in Anwesenheit von rauen Mikrosomen (RM) sowie unterschiedlicher Konzentrationen der oben genannten CaM-Antagonisten (10-200 μM) mit Hilfe des Retikulozytenlysats-Systems translatiert (V.2.3). Hierbei wurden die als obligat oder auch optional cotranslational transportierbaren Modellsubstrate Präprolaktin (ppl), ppl₈₆ (trunkierte, 86 AS lange Variante von Präprolaktin), der Hefepheromon-Vorläufer Präpro- α -Faktor (pp α F) sowie das Insektenprotein Präprocecropin A (ppcecA) verwendet. PpcecA kann dabei unter cotranslationalen Transportbedingungen, d.h. wenn sich während der Synthese ER-Membranen im Ansatz befinden, SRP-abhängig transportiert werden, wohingegen der posttranslationale Transport völlig SRP-unabhängig verläuft (Lang *et al.*, 2012; Schlenstedt *et al.*, 1990). Für jeden Substrattyp wurde die Transporteffizienz bestimmt, indem der Anteil des prozessierten Proteins im Vergleich zur Gesamtproteinmenge ermittelt wurde. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Puffer (0,1 % DMSO), mit welchem die zu testenden Ansätze (mit Inhibitoren) verglichen wurden. Abhängig vom Vorläufersubstrat wurden unterschiedliche Formen der Prozessierung, also die im ER-Lumen katalysierte, posttranslationale Modifikation der transportierten Proteine, detektiert. Entweder erfolgte eine enzymatische Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex und/oder die Glykosylierung an spezifischen Asparaginresten durch die Oligosaccharyltransferase (OST). Beides führt zu einer Veränderung der molekularen Masse (MW) und daher zu einer definierten Veränderung des Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel (Spaltung = Erniedrigung des MW, Glykosylierung = Erhöhung des MW). Um die prozessierten Proteine auf Proteaseresistenz zu überprüfen wurde im Anschluss an einen *in vitro* Transport eine Sequestrierung durchgeführt (wenn nicht gesondert angegeben ohne Triton X-100-Behandlung). Die Proben wurden danach auf einem 15 bzw. 17,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (V.2.1.1) und die radioaktiv markierten Proteine mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert. Zur besseren Auftrennung des relativ kleinen Proteins ppcecA wurde ein 19,4 %-iges SDS-Harnstoffgel (V.2.1.1.1) verwendet.

Ppl wurde unter Kontrollbedingungen (0,1 % DMSO) mit einer Effizienz von 32-58 % durch Signalsequenzspaltung prozessiert und war in seiner reifen Form pl gegenüber einer Proteinase K-Degradation geschützt (Abbildung 21, Gel 1, Spur 1 und Gel 2, Spur 1 + 2). Eine Behandlung mit Ophiobolin A (Ophio A), Phenoxybenzamin (Phe) sowie Calmidazolium (CAL) mit Konzentration oberhalb von 100 μM hingegen resultierte in einer vollständigen Inhibition des ER-Importes (Abbildung 21, Gel 1, Spur 2, 5; Gel 2, Spur 5). Dem gegenüber hatten Trifluoperazin (TFP) sowie CaMKII auch in der höchsten, getesteten Konzentration (200 μM bzw. 100 μM) keinen Einfluss auf

VI. Ergebnisse

die Prozessierung von ppl (Abbildung 21, Gel 1, Spur 8; Gel 2, Spur 3). Allerdings führte die Zugabe von CaMKII zur Hemmung der Proteinsynthese, weshalb für die nachfolgenden cotranslationalen Experimente auf die Zugabe dieses Inhibitors verzichtet wurde (Abbildung 21, A). Die Untersuchung von pp α F lieferte etwas diffizilere Ergebnisse. Wurde im Fall von ppl noch eine Hemmung der Prozessierung durch einen Teil der CaM-Antagonisten beobachtet und somit auf eine reine Transportinhibition geschlossen, wurden für pp α F mehrere Beobachtungen gemacht. Da das Protein sowohl gespalten als auch glykosyliert wird, diese zweite Modifikation in RM jedoch meist unvollständig erfolgt, wurden unter Kontrollbedingungen beide Formen beobachtet. Für eine Quantifizierung der Prozessierung wurde stets die Summe beider Modifikationen im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge berechnet. Unter Kontrollbedingungen bzw. mit einer Ophiobolin A-Konzentration im nicht-inhibitorischen Bereich lagen beide Prozessierungsformen etwa in gleichem Maße vor und bildeten einen prozentuellen Anteil von 27-37 % des Gesamtproteins. Zudem wiesen beide eine nahezu vollständige Proteaseresistenz auf (Abbildung 21, B; Gel 1, Spur 7 + 8; Gel 2-4, je Spur 1 + 2). In Gegenwart einer Ophiobolin A-Konzentration über 10 μ M ergab die Berechnung der Prozessierung einen Wert von 79-85 %, was eine Steigerung der Transportrate vermuten lässt. Allerdings fehlte die Glykosylierung in diesem Fall vollständig bei ausschließlicher Signalpeptidabspaltung des pp α F. Darüber hinaus war diese prozessierte Bande nicht gegenüber proteolytischer Degradation geschützt, ein Indiz für eine fehlende Integrität der ER-Membran (Abbildung 21, B, Gel 1, Spur 1, 2, 4 + 5). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für Phenoxybenzamin beobachtet. Ab einer Konzentration von 100 μ M wurde eine Hemmung des Transportes (9 % Prozessierung) beobachtet, die ab 200 μ M ebenfalls in eine verstärkte Spaltung (35 % Prozessierung) sowie fehlende Glykosylierung überging, jedoch verlor dieses Protein ebenfalls jedweden Schutz gegenüber einer Proteasebehandlung (Abbildung 21, B, Gel 2, Spur 3 -6). Die beiden anderen CaM-Antagonisten zeigten einen vergleichbaren Einfluss auf den *in vitro* Transport von pp α F wie bereits bei der Untersuchung von ppl. Calmidazolium bewirkte eine Inhibition der Prozessierung ab einer Konzentration von 50 μ M, TFP hingegen hatte keinen Effekt auf die *in vitro* Translokation des Vorläuferproteins (Abbildung 21, B, Gel 3, Spur 7; Gel 4). Zuletzt sollte das eigentlich posttranslational transportierte ppcecA unter cotranslationalen Bedingungen getestet werden, was auch unter diesen Bedingungen, wie oben erwähnt, fakultativ möglich ist. Die Protease-Behandlung (wie in allen Abbildungen als P angegeben) erfolgte hierbei mit einer Kombination aus Proteinase K und Trypsin (V.2.3.3.3) um das zytosolische Vorstufenprotein vollständig abzubauen. Unter Kontrollbedingungen (0,1 % DMSO) lag der prozessierte Anteil von ppcecA bei 18 %, was auch in einer nachfolgenden Sequestrierung als geschützt vorlag (Abbildung 21, C, Spur 1 + 2). In Anwesenheit von Ophiobolin A, ab einer Konzentration von 50 μ M, wurde die Translokation nahezu vollständig inhibiert (Abbildung 21 C, Spur 8). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für Calmidazolium beobachtet (Tabelle 14). Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, hemmte ein Teil der CaM-Antagonisten (Ophiobolin A, Phenoxybenzamin und Calmidazolium) den cotranslationalen *in vitro*

Transport der getesteten Vorläufer ppl, pp α F und ppcecA. Allerdings zeigten Ophiobolin A und Phenoxybenzamin die unerwartete Eigenschaft, im Fall des pp α F eine vermeintliche Verstärkung der Signalpeptidasespaltung bei gleichzeitiger Hemmung der Glykosylierung zu bewirken. Dieses Spaltungsfragment verlor jedoch seine Proteaseresistenz. Daher stellte sich die Frage nach einer membranpermeabilisierenden Wirkung dieser CaM-Antagonisten. Zur Überprüfung wurden analoge *in vitro* Translokationsexperimente mit dem Substrat ppl durchgeführt. Zusätzlich erfolgte nach 60 min (nach erfolgter Translokation) die Inkubation mit einem der CaM-Antagonisten, Ophiobolin A, Phenoxybenzamin, TFP oder Calmidazolium (jeweils 200 μ M) für weitere 15 min bei 30 °C. Als Kontrolle wurden vergleichbare Ansätze entsprechend mit Puffer (0,1 % DMSO) behandelt. Die Proben wurden daraufhin aufgeteilt und entweder mit Saccharose- oder Proteinase K-Lösung für 60 min bei 0°C behandelt (V.2.3.3.3) sowie anschließend mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) und „phosphorimaging“ (V.2.1.6) analysiert.

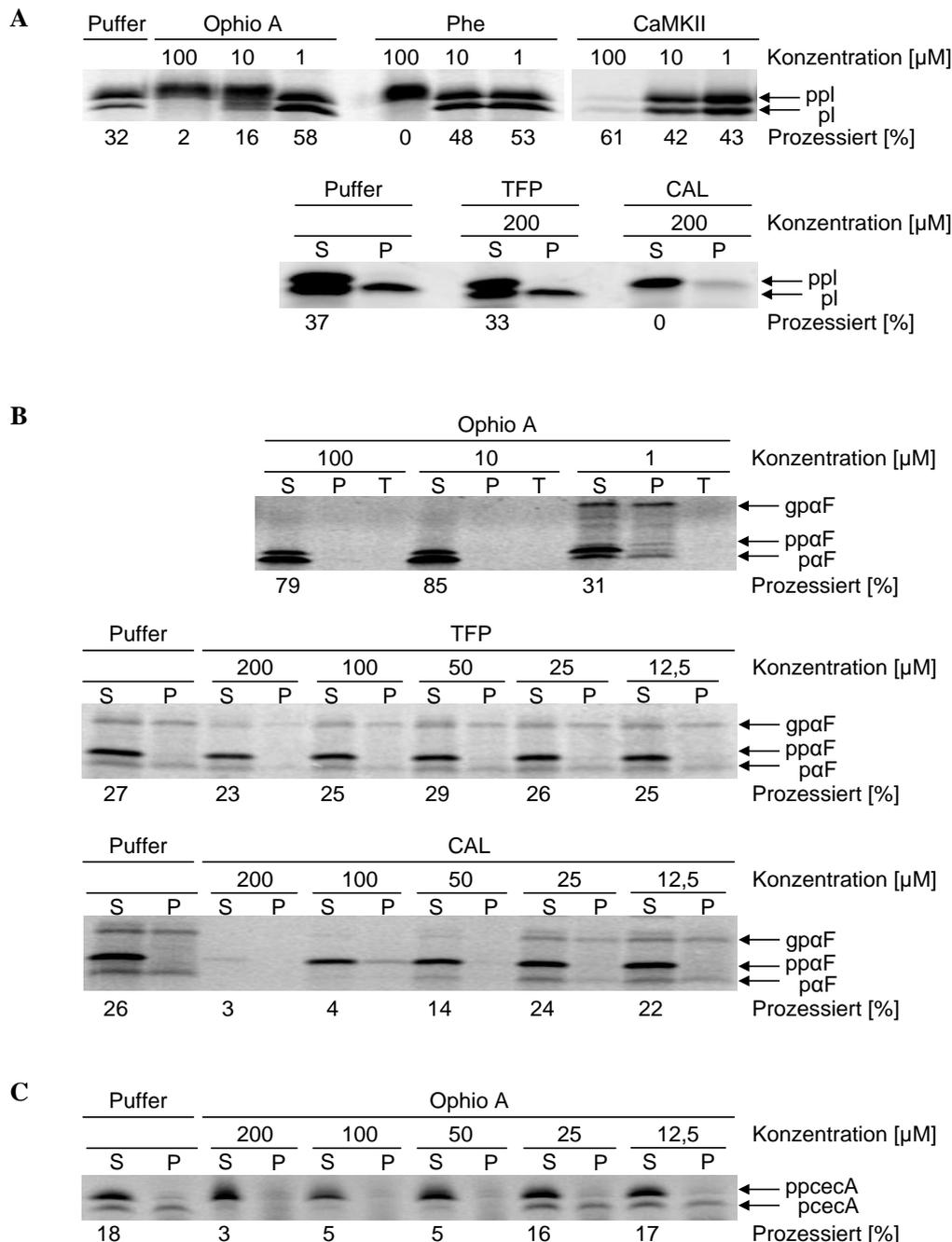


Abbildung 21: *In vitro* Synthese und cotranslationaler Transport (V.2.3.3.1) diverser Vorläuferproteine in raue Hundepankreas-mikrosomen (RM) in Anwesenheit verschiedener CaM-Antagonisten. Nach Translation der mRNA (60 min, 30 °C) von **A**) Präprolaktin (ppl), **B**) Präpro- α -Faktor (pp α F) oder **C**) Präprocrocipin A (ppcecA) im L416A-Retikulozytenlysat, in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin, 6 % RM sowie verschiedenen Konzentrationen der CaM-Antagonisten Ophio A, TFP, CAL, Phe und CaMKII. (10-200 μ M) wurden die Proben, wenn angezeigt, einer Sequestrierung unterzogen. Hierzu wurden die Ansätze zu je zwei Aliquots aufgeteilt und mit Saccharose- (S) oder Proteinase K-Lösung (P) versetzt (bei ppcecA: Proteinase K + Trypsin). Nach 60 min Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM PMSF (in Ethanol) für 5 min auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden die Proben auf SDS-PA-Gel (15-17,5 %) oder einem 19,4 %-igen SDS-Harnstoffgel (ppcecA) elektrophoretisch (V.2.1.1, V.2.1.1.1) aufgetrennt, die Proteine über „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert. (p = prä, Signalpeptid; g = glykosyliert) Zur Angabe der Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren (im Fall einer Sequestrierung unter S) der prozentuale Anteil des modifizierten Proteins (gespalten und/oder glykosyliert) im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer +prozessierte Form) angegeben (Ophio A = Ophiobolin A; TFP = Trifluoperazin; CAL = Calmidazolium; Phe = Phenoxybenzamin; CaMKII = Calmodulin Kinase II-Bindepeptid; Puffer = 0,1 % DMSO). Die Quantifizierung der Prozessierung entspricht je einem einzelnen Experiment.

VI. Ergebnisse

Unter den angegebenen Bedingungen wurde ppl in Anwesenheit der Pufferkontrolle wie erwartet transportiert (36 % Prozessierung) und wies auch nach 15 min Nachbehandlung mit 0,1 % DMSO eine praktisch vollständige Proteaseresistenz auf (Abbildung 22, Gel 1, Spur 1 + 2). Wurde ein gleichartiger Ansatz für 15 min mit Ophiobolin A oder Phenoxybenzamin nachbehandelt, hatte dies zwar keinen Einfluss auf die Prozessierungseffizienz (jeweils 38 %), allerdings wurde der zuvor geschützte, reife Anteil des Proteins vollständig (Ophiobolin A) oder teilweise (Phenoxybenzamin) durch Proteinase K degradiert (Abbildung 22, Gel 1, Spur 7-10). Dabei entsprach der Grad des Abbaus dem der Degradation in den jeweiligen Ansätzen mit simultaner CaM-Antagonisten-Behandlung (Abbildung 22, Gel 1, Spur 4, 6, 8 + 10). Sowohl Calmidazolium als auch TFP (40 und 39 % Prozessierung) hatten keinen negativen Effekt auf die Membranintegrität der Vesikel (Abbildung 22, Gel 2, Spur 2 + 4).

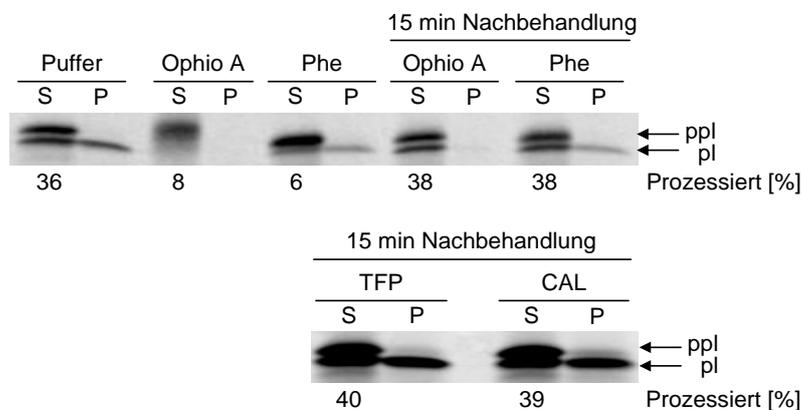


Abbildung 22: *In vitro* Synthese und cotranslationaler Transport (V.2.3.3.1) von Präprolaktin (ppl) in raue Mikrosomen (RM) sowie Behandlung mit verschiedenen CaM-Antagonisten während oder nach dem Transport. Die mRNA von ppl wurde im L416A-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin, 6 % RM sowie jeweils 200 µM der CaM-Antagonisten Ophio A oder Phe translatiert. Zur Untersuchung eines potentiell membranpermeabilisierenden Einflusses der CaM-Antagonisten, wurden die Proben nach erfolgreicher Translokation (nach 60 min, 30 °C) in Gegenwart von Puffer (0,1 % DMSO) für 15 min bei 30 °C mit Puffer oder einem der CaM-Antagonisten Ophio A, Phe, TFP oder CAL (je 200 µM) inkubiert. Anschließend wurden alle Proben einer Sequestrierung unterzogen. Hierzu wurden die Ansätze zu je zwei Aliquots aufgeteilt und entweder mit Saccharose- (S) oder Proteinase K-Lösung (P) versetzt, 60 min auf Eis inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Zugabe von 100 mM PMSF (in Ethanol) auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden die Proben auf einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch (IV.2.1.1, IV.2.1.1.1) aufgetrennt und die Proteine über „phosphorimaging“ (IV.2.1.6) detektiert und densitometrisch (IV.2.1.7) analysiert (p = prä, Signalsequenz). Die Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren (unter S) als prozentualer Anteil des gesamten Proteins (Vorläufer + prozessierte Form) angegeben (Ophio A = Ophiobolin A; TFP = Trifluoperazin; CAL = Calmidazolium; Phe = Phenoxybenzamin). Die Quantifizierung der Prozessierung entspricht jeweils einem einzelnen Experiment.

Zur weiteren Verifizierung des Sec61-abhängigen Transportes wurde das trunkierte Präprolaktin ppl₈₆ verwendet, welches aufgrund des fehlendes Stopcodons und seines generell cotranslationalen Transportmodus mit der am Ribosom immobilisierten Polypeptidkette im Sec61-Translokation arretiert. Eine Prozessierung zur reifen Form ppl₅₆ kann nur durch eine Freisetzung vom Ribosom erfolgen, da so die Polypeptidkette ins ER Lumen gelangt und für den Signalpeptidasekomplex zugänglich wird. Zu diesem Zweck wurde Puromycin hinzugegeben, welches strukturell einer Aminoacyl-tRNA ähnelt

und durch Bindung im Peptidyltransferasezentrum (Muto und Ito, 2008; Rodriguez-Fonseca *et al.*, 2000) naszierende Polypeptidketten vom synthetisierenden Ribosomen freisetzt (Ennis, 1965; Morris und Schweet, 1961). Wird stattdessen SMCC (Succinimidyl-4-(*N*-Maleimidomethyl) appliziert kann eine chemische Quervernetzung von ppl₈₆ zu Sec61 generiert werden, was als höhermolekulares Addukt im PA-Gel detektierbar (V.2.1.6) ist (Connolly und Gilmore, 1986; Zimmermann *et al.*, 1991). Aufgrund der Inhibition des cotranslationalen *in vitro* Transportes von ppl durch einen Teil der CaM-Antagonisten wurde untersucht, ob dies einer verminderten Interaktion zu Sec61 zugrundeliegt und somit bereits das „targeting“ bzw. die Insertion in die Translokationspore inhibiert wird oder ob ein stromabwärts liegender Prozess, wie die Aktivität der Signalpeptidase beeinflusst wird (da die Inhibitoren durch ihre hohe Hydrophobizität auch über die ER-Membran ins Lumen gelangen). Weil Ophiobolin A und Phenoxybenzamin eine Permeabilisierung der ER-Membran verursachen, wurden die beiden Inhibitoren in diesem Fall nicht verwendet. Ppl₈₆ wird aufgrund seiner SRP-Abhängigkeit auch posttranslational als arretierter RNC₈₆-Komplex zum Sec61-Komplex dirigiert und die Polypeptidkette partiell in die Translokationspore inseriert (Connolly und Gilmore, 1986). Da somit die Anwesenheit von rauem ER während der Synthese für diesen Transporttyp nicht obligatorisch ist, wurde ein posttranslationaler Aufbau gewählt, damit auch zusätzlich der CaM-Antagonist CaMKII getestet werden konnte, welcher wie zuvor demonstriert die Proteinsynthese hemmt (Abbildung 21, Gel 1, Spur 8). Die Synthese von ppl₈₆ wurde wie unter Punkt V.2.3.3.1 beschrieben für 20 min durchgeführt und der Ansatz anschließend mit 6 % RM sowie unterschiedlichen Konzentrationen der CaM-Antagonisten Calmidazolium, TFP oder CaMKII (12,5-200 µM) versetzt. Nach Inkubation für weitere 30 min bei 30 °C wurden die Membranen sedimentiert, in Quervernetzungspuffer resuspendiert und auf zwei Ansätze aufgeteilt, wovon jeweils einer mit Puromycin behandelt wurde. Im Anschluss wurden alle Proben weitere 30 min bei 0 °C mit dem chemischen Quervernetzer SMCC behandelt und mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) und „phosphorimaging“ (V.2.1.6) analysiert. Wie erwartet wurde ppl₈₆ in Gegenwart von Puffer (0,1 % DMSO) nach Puromycin-Behandlung größtenteils zu ppl₅₆ prozessiert (63-73 %), was einem Transport ins ER-Lumen entspricht (Abbildung 23, Gel 1, Spur 3, Gel 2, Spur 1), und mit einer ebenso hohen Effizienz von 73-84 % infolge der SMCC-Behandlung (in Abwesenheit von Puromycin) mit dem Sec61-Komplex quervernetzt (Abbildung 23, Gel 1, Spur 4, Gel 2, Spur 2). Mit steigenden Konzentrationen an Calmidazolium assoziierte ppl₈₆ weniger effizient mit dem Sec61-Komplex (8 %) und konnte auch nicht mehr mittels Puromycin-Behandlung zu ppl₅₆ prozessiert (2 %) werden (Abbildung 23, Gel 1, Spur 5 + 6). TFP und CaMKII hingegen hatten keinen negativen Einfluss auf die ppl₈₆-Translokation, sondern ließen im Gegenzug sogar eine leichte Steigerung der Quervernetzung zu Sec61 (von 73 % auf 79 bzw. 82 %) erkennen (Abbildung 23, Gel 2). Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Mikrosomen (mit MVP = Mikrosomenverdünnungspuffer) mitgeführt, welcher wie erwartet keine Prozessierung bzw. Quervernetzung aufwies (Abbildung 23, Gel 1, Spur 1 + 2).

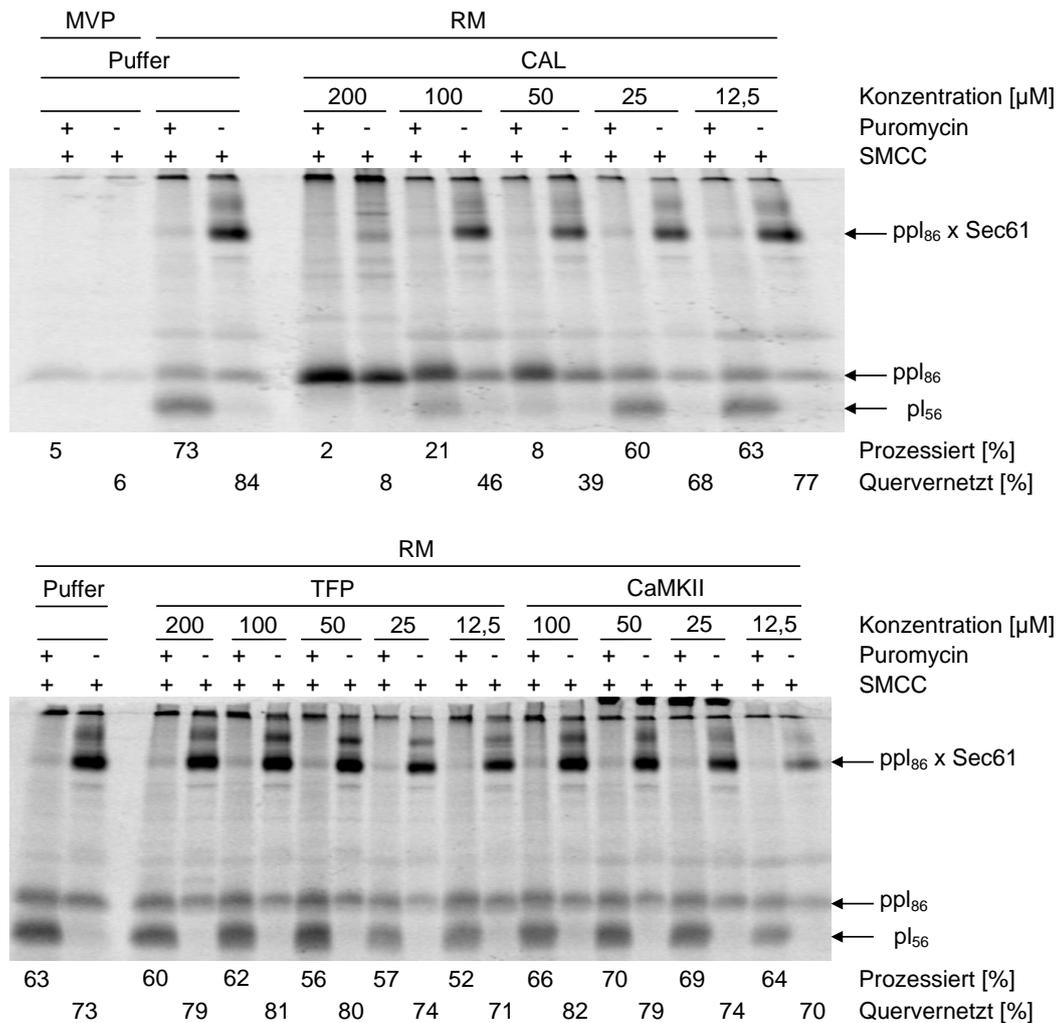


Abbildung 23: *In vitro* Transport in raue Hundepankreas-mikrosomen (RM) und chemische Quervernetzung von Präprolalin₈₆ (ppI₈₆) in Anwesenheit verschiedener CaM-Antagonisten. Nach Translation der ppI₈₆ mRNA im L416A-Retikulozytenlysate in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin für 20 min bei 30 °C wurden 6 % RM sowie verschiedene Konzentrationen der CaM-Antagonisten CAL, TFP und CaMKII. (12,5-200 μM) hinzugegeben und die Proben für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1:2 aufgeteilt und mit oder ohne Puromycin (1,25 mM) für weitere 20 min bei 30°C behandelt. Danach wurden alle Proben mit SMCC (335 mM) versetzt, für 30 min bei 0 °C inkubiert und anschließend auf einem 19,4 %-igen SDS-Harnstoffgel elektrophoretisch (V.2.1.1, V.2.1.1.1) aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) und Densitometrie (V.2.1.7). Die Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren mit Puromycin-Behandlung als prozentualer Anteil des gespaltenen Proteins (ppI₅₆) im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer +prozessiert) angegeben. Die Quervernetzungseffizienz wurde jeweils unter den entsprechenden Spuren als prozentualer Anteil des quervernetzten Proteins (ppI₈₆ x Sec61) im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + quervernetzte Form) angegeben. (TFP = Trifluoperazin; CAL = Calmidazolium; CaMKII = Calmodulin Kinase II Pseudopeptid; Puffer = 0,1 % DMSO; MVP = Mikrosomenverdünnungspuffer; p = prä, Signalsequenz). Die Quantifizierung der Prozessierung entspricht je einem einzelnen Experiment.

VI.1.1.2. CaM-Antagonisten hemmen nur schwach den SRP-unabhängigen ER-Import, manche können diesen sogar stimulieren

Zur Untersuchung des posttranslationalen Transportes wurde das bereits unter cotranslationalen Bedingungen getestete ppcca verwendet und die Synthese wie im Methodenteil beschrieben (V.2.3.3.2) durchgeführt. Den Ansätzen wurden anschließend 6 % RM sowie entweder Puffer

VI. Ergebnisse

(0,1 % DMSO) oder verschiedene Konzentrationen (12,5-200 μM) der CaM-Antagonisten Ophiobolin A, TFP, und CaMKII zugesetzt und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden daraufhin einer Sequestrierung unterzogen, auf einem 19,4 %-igen SDS-Harnstoffgel (V.2.1.1.1) aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert. Die Transporteffizienz von ppcecA unter posttranslationalen Bedingungen spiegelte sich im Fall der Pufferkontrolle in einer Prozessierung von 15-17 % wieder (Abbildung 24, A und B, je Spur 1 + 2). Die Behandlung mit Ophiobolin A bewirkte, im Gegensatz zum cotranslationalen Modus erst ab einer Konzentration von 200 μM eine deutliche Hemmung (3 % Prozessierung). Gleiches trifft auch auf die beiden CaM-Antagonisten Calmidazolium sowie Phenoxybenzamin zu (Tabelle 14). TFP sowie CaMKII hatten dabei wie bereits unter cotranslationalen Bedingungen keinen inhibitorischen Effekt auf die Translokation. CaMKII bewirkte im posttranslationalen *in vitro* Transport darüber hinaus ab einer Konzentration von 50 μM sogar eine deutliche Steigerung der Prozessierungseffizienz von ppcecA mit ca. 30 % auf etwa das Doppelte der DMSO-Kontrolle (Abbildung 24, B, Spur 3 + 5).

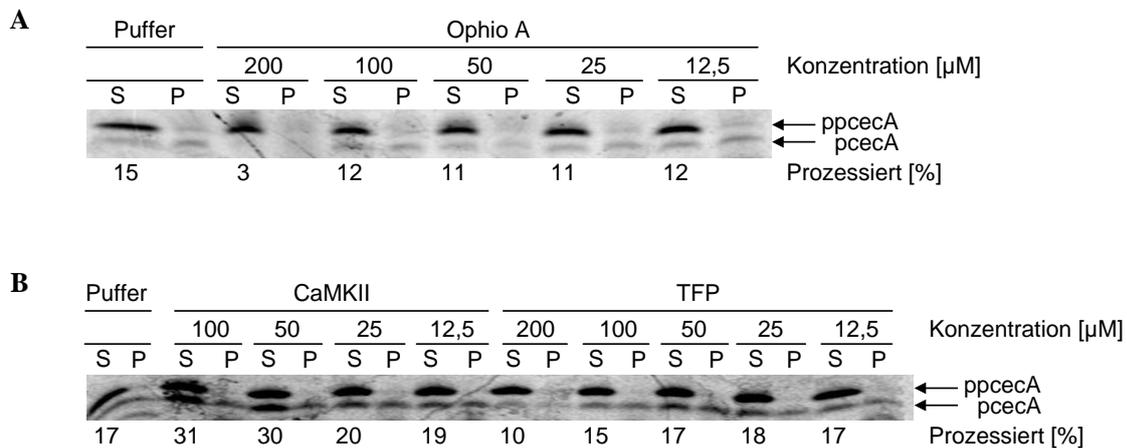


Abbildung 24: *In vitro* Synthese und posttranslationaler Transport von Präprocecropin A (ppcecA) in raue Hundepankreas-mikrosomen (RM) in Anwesenheit verschiedener CaM-Antagonisten. Nach Translation der ppcecA mRNA im L416A-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin für 15 min bei 30 °C wurden Cycloheximid (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie RNase A (80 $\text{ng}/\mu\text{l}$) hinzugesetzt und weitere 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 % RM sowie unterschiedliche Konzentrationen der CaM-Antagonisten **A**) Ophio A, **B**) TFP und CaMKII. (12,5-200 μM) zu den Ansätzen gegeben und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Sequestrierung der Ansätze durchgeführt. Hierzu wurden die Proben auf zwei Aliquots aufgeteilt und entweder mit Saccharose- (S) oder Proteinase K/Trypsin-Lösung (P) versetzt. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM PMSF (in Ethanol) und PLAC (1:1.000) für 5 min auf Eis inhibiert. Die Proben wurden auf einem 19,4 %-igen SDS-Harnstoffgel (für ppcecA) elektrophoretisch (V.2.1.1, V.2.1.1.1) aufgetrennt und die Proteine über „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert (p = prä, Signalsequenz). Zur Angabe der Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren (unter S) der prozentuale Anteil des modifizierten Proteins (gespalten und/oder glykosyliert) im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + prozessierte Form) angegeben (Ophio A = Ophiobolin A; TFP = Trifluoperazin; CaMKII = Calmodulin Kinase II-Bindepeptid). Die Quantifizierung der Prozessierung entspricht jeweils einem einzelnen Experiment.

VI. Ergebnisse

In Tabelle 14 sind alle Ergebnisse der co- und posttranslationalen *in vitro* Transportversuche mit ppl, ppl₈₆, ppαF und ppcecA (VI.1.1.1, VI.1.1.2) zusammengefasst. Zudem wurden Daten eingefasst, die nicht in den Abbildungen aufgeführt sind.

Tabelle 14: Zusammenfassung der co- und posttranslationalen *in vitro* Translokations-Experimente verschiedener Vorstufenproteine in raue Hundepankreasmikrosomen (RM) unter Punkt VI.1.1.1 und VI.1.1.2. Einfluss von Calmodulin-Antagonisten auf die Translokationseffizienz (ppl = Präprolaktin; ppl₈₆ = Trunkiertes, 86 Aminosäuren langes Präprolaktin; ppαF = Präpro-α-Faktor; ppcecA = Präprocecropin A; CaMKII = Calmodulin-Bindungspeptid der Calmodulin-Kinase II; n.b. = nicht bestimmt; co = cotranslational, post = posttranslational). Alle Versuche wurden jeweils nur einmal durchgeführt.

	Ophiobolin A	Trifluoperazin	Calmidazolium	Phenoxybenzamin	CaMKII
ppl (co)	- Inhibition des Transportes ab 50 µM - fehlende Protease-resistenz	- kein Effekt	- Inhibition des Transportes ab 25 µM	- Inhibition ab 100 µM - verminderte Protease-resistenz	- Hemmung der Proteinsynthese
ppl₈₆ (co)	n.b.	- keine Inhibition - Quervernetzung zu Sec61 ab 100 µM leicht verstärkt	- Inhibition ab 50 µM - - Quervernetzung zu Sec61 ab 200 µM inhibiert	n.b.	- keine Inhibition - Quervernetzung zu Sec61 ab 100 µM leicht verstärkt
ppαF (co)	- Inhibition des Transportes ab 10 µM - fehlende Protease-resistenz (SPase-Aktivität verstärkt)	- kein Effekt	- Inhibition ab 50 µM	- Inhibition des Transportes ab 100 µM - verminderte Protease-resistenz (SPase-Aktivität verstärkt)	- Hemmung der Proteinsynthese
ppcecA (co)	- Inhibition ab 50 µM	n.b.	- Inhibition ab 50 µM	n.b.	n.b.
ppcecA (post)	- Inhibition ab 200 µM	- kein Effekt	- Inhibition ab 200 µM	- Inhibition ab 200 µM	- Steigerung der Translokation ab 50 µM

VI.1.1.3. Ca^{2+} -CaM inhibiert die Integration von „tail-anchored“-Proteinen in die ER-Membran

Die sogenannten „tail-anchored“ Membranproteine (TA-MP) stellen eine Ausnahme der ins ER importierten Proteinvorläufer dar, da ihre Insertion in die ER-Membran im Gegensatz zu den meisten Proteinen, anstelle einer N-terminalen Signalsequenz, eine am C-Terminus der Polypeptidsequenz lokalisierte Transmembrandomäne in Form einer Signalankersequenz erfordert (Kutay *et al.*, 1993). Dies hat die Konsequenz, dass die Membrainsertion dieser Proteinklasse ausschließlich post-translational erfolgt, da der C-terminale Membrananker erst im Zytosol exponiert wird, wenn die Synthese am Ribosom vollständig abgeschlossen ist. Zudem erfordert die Integration nicht den Sec61-Komplex (Borgese, 2009; Borgese und Fasana, 2011). Der luminal lokalisierte C-Terminus des TA-MP Cytochrom b5 (Cytb5) wurde mit einer 28 AS langen N-Glykosylierungssequenz des Proteins Opsin verlängert und somit modifiziert (Cytb5-ops28; im Folgenden vereinfacht Cyb5 genannt), was jedoch keinen Einfluss auf die Insertionskompetenz hat (Brambillasca *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2009). Somit war es möglich die korrekte Insertionseffizienz anhand der Glykosylierung nachzuverfolgen, wie auch durch gleichzeitige Überprüfung der Insertion mittels eines Carbonatresistenz-„assays“ verifiziert wurde (Haßdenteufel *et al.*, 2011).

Nachdem der Fokus der vorherigen Experimente verstärkt auf einer direkten Wirkung der CaM-Antagonisten auf den Proteintransport lag, wurde nun die Rolle zytosolischer Proteine bei der Insertion von TA-MP in die Phospholipiddoppelschicht untersucht. Hierbei sollte der Transport des beschriebenen Modellsubstrates Cytb5 in die Membran rauher Mikrosomen (RM) in Gegenwart von Ca^{2+} -CaM überprüft werden. Anhand früherer Untersuchungen der Arbeitsgruppe Zimmermann war bekannt, dass CaM keinen Einfluss auf die Importeffizienz Sec61-abhängiger Vorstufenproteine hat. Allerdings hat Ca^{2+} alleine, in höheren Konzentrationen (ca. 600 μM), eine Inhibition der Proteintranslokation über den Sec61-Komplex zur Folge, was sogar durch die Zugabe von CaM wieder aufgehoben wird (Erdmann *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2011). Die posttranslationale Translokation von Cyb5 wurde wie unter Punkt V.2.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach Abstoppen der Synthese wurden neben den RM zusätzlich 600 μM Ca^{2+} (Das Retikulozytenlysate beinhaltet ca. 400 μM EGTA, was bei einer 1:1 Stöchiometrie von Ca^{2+} :EGTA eine theoretische Endkonzentration von 200 μM Ca^{2+} ergibt) sowie unterschiedliche Konzentrationen CaM (aus Testis von *Bos taurus*) hinzugegeben (6-60 μM) und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Wie in Abbildung 25, A (Gel 1-3, je Spur 1) zu sehen ist lag die Glykosylierungseffizienz von Cytb5 bei alleiniger Zugabe der Pufferkontrolle (0,1 % DMSO) bei 7-11 %. Wurden zusätzlich während der Translokationsreaktion 600 μM Ca^{2+} sowie steigende Konzentrationen CaM hinzugegeben, bewirkten bereits 6 μM CaM eine Reduktion der Cytb5-Insertion um etwa 50 % (Abbildung 25, A, Gel 1, Spur 3), welche oberhalb einer Konzentration von 30 μM vollständig ausgeprägt war (Abbildung 25 A, Gel 1, Spur 2, Gel 2 + 3, je Spur 2 + 3). Basierend auf Untersuchungen der Arbeitsgruppe

Zimmermann wurde bereits im Vorfeld gezeigt, dass die alleinige Zugabe von 700 μM Ca^{2+} in einem analogen Transportansatz mit Cytb5 keine Reduktion der Insertion des TA-MP zur Folge hat (Haßdenteufel *et al.*, 2011). Somit weist Ca^{2+} -CaM eine konzentrationsabhängige Inhibition der TA-Membraninsertion auf. Unter gleichen Bedingungen wurden anstelle der Pufferkontrolle jeweils 200 μM Ophiobolin A, Phenoxybenzamin, TFP oder Calmidazolium bzw. 100 μM CaMKII appliziert, welche eine Suppression der Ca^{2+} -CaM-Substratbindung hervorrufen sollten (Abbildung 25, A, Gel 1, Spur 4 + 5, Gel 2, Spur 6-17, Gel 3, Spur 6-9). Wider Erwarten wurden jedoch nur zwei der Inhibitoren, und zwar TFP und CaMKII, dieser Aufgabe gerecht (Abbildung 25, A), bemerkenswerterweise die gleichen Inhibitoren, welche in den vorangegangenen *in vitro* Translokationsexperimenten als einzige keine Inhibition des Sec61-abhängigen ER-Importes bewirkt hatten (VI.1.1.1, VI.1.1.2). Beide CaM-Antagonisten waren dabei in der Lage die Insertionshemmung von Cyb5 nicht nur aufzuheben, sondern sogar die Glykosylierungseffizienz zu steigern (von 7-9 % auf 10 % im Fall von CaMKII und auf 19 % im Fall von TFP). Das Experiment zur Insertionshemmung von Cyb5 wurde mit einer konstanten, etwa physiologischen CaM-Konzentration (Black *et al.*, 2004) von 10 μM (in Gegenwart von 600 μM Ca^{2+}) wiederholt, welche bereits eine nahezu vollständige Inhibition der Glykosylierung (Reduktion von 8 % ohne Ca^{2+} -CaM auf 2 % mit Ca^{2+} -CaM) bewirkte (Abbildung 25, B, Spur 1+2). Die Zugabe von TFP in steigenden Konzentrationen (12,5-200 μM) bewirkte dabei eine stetige Zunahme des Glykosylierungssignales über den kompletten Konzentrationsbereich, die bis hin zu einer dreifach gesteigerten Insertionseffizienz von 25 % (bei 200 μM TFP) gegenüber der Pufferkontrolle führte (Abbildung 25, B, Spur 3-7).

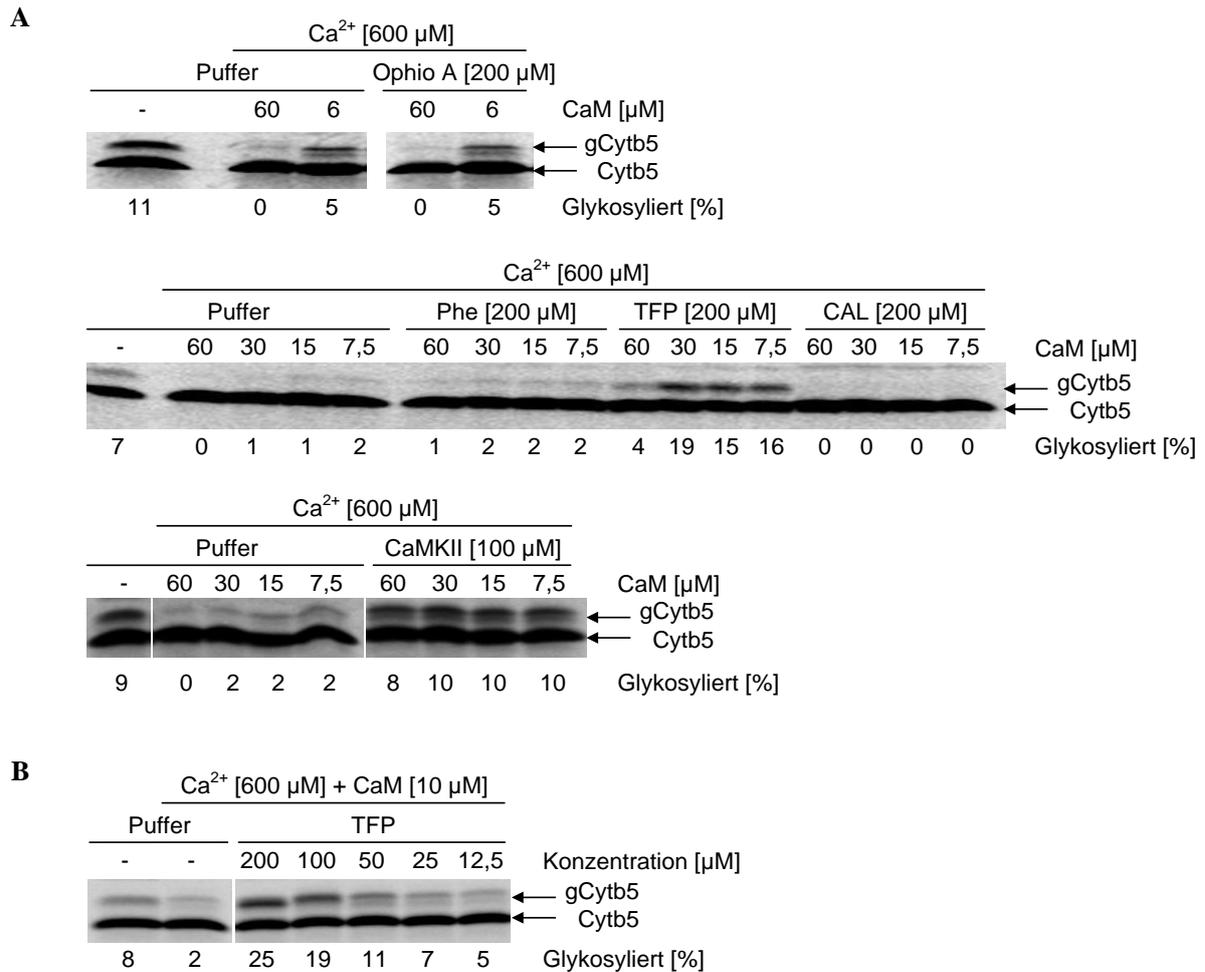


Abbildung 25: *In vitro* Synthese und posttranslationale Membraninsertion des „tail-anchor“ Proteins Cytochrom b5 (Cytb5) in raue Hundepankreas-mikrosomen (RM) in Anwesenheit von Ca²⁺ und verschiedenen Konzentrationen CaM sowie diverser CaM-Antagonisten. Nach Translation der Cytb5 mRNA im L416A-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin für 15 min bei 30 °C wurden Cycloheximid (0,1 μg/μl) sowie RNase A (80 ng/μl) hinzugegeben und weitere 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 % RM und, wenn angegeben, 600 μM Ca²⁺, 200 μM einer der CaM-Antagonisten Ophio A, Phe, CAL, TFP oder CaMKII (nur 100 μM) sowie unterschiedliche Konzentrationen CaM (7,5-60 μM) zu den Ansätzen gegeben und weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem 17,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (V.2.1.1) aufgetrennt und die Proteine mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert (g = glykosiliert). Zur Angabe der Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren der prozentuale Anteil des glykosylierten Proteins im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + reife Form) angegeben (Ophio A = Ophiobolin A; Phe = Phenoxybenzamin; TFP = Trifluoperazin; CAL = Calmidazolium; CaMKII = Calmodulin Kinase II-Bindepeptid). **A)** *In vitro* Transport von Cytb5 in An- und Abwesenheit von 600 μM Ca²⁺, 200 μM der oben genannten CaM-Antagonisten (100 μM CaMKII) sowie jeweils steigenden Konzentrationen (6-60 μM) CaM (*Bos taurus*). **B)** *In vitro* Transport von Cytb5 in An- und Abwesenheit von 600 μM Ca²⁺, 10 μM CaM und steigenden Konzentrationen (12,5-200 μM) TFP. Die Quantifizierung der Glykosylierung entspricht jeweils einem einzelnen Experiment.

VI.1.2. Einfluss von Calmodulin auf die Ca^{2+} -Homöostase des ER

Neben der Proteinsynthese und einer Reihe weiterer Aufgaben dient das ER in Säugetierzellen als Speicher für zelluläres Ca^{2+} . Aufgrund des niedrigen Ca^{2+} -Gehaltes im Zytosol besteht über die ER-Membran ein extrem hoher Ca^{2+} -Konzentrationsgradient (Jaepel und Blum, 2011). Der Sec61-Komplex wird elektrophysiologischen Untersuchungen zufolge als unspezifischer Ionenkanal postuliert. Diese Leitfähigkeit ist plausibel, wird in Betracht gezogen, dass der Durchmesser der Translokationspore im offenen Zustand zwischen 26 und 60 Å beträgt (Hamman *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 2003). Somit verbleibt ausreichend Raum, um hydratisiertes Ca^{2+} (ca. 2,5 Å) passieren zu lassen (Strynadka und James, 1989). Anhand von Strukturdaten ist auch das Ribosom nicht in der Lage die Translokationspore vollständig zu schließen (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008). Entsprechende Untersuchungen auf zellulärer Ebene haben gezeigt, dass der Sec61-Komplex nach Freisetzung der Polypeptidkette mit Puromycin transient permeabel für Ca^{2+} ist und offensichtlich einen Ca^{2+} -Leckkanal repräsentiert (Flourakis *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007; Van Coppenolle *et al.*, 2004). Wie durch Frank Erdmann anhand von Einzelkanalmessungen in planaren Lipiddoppelschichten gezeigt wurde, ist CaM zumindest unter zellfreien Bedingungen in der Lage die Ca^{2+} -Permeabilität des Sec61-Komplexes zu reduzieren, was vermutlich über die durch Martin Jung gezeigte Ca^{2+} -abhängige Interaktion zum identifizierten IQ-Motiv in der α -Untereinheit von Sec61 erfolgt (Erdmann *et al.*, 2011). Da diese Untersuchungen an isolierten ER-Vesikeln durchgeführt wurden, war das Ziel dieser Arbeit diese Erkenntnisse auf zellulärer Ebene zu charakterisieren. Hierzu sollte der Einfluss der zellulären CaM-Konzentration auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER überprüft werden, indem entweder CaM-GFP überexprimiert oder die bereits unter Punkt VI.1.1 verwendeten CaM-Antagonisten eingesetzt wurden, wobei TFP aufgrund seiner effizienten Hemmung der Ca^{2+} -CaM-vermittelten Insertionsinhibition von Cyb5 (VI.1.1.3) präferiert wurde. Ein weiterer potentieller Kandidat, das CaMKII konnte unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen mit intakten Zellen nicht eingesetzt werden, da es sich um ein Peptid handelt, welches aufgrund seiner hydrophilen Natur biologische Membranen nicht zu passieren vermag. Als alternativer CaM-Antagonist wurde Ophiobolin A ausgewählt, welcher auf zellulärer Ebene äußerst gut etabliert ist und als hochspezifisch beschrieben wird (Chigri *et al.*, 2005; Kong Au und Chow Leung, 1998; Leung *et al.*, 1985; Spehr *et al.*, 2009; Tipton *et al.*, 1977). Zwar zeigte Ophiobolin A keine Reduktion der Ca^{2+} -CaM-Wirkung im *in vitro* Experiment und wies unter diesen Bedingungen im Retikulozytenlysat unspezifische Eigenschaften auf, wie den destruktiven Einfluss auf ER-Membranen, allerdings spricht dies für einen möglichen systemspezifischen Messartefakt. Für alle Echtzeit- Ca^{2+} -Messungen wurde das unter V.2.6 erläuterte Ca^{2+} -„imaging“ angewandt, was nach Einweisung durch Prof. Adolfo Cavalié (Institut für Angewandte Pharmakologie und Toxikologie, UdS) erfolgte. Mit seiner Expertise wurde ein geeignetes, zur Messung von ER- bzw. Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Änderungen adäquates, Messprotokoll etabliert. Zur Analyse der zellulären Ca^{2+} -

Homöostase von HeLa- bzw. HeLa-CES2-Zellen wurden die Ca^{2+} -sensitiven, fluoreszenzbasierten Indikatoren Fura-2 AM (V.2.6.1) und Fluo-5N AM (V.2.6.3) eingesetzt.

VI.1.2.1. CaM-Antagonisten erhöhen den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER

Ein Hauptaugenmerk der Untersuchungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase lag auf dem passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER, dem sogenannten Ca^{2+} -Leckstrom. Um diesen Efflux zu visualisieren, wurden die HeLa-Zellen einerseits in Ca^{2+} -freiem Puffer (mit Ca^{2+} -chelatierendem EGTA) inkubiert, was eine ausschließliche Messung von intrazellulärem Ca^{2+} ermöglicht, und zudem mit dem Sesquiterpen-Lacton Thapsigargin (TG) behandelt. Diese aus *Thapsia garganica* isolierte Substanz ist ein etablierter, irreversibler Inhibitor ER-residenten Ca^{2+} -ATPasen der SERCA-Familie, welche den aktiven Rücktransport von Ca^{2+} aus dem Zytosol ins ER-Lumen gewährleisten. Unter den genannten experimentellen Voraussetzungen kann TG den Ca^{2+} -Efflux, dessen Stärke vom Vorhandensein bzw. der Permeabilität von Ca^{2+} -Leckkanälen abhängt, demaskieren und somit in Kombination mit einem Ca^{2+} -Indikator detektierbar machen (Jackson *et al.*, 1988; Sagara *et al.*, 1992; Thastrup *et al.*, 1989).

Messungen zytosolischer Ca^{2+} -Änderungen mit Fura-2

Zur Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Änderungen wurden unbehandelte HeLa-Zellen für 96 h auf einem Poly-L-Lysin-vorbehandelten Deckglas kultiviert und wie unter Punkt V.2.6.1 beschrieben mit Fura-2 AM beladen. Nach zwei Waschschrritten wurden die Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und die Messung mittels iMIC-Mikroskop gestartet. Nach 1 min wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μM Trifluoperazin (TFP) appliziert und die Messung für 10 min fortgesetzt. Anschließend wurde 1 μM TG hinzugegeben und weitere 9 min gemessen.

In Abbildung 26, A sind die Mittelwerte der durch Kalibrierung (V.2.6.2) aus den gemessenen Ratiowerten berechneten Ca^{2+} -Konzentrationen der einzelnen Messungen mit Standardfehler gegen die Zeit aufgetragen. Beide CaM-Antagonisten, Ophiobolin A sowie TFP, stimulierten infolge der 10-minütigen Vorbehandlung in gleicher Weise den TG-vermittelten passiven Ca^{2+} -Efflux aus dem ER. Zudem wurde ein initialer Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe beider CaM-Antagonisten über 10 min von anfänglich ca. 80 nM Ca^{2+} auf 150 nM (Ophio A) bzw. 200 nM (TFP) beobachtet, dessen Ursprung, im Gegensatz zum TG-induzierten Ca^{2+} -Ausstrom nicht klar dem ER zugeordnet werden konnte. Ein vergleichbar erhöhter, zytosolischer Ca^{2+} -Level sowie ein verstärkter passiver Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER kann auch in Sec62-depletierten HeLa-Zellen beobachtet werden (Greiner *et al.*, 2011b). Die statistische Auswertung in Abbildung 26, B zeigt daher die Ca^{2+} -Änderung nach Zugabe von TG. Diese maximale Änderung, die nach Ophiobolin A-Vorbehandlung bei ca. 700 nM und nach TFP-Zugabe bei ca. 650 nM lag, unterscheidet sich signifikant von der Ca^{2+} -Änderung im Fall einer Präinkubation mit Puffer (0,1 % DMSO), welche sich im Bereich von ca. 380 nM befand.

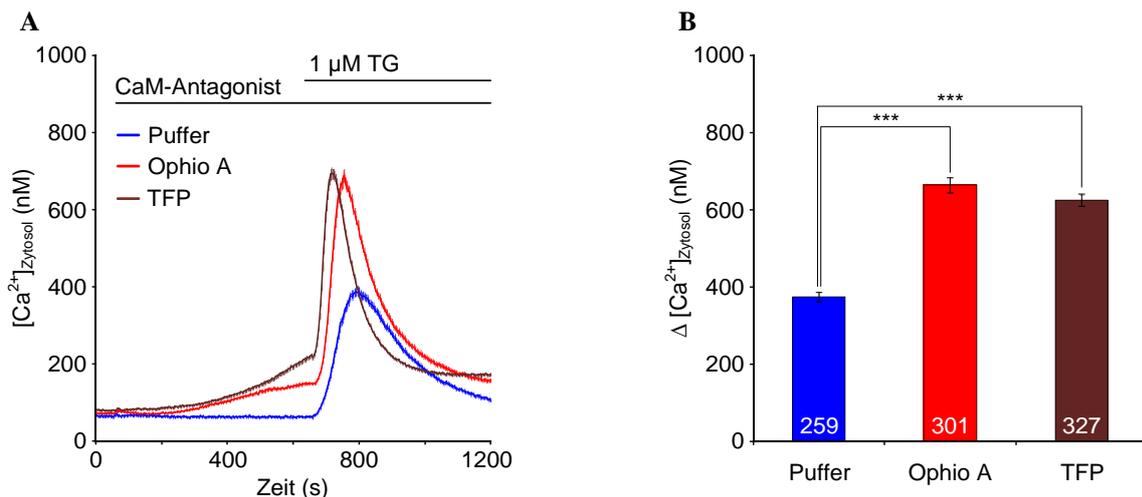


Abbildung 26: Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung nach Behandlung mit CaM-Antagonisten und Zugabe von Thapsigargin zur Untersuchung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER **A**) HeLa-Zellen wurden für 96 h auf einem Poly-L-Lysin-vorbehandelten 25 mm Deckglas (0,1 mg/ml) kultiviert und mit 3,5 μ M Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde anschließend in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μ M Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μ M Trifluoperazin (TFP) hinzugegeben. Nach 10 min wurde 1 μ M TG appliziert und weitere 9 min gemessen. Die y-Achse stellt die gemessene zytosolischen Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_{Zytosol} dar, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. **B**) Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von Thapsigargin der in (A) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 30-80 einzelne Zellen analysiert (n_{Puffer} = 4; n_{Ophio} = 6; n_{TFP} = 6). Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

Messungen ER-luminaler Ca²⁺-Änderungen mit Fluo-5N

Die Bestimmung der ER-luminalen Ca²⁺-Änderung wurde mit HeLa-CES2-Zellen durchgeführt und erfolgte bezüglich der Kultivierung analog zu den unter V.2.6.3 beschriebenen zytosolischen Ca²⁺-Messungen. Die Zellen wurden mit Fluo-5N AM beladen und in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert. 1 min nach Start der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μ M Ophiobolin A oder 10 μ M Trifluoperazin (TFP) hinzugegeben und nach weiteren 3 min 1 μ M Thapsigargin (TG) appliziert. 5 min danach erfolgte die Zugabe von 5 μ M Ionomycin. Die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzabnahme (inklusive Standardfehler) wurden gegen die Messpunkte in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und sind in Abbildung 27, A dargestellt. Die Vorinkubation mit beiden CaM-Antagonisten für 3 min bewirkte eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der relativen Fluoreszenz ($\hat{=}$ Ca²⁺-Konzentration des ER) bis zur TG-Applikation. Der durch TG demaskierte passive Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER hingegen wurde sowohl durch Ophiobolin A als auch TFP deutlich stimuliert, was anhand einer schnelleren Fluoreszenzabnahme sowie der fehlenden Mobilisierbarkeit von Ca²⁺ durch Ionomycin infolge der 5-minütigen TG-Wirkung im Vergleich zur Pufferkontrolle zu beobachten war. Wurde dabei der Mittelwert der Zeitpunkte nach TG-Zugabe bis zum Ende der Messung ermittelt, bei dem 50 % der relativen Fluoreszenzintensität reduziert waren

(bezeichnet als $\tau_{1/2}$), lag dieser Wert für die Pufferkontrolle bei ca. 175 s und unterschied sich signifikant von den wesentlich niedrigeren Zeitpunkten im Fall von Ophiobolin A (ca. 90 s) und TFP (ca. 75 s) (Abbildung 27, B).

VI.1.2.2. CaM-Inhibition aktiviert den „store-operated Ca^{2+} entry“

Da die CaM-Inhibition eine Steigerung des Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER bewirkte (VI.1.2.1), stellte sich die Frage nach einer direkten Ca^{2+} -Freisetzung durch die Antagonisten, da auch bereits bei 3-minütiger Behandlung mit Ophiobolin A und TFP eine leichte Reduktion des ER-luminalen Ca^{2+} (Abbildung 27) zu beobachten war. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass der initiale Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der 10-minütigen Präinkubation im Fall der Fura-2-Messungen zumindest teilweise auf eine Freisetzung von Ca^{2+} ER-luminalen Ursprungs zurückzuführen ist (Abbildung 26, A). Da infolge einer Ca^{2+} -Depletion des ER-Speichers spezifische, in der Plasmamembran gelegene SOC-Kanäle (= „store-operated“ Ca^{2+} -Kanäle) öffnen, um einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} ins Zytosol zu erlauben (Hogan *et al.*, 2010) wurde dieser zelluläre Mechanismus ausgenutzt, um indirekt eine potentielle Erniedrigung von ER-luminalen Ca^{2+} nachzuweisen.

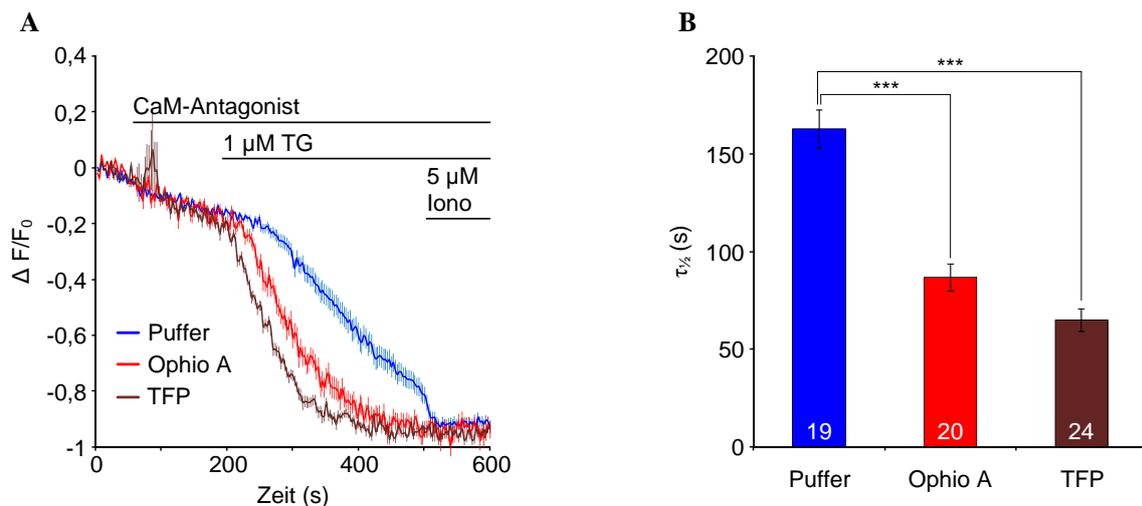


Abbildung 27: Messung von ER-luminalen Ca^{2+} -Änderungen nach Zugabe von CaM-Antagonisten, Thapsigargin (TG) und Ionomycin (Iono) zur direkten Bestimmung des passiven Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER. **A)** HeLa-CES2 Zellen wurden für 96 h auf einem Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckglas (25 mm) kultiviert und für 15 min bei 37 °C (dunkel) mit 4 μM Fluo-5N AM (1 mM Stocklösung in Pluronic F-127) in HBSS beladen und anschließend für weitere 30 min bei RT (dunkel) in HBSS inkubiert. Das Deckglas wurde anschließend in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μM Trifluoperazin (TFP) hinzugegeben. Nach weiteren 3 min wurde 1 μM TG appliziert und weitere 5 min gemessen woraufhin 5 μM Iono verabreicht wurden. Die y-Achse stellt die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzabnahme ($\Delta F/F_0$) inklusive Standardfehler dar, welche gegen die entsprechenden Zeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurden. (F = Fluoreszenzintensität) **B)** Statistische Analyse der Änderung der ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von TG und Iono der in (A) dargestellten Experimente. Zum Vergleich der Datensätze wurde der Wert $\tau_{1/2}$ angegeben (Zeitpunkt nach TG-Zugabe bei 50 % Fluoreszenzabnahme). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte $< 0,001$ wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Das dargestellte Experiment wurde für jede Applikation jeweils einmal durchgeführt Die Anzahl analysierter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI. Ergebnisse

Die Messung wurde wie unter V.2.6.1 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass anstelle von Thapsigargin zur Visualisierung eines möglichen „store-operated calcium entry“ Ca^{2+} -Puffer (V.2.6.1) hinzugegeben und die Messung für weitere 9 min fortgeführt wurde. Während eine Vorinkubation mit 0,1 % DMSO keinen Effekt hatte und nur den erwarteten, basalen Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol (Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration um ca. 70 nM) zur Folge hatte, führte die Applikation von externem Ca^{2+} nach einer Behandlung mit Ophiobolin A zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf etwa 900 nM und im Fall von TFP sogar auf weit über 1 mM, was somit in beiden Fällen einem SOCE und damit einer Reduktion von ER-luminalem Ca^{2+} entspricht (Abbildung 28).

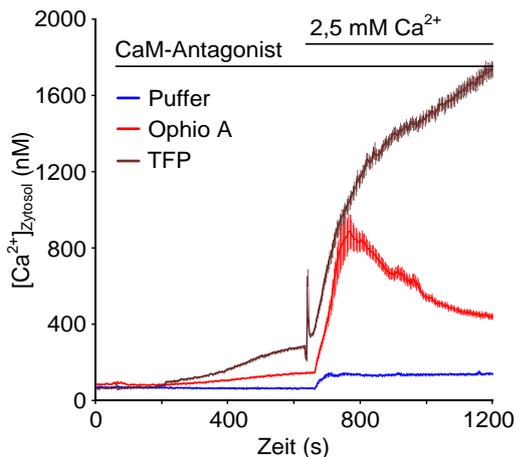


Abbildung 28: Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Änderung nach Behandlung mit CaM-Antagonisten und Ca^{2+} -Puffer zur Untersuchung des SOCE („store-operated Ca^{2+} entry“). HeLa-Zellen wurden für 96 h auf einem Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckglas (25 mm) kultiviert und mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μM Trifluoperazin (TFP) appliziert. Nach weiteren 10 min wurde Ca^{2+} -Puffer hinzugegeben (Theoretische Ca^{2+} -Endkonzentration: 2,5 mM) und weitere 9 min gemessen. Die y-Achse zeigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zytosol}}$, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-80 einzelne Zellen analysiert ($n_{\text{Puffer}} = 3$; $n_{\text{Ophio}} = 3$; $n_{\text{TFP}} = 3$; Gesamtzahl ausgewerteter Einzelzellen: Puffer = 219 ; Ophio A = 168; TFP = 201).

VI.1.2.3. Zellen mit CaM-GFP zeigen einen reduzierten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER

Zur Überprüfung der Spezifität der CaM-Inhibition sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit eine Erhöhung der zytosolischen CaM-Konzentration einen konträren Effekt zur CaM-Inhibition hat und darüber hinaus eine Suppression der Stimulation des passiven Ca^{2+} -Effluxes aus dem ER bewirkt. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen auf einem Poly-L-Lysin-vorbehandelten Deckglas kultiviert und entsprechend der unter V.2.4.6.2 beschriebenen Prozedur für 48 h mit dem Plasmid pEGFP-C3-CaM transfiziert, um die kodierte cDNA des CaM-GFP-Fusionskonstruktes zu exprimieren, welches als voll funktional beschrieben wird (Scheschonka *et al.*, 2008). Als Kontrolle wurde eine Mock-Transfektion durchgeführt ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ statt Plasmid). Die Zellen wurden wie unter VI.1.2.1 mit Fura-2 AM beladen, in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und die Messung gestartet. Nach 1 min wurden entweder Puffer

(0,1 % DMSO) oder 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) hinzugegeben und weitere 10 min gemessen. Schließlich wurde 1 μM TG appliziert und die Messung für 9 min fortgesetzt. Die übrigen Zellen in der Kulturschale wurden mittels Western-Blot (V.2.1.4) und immunologischer Detektion (V.2.1.5) auf das Vorhandensein von CaM-GFP analysiert (Abbildung 29, C, oben links).

In Abbildung 29, A, B sind die Mittelwerte der Ca^{2+} -Konzentrationen (mit Standardfehler) der jeweiligen Messungen nach Vorinkubation mit Puffer (0,1 % DMSO) gegen die Zeit aufgetragen. Wie im Fall von unbehandelten Zellen (VI.1.2.1) zeigten die Kontrollzellen (Mock-Transfektion) nach Zugabe von TG eine Ca^{2+} -Änderung von etwa 400 nM. Zellen, die CaM-GFP synthetisierten (Abbildung 29, B, oben links), zeigten unter gleichen Bedingungen hingegen eine signifikant verringerte Antwort auf die TG-Applikation (ca. 220 nM). Wurde anstelle von Puffer eine 10-minütige Vorbehandlung mit Ophiobolin A durchgeführt wiesen die Mock-transfizierten Zellen den erwarteten, gesteigerten Effekt auf die TG-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (600 nM) auf. Der Ca^{2+} -Efflux war jedoch in Zellen, die das CaM-GFP-Fusionskonstrukt synthetisierten, signifikant reduziert und lag mit ca. 250 nM sogar im Bereich der mit Puffer vorbehandelten CaM-GFP-Zellen. Ein Überschuss an CaM reduziert somit den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER und antagonisiert zudem den CaM-hemmenden Effekt von Ophiobolin A (Abbildung 29, B, C).

VI.1.2.4. CaM-Inhibition reduziert die Konzentration an freiem zellulärem Ca^{2+}

Wie zuvor gezeigt bewirkt eine Präinkubation von HeLa-Zellen mit CaM-Antagonisten eine Steigerung des Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER (VI.1.2.1) sowie eine Speicherentleerung (VI.1.2.2). Daher sollte zur weiteren Verifizierung mit Hilfe des Ca^{2+} -Ionophores Ionomycin die Auswirkung von Ophiobolin A und TFP auf den zellulären Gesamtgehalt an freiem Ca^{2+} ermittelt werden (V.2.6.1), da ein Großteil dieses Ca^{2+} im ER gespeichert ist. Hierzu wurden HeLa-Zellen wie unter Punkt VI.1.2.1 96 h kultiviert, mit Fura-2 AM beladen und in der Messkammer in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. 1 min nach Start der Ca^{2+} -Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 1 μM Trifluoperazin (TFP) appliziert und für 10 min inkubiert. Anstelle von Thapsigargin wurden in diesem Fall 5 μM Ionomycin (Iono) appliziert und weitere 9 min gemessen. Die Mittelwerte der Ratio der einzelnen Messungen inklusive Standardfehler wurden in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 30, A). Beide CaM-Antagonisten bewirken durch eine 10-minütige Vorbehandlung einen Verlust des Gesamtgehaltes von freiem, zellulärem Ca^{2+} , zu sehen an einer signifikanten Erniedrigung der Ratio-Änderung nach Ionomycin-Zugabe (Ophiobolin A \approx 500, TFP \approx 450) gegenüber der Pufferkontrolle (\approx 750; Abbildung 30, B).

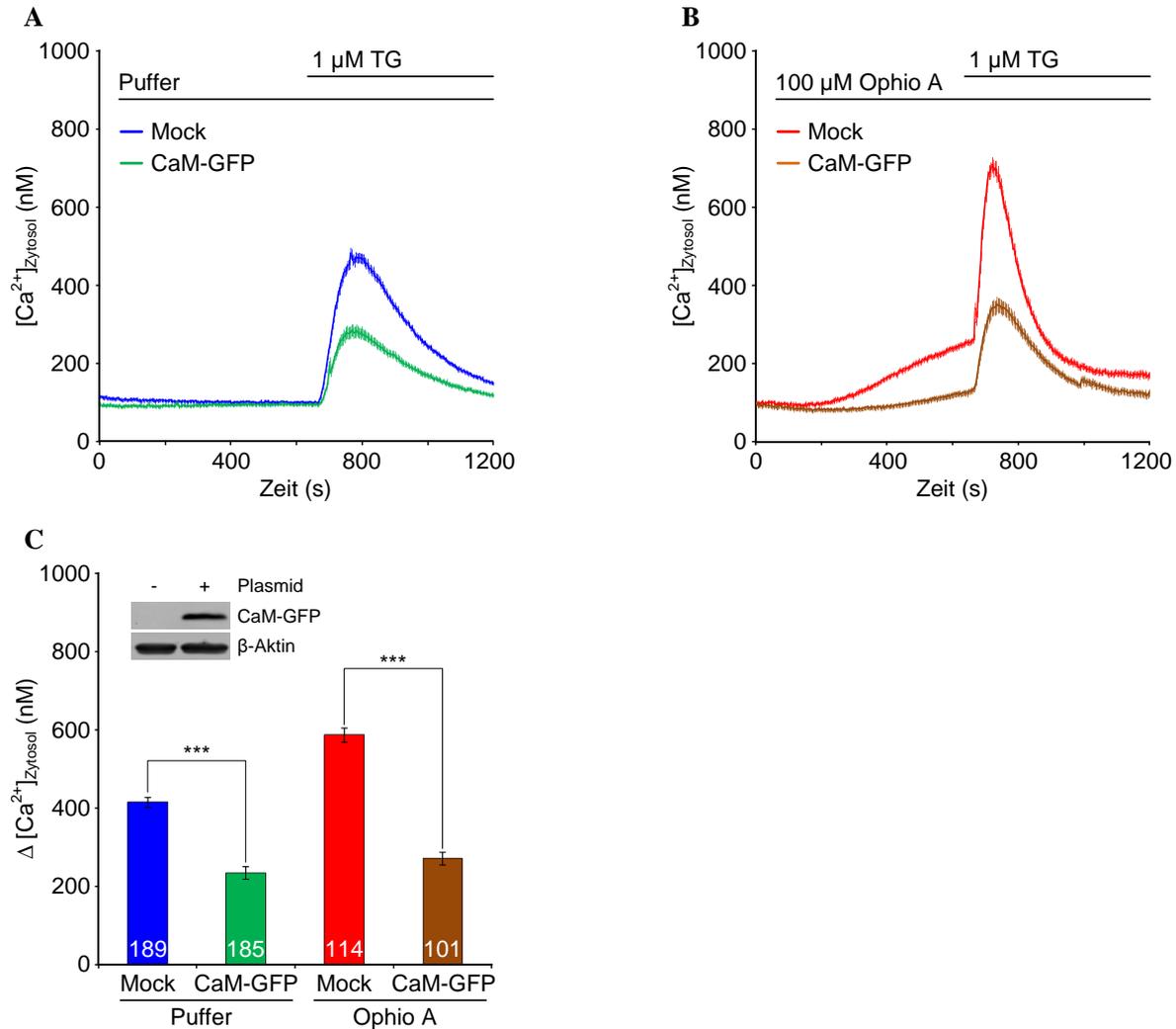


Abbildung 29: Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung nach Behandlung mit CaM-Antagonisten und Thapsigargin zur Untersuchung des Einflusses der CAM-GFP-Überexpression auf den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER. HeLa-Zellen wurden auf einem Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckgläschen (25 mm) ausgesät und nach 24 h mit dem Plasmid pEGFP-C3-CaM transfiziert. Nach 48 h Kultivierung wurden die Zellen mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder **A**) Puffer (0,1 % DMSO) oder **B**) 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) appliziert. Nach weiteren 10 min wurde 1 μM Thapsigargin (TG) hinzugegeben und die Messung für 9 min fortgesetzt. Die y-Achse zeigt die gemessene zytosolische Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_{Zytosol}, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. **C**) Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG der in (A) und (B) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 40-80 einzelne Zellen analysiert (n_{Mock + Puffer} = 3; n_{CaM-GFP + Puffer} = 3; n_{CaM-GFP + Ophio A} = 2; n_{CaM-GFP + Ophio A} = 2). Die Anzahl analysierter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben. Oben links ist der Western-Blot Mock (links)- und CAM-GFP-transfizierter HeLa-Zellen (rechts) dargestellt. Als primärer Antikörper wurde ein Kaninchen-anti-GFP-Antikörper (1:1.000) verwendet, als sekundärer Antikörper ein Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000). Als Ladekontrolle diente das Zytoskelettprotein β-Aktin. Hierfür wurde primär ein monoklonaler Maus-anti-β-Aktin-Antikörper (1:5.000) und sekundär ein Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000) eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte jeweils mittels Typhoon Trio™ Scanner (Mock = Transfektion mit H₂O_{bidest} anstelle von Plasmid).

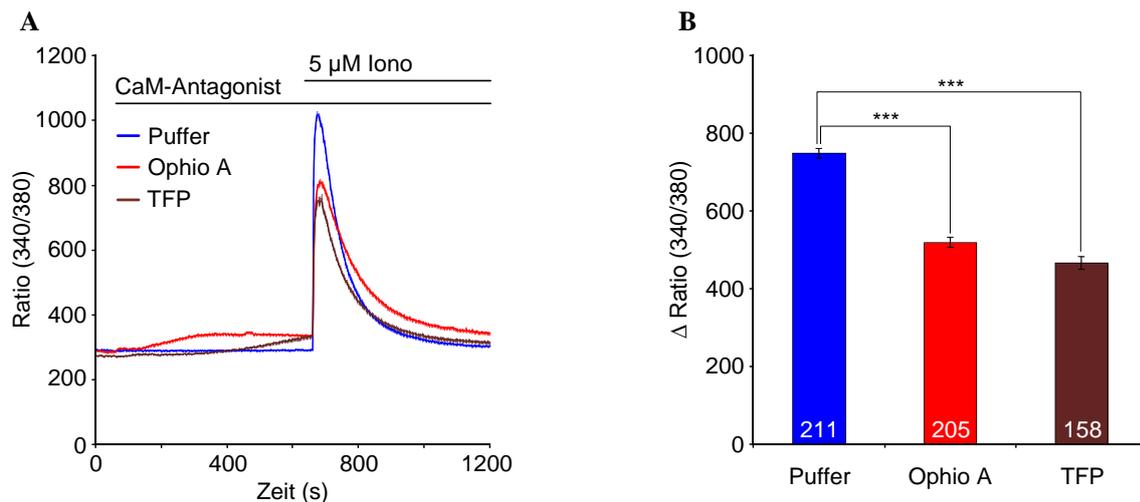


Abbildung 30: Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Änderungen nach Zugabe von CaM-Antagonisten und Ionomycin zur Untersuchung des zellulären Gesamt- Ca^{2+} -Gehaltes. **A)** HeLa-Zellen wurden für 96 h auf einem Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckglas (25 mm) kultiviert und mit 3,5 μ M Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde anschließend in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μ M Ophiobolin A (Ophio A) oder 1 μ M Trifluoperazin (TFP) hinzugegeben. Nach 10 min wurde 5 μ M Ionomycin (Iono) appliziert und weitere 9 min gemessen. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. **B)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Ionomycin der in (A) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte $< 0,001$ wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert ($n_{\text{Puffer}} = 4$; $n_{\text{Ophio A}} = 4$; $n_{\text{TFP}} = 3$). Die Anzahl analysierter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.2. Einfluss der Sec61 α -Manipulation auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase und den Proteintransport ins ER

Den vorangegangenen Ergebnissen zufolge ist CaM sowohl in der Lage Ca^{2+} -abhängig mit dem Transport von „tail-anchor“ Membranproteinen zu interferieren, den posttranslationalen Proteintransport ins ER zu modulieren (VI.1.1.3, VI.1.1.2) als auch eine inhibierende Wirkung auf den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER auszuüben (VI.1.2). Die zugrundeliegenden elektrophysiologischen Daten und *in vitro* Interaktionsnachweise lassen zwar auf eine Modulation des Sec61-Komplexes durch CaM schließen und bestärken die obigen Resultate, jedoch ist CaM ein ubiquitäres, regulatorisches Protein, das die Funktion hunderter Zielproteine zu steuern vermag (Ishida und Vogel, 2006). Die durch Antagonismus oder Überexpression von CaM hervorgerufenen Effekte könnten somit sekundärer Natur sein. Ein entscheidender Aspekt dieser Arbeit lag also darin, einen potentiellen Zusammenhang zwischen Sec61 und CaM auf zellulärer Ebene herzustellen. Mit Hilfe einer etablierten Sec61 α -Manipulationsstrategie sollte auf Grundlage von siRNA- und Plasmid-Transfektionen (V.2.4.6) der Proteinlevel sowie die Funktion (durch gezieltes Einführen von Punktmutationen) der porenbildenden α -Untereinheit der Sec61-Translokase verändert werden. Wie

bereits zuvor von der Arbeitsgruppe Zimmermann gezeigt werden konnte, bewirkt die siRNA-vermittelte Sec61 α -Depletion eine Inhibition des Signalpeptid-abhängigen *in vitro* Transportes ins ER semi-permeabilisierter Zellen (SPZ) und reduziert außerdem den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER wie auch dessen Modulierbarkeit durch Proteinsyntheseinhibitoren. Beide Phänotypen konnten darüber hinaus mittels Plasmid-kodierter *SEC61A1*-cDNA-Expression wieder partiell gerettet werden (Lang *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2011). Demnach sollte gezielt der Einfluss von CaM auf die zentrale Untereinheit der Proteintranslokase untersucht werden, indem nach Depletion des zellulären Sec61 α -Gehaltes sowie der Rettung über extragenomische DNA die Auswirkung einer CaM-Inhibition oder einer beeinträchtigten Sec61 α -CaM-Interaktion die Ca²⁺-Homöostase und der Proteintransport analysiert wurden. Als Grundlage für die folgenden Experimente wurde zunächst die *SEC61A1*-Expressionsmodulation reproduziert, eine *SEC61A1*-Mutatante getestet und die Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität und ER-Morphologie überprüft.

VI.2.1. Überprüfung des Sec61 α -Proteingehaltes mittels Western-Blot

Zur Kontrolle einer adäquaten Manipulation der *SEC61A1*-Genexpression wurden siRNA- oder zusätzlich Plasmid-transfizierte Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und mittels Western-Blot (V.2.1.4) und Immundetektion (V.2.1.5) hinsichtlich einer Reduktion oder eines Anstieges des Sec61 α -Gehaltes densitometrisch (V.2.1.7) quantifiziert.

VI.2.1.1. Der Sec61 α -Proteingehalt kann mittels siRNA effizient reduziert werden

Die effiziente und reproduzierbare Reduktion des Sec61 α -Levels in HeLa-Zellen erfolgte basierend auf der etablierten, unter V.2.4.6.1 erläuterten Transfektionsprozedur und wurde in Anlehnung an die Konvention des „horizon meetings“ (2003) zur Verifizierung der RNAi-Spezifität mit zwei verschiedenen siRNAs gegen die mRNA von *SEC61A1* durchführt (Editorial, 2003). Nach dem in der Arbeitsgruppe Zimmermann etablierten siRNA-Transfektionsprotokoll ist der Sec61 α -Proteingehalt nach 96 h auf ca. 10 % erniedrigt. Da durch die relativ hohe Dauer der Sec61 α -Depletion auch sekundäre Effekte, wie z.B. die indirekte Reduktion von ERj-Proteinen, auftreten (Lang, 2012) wurde als zusätzliche Kontrolle für einen Teil der Experimente eine Transfektionsdauer von lediglich 48 h gewählt. Dadurch wird zwar nur eine verminderte Sec61 α -Reduktionseffizienz erzielt (Lang, 2012), jedoch auch der Grad an potentiellen Nebeneffekten minimiert.

Für alle einbezogenen Experimente wurden jeweils $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen (auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas im Fall von Ca²⁺-„imaging“-Experimenten) entweder mit Kontroll-, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert und für 48 h bzw. 96 h in DMEM kultiviert (V.2.4.6.1). Die Proben wurden anschließend mittels Western-Blot (V.2.1.4) und immunologischer Detektion (V.2.1.5) auf den Sec61 α -Gehalt überprüft. Bereits 48 h nach der siRNA Behandlung ist eine deutliche

Reduktion des Sec61 α -Gehaltes im Fall beider *SEC61A1* siRNAs im Vergleich zur Kontroll siRNA-Transfektion zu erkennen, wie auch die statistische Auswertung aller einbezogenen Quantifizierungen zeigt. Während die *SEC61A1* siRNA eine Erniedrigung von Sec61 α auf ca. 23 % der Kontrolle bewirkt liegt der Restproteingehalt im Fall der *SEC61A1*-UTR siRNA bei 25 %. (Abbildung 31, A, C). Analog hierzu ist in Abbildung 31, B ein Western-Blot nach 96 h Sec61 α -Depletion veranschaulicht. Die durchschnittliche Reduktion des Sec61 α -Levels aller eingegangenen Experimente lag für beide *SEC61A1* siRNAs bei ca. 90 % (Abbildung 31, D).

VI.2.1.2. Die Sec61 α -Depletion kann mittels Plasmid-kodierter cDNA-Expression von *SEC61A1*-Wildtyp und einer *SEC61A1*-IQ-Mutante kompensiert werden

Um potentielle Effekte der Sec61 α -Reduktion zu retten oder Sec61 α -Mutanten zu untersuchen wurden HeLa-Zellen wie unter V.2.4.6.1 beschrieben mit *SEC61A1*-UTR siRNA (bzw. Kontroll siRNA) behandelt sowie zusätzlich entweder mit einem *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid (bzw. Kontroll-Plasmid) transfiziert (Tabelle 4; V.2.4.6.2). Hierbei war von Bedeutung, dass eine siRNA gegen den UTR-Bereich der *SEC61A1*-mRNA verwendet wurde, da die Plasmid-kodierte *SEC61A1*-cDNA keine der endogenen mRNA entsprechenden UTR-Sequenzen enthält und damit nicht als Ziel der *SEC61A1*-UTR siRNA dienen kann. Somit kann diese cDNA im Hintergrund einer siRNA-vermittelten Depletion des endogenen Sec61 α exprimiert werden. Bei der Variante *SEC61A1*-R24A/K29A handelt es sich um die cDNA einer Sec61 α -Mutante, deren IQ-Motiv basierend auf *in vitro* Bindungsstudien (IQ-Peptidspots) an zwei für die Ca²⁺-CaM-Bindung essentiellen, basischen Aminosäureresten Arginin 24 und Lysin 29 jeweils durch eine Substitution mit der hydrophoben Aminosäure Alanin zerstört wurde (Erdmann *et al.*, 2011). Das entsprechende Plasmid pcDNA3-*SEC61A1*-R24A/K29A-IRES-GFP wurde mittels „quick-change“-PCR durch Johanna Dudek und Monika Lerner (Erdmann *et al.*, 2011) generiert (Abbildung 32).

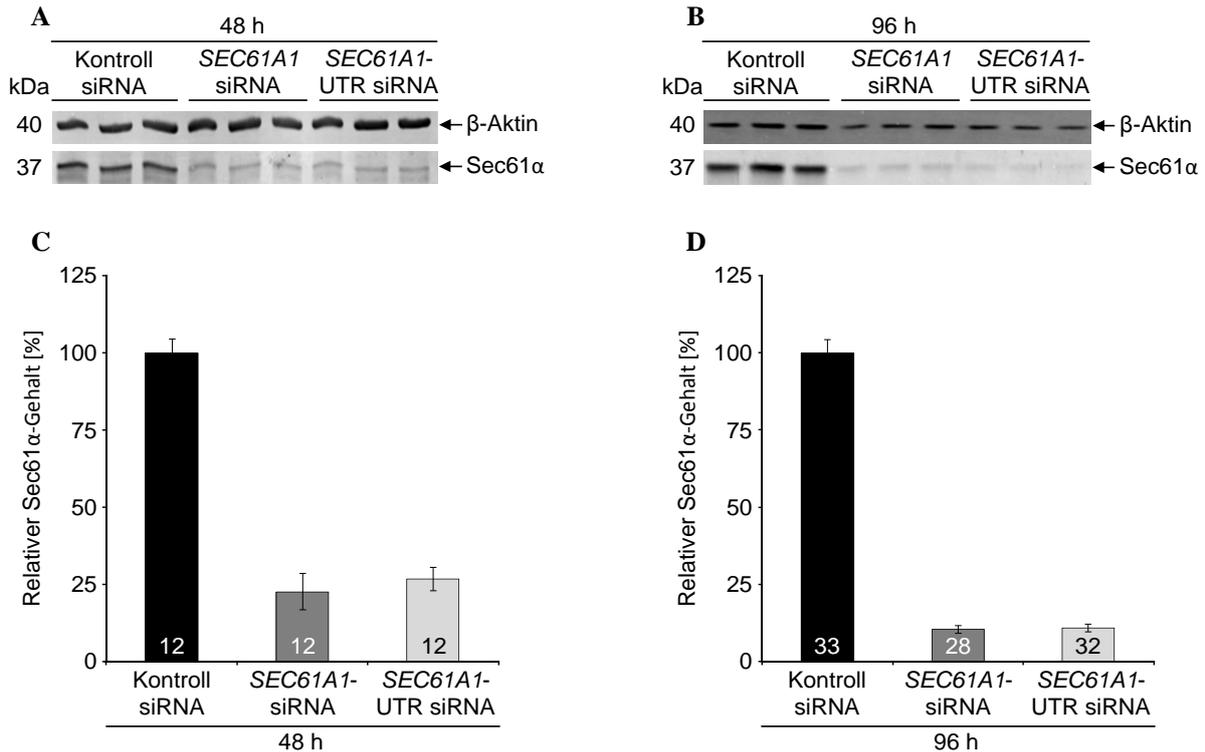


Abbildung 31: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der siRNA-vermittelten Sec61 α -Depletion für 48 und 96 h. Jeweils $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (mit oder ohne 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 20 nM Kontroll, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Die Zellen wurden entweder nach **A**) 48 h oder **B**) 96 h Inkubation geerntet, gezählt (V.2.4.3), lysiert und in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 56 °C erhitzt sowie mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt (15 %iges PA-Gel), auf eine PVDF-Membran transferiert (V.2.1.4) und mit Hilfe einer Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7) analysiert. Zum immunologischen Nachweis wurde ein Kaninchen-anti-Sec61 α -Antikörper (1:200, in 3 % Magermilch) sowie ein Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Als Ladekontrolle diente das Zytoskelettprotein β -Aktin, für dessen Detektion ein monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und ein sekundärer Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) eingesetzt wurde. Die Visualisierung erfolgte jeweils mittels Typhoon TrioTM Scanner. Die entsprechenden Proben der aufgeführten siRNA-Transfektionsansätze wurden jeweils als 3-fach-Bestimmung auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 2×10^5 . **C**) Statistische Auswertung der in (A) dargestellten Sec61 α -Depletion für 48 h. Es wurden die Quantifizierungen der Western-Blot-Spuren aller für diese Arbeit relevanten Experimente einbezogen. Die Sec61 α -Signale wurden jeweils durch das in der gleichen Spur bestimmte β -Aktin-Signal zur Normierung dividiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich immer auf den Mittelwert der Kontroll siRNA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht aufgrund der Mehrfachbestimmung einzelner Western-Blot-Proben der Anzahl technischer Replikate. Die Zellen der Transfektionsansätze jeweiliger Versuchstage wurden stets vereint und entsprachen je 2-4 biologischen Replikaten. Daher ergibt sich folgende Gesamtzahl biologischer Replikate: Kontroll siRNA = 15; *SEC61A1* siRNA = 12; *SEC61A1*-UTR siRNA = 11 **D**) Analoge statistische Auswertung wie in (C) zur Quantifizierung aller relevanten Werte nach 96 h siRNA-Transfektion unter (B). Anzahl biologischer Replikate: Kontroll siRNA = 28; *SEC61A1* siRNA = 25; *SEC61A1*-UTR siRNA = 29.

Zur Überprüfung der *SEC61A1*- bzw. *SEC61A1*-R24A/K29A-Expression nach Depletion des endogenen Sec61 α -Proteins, wurden HeLa-Zellen analog zu Punkt VI.2.1.1 ausgesät und entweder mit Kontroll oder *SEC61A1*-UTR siRNA behandelt sowie kultiviert. Nach 64 h wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen zusätzlich mit Kontroll-, *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid transfiziert. Nach insgesamt 96 h wurde ein Teil der Zellen geerntet, wobei die Ansätze im Fall eines

VI. Ergebnisse

in vitro Translokationsexperimentes zuvor einer Semi-Permeabilisierung unterzogen wurden (V.2.4.5). Die Proben wurden anschließend mittels Western-Blot-Analyse (V.2.1.4) auf den Sec61 α -Gehalt überprüft.

Sec61 α ₁ IQ-Motiv:



Abbildung 32: IQ-Motiv im zytosolischen N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit von *Homo sapiens*. Die basischen Aminosäurereste Arginin 24 und Lysin 29 wurden basierend auf einer IQ-Peptid-Bindungsanalyse als relevante Aminosäuren für die Interaktion mit Ca²⁺-CaM identifiziert und jeweils im Plasmid pcDNA3-SEC61A1-IRES-GFP (Tabelle 4) mittels „quick change“-PCR durch die hydrophobe Aminosäure Alanin substituiert. Das resultierende Plasmid wurde pcDNA3-SEC61A1-R24A/K29A-IRES-GFP bezeichnet (Erdmann *et al.*, 2011).

In Abbildung 33, A ist ein repräsentativer Western-Blot nach Behandlung von HeLa-Zellen mit Kontroll oder SEC61A1-UTR siRNA sowie einer Transfektion mit Kontroll-, SEC61A1- oder SEC61A1-R24A/K29A-Plasmid dargestellt. Wie die statistische Auswertung zeigt, wurde in Gegenwart von Kontroll siRNA ein Anstieg des Sec61 α -Proteingehaltes sowohl nach Expression der wildtypischen SEC61A1-Variante als auch der IQ-Mutante (SEC61A1-R24A/K29A) von SEC61A1 auf ca. 180-200 % beobachtet. Wurden die Zellen für 96 h mit SEC61A1-UTR siRNA und anschließend mit Kontroll-Plasmid transfiziert wurde wie erwartet eine deutliche Depletion des Sec61 α -Proteins beobachtet, die allerdings im Vergleich zur reinen siRNA-Transfektion (Abbildung 31, D) mit ca. 75 % etwas niedriger ausfiel. Wurde anstelle des Kontroll-Plasmids das SEC61A1- oder SEC61A1-R24A/K29A-Plasmid eingebracht, war in beiden Fällen eine partielle Wiederherstellung des ursprünglichen Sec61 α -Gehaltes (d.h. im Vergleich zum Ansatz Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) auf 90 % (SEC61A1) bzw. 70 % (SEC61A1-R24A/K29A) zu sehen (Abbildung 33, B). Neben der Transfektion für 96 h wurden auch vergleichbare Ansätze mit Gesamtinkubationszeiten von 120 h und 144 h bezüglich ihrer SEC61A1-Expression analysiert (Abbildung 33, C). In diesem Fall sind jedoch nur 3-4 Western-Blot-Signale (aus einem Experiment mit je drei biologischen Replikaten) in die Quantifizierung mit eingegangen, weswegen keine Standardfehler der Mittelwerte angegeben wurden. Wie der Auswertung zu entnehmen ist, kann auch noch längere Zeit nach der transienten Plasmidtransfektion (nach 88 bzw. 112 h), ein erhöhter Sec61 α -Level von ca. 150 % zu beiden Zeitpunkten festgestellt werden, welcher jedoch leicht unterhalb der Expression nach 96 h liegt (Abbildung 31, D). Diese Abnahme kann auch bei der Expression beider SEC61A1-Varianten in Gegenwart der SEC61-UTR siRNA beobachtet werden (ca. 50-70 %). Parallel hierzu verliert auch die siRNA-vermittelte Sec61 α -Depletion (SEC61-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid) nach 144 h an Effizienz (ca. 40 % Restproteingehalt). In beiden Fällen kann der Rückgang der Effizienz durch die ledigliche Transienz der Transfektion erklärt werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die Expression der SEC61A1-R24A/K29A-Mutante stets im vergleichbaren Rahmen wie die der

wildtypischen *SEC61A1*-Variante befand und dieses Protein keine Degradationsprodukte aufwies (in Form niedrigmolekularer Banden im Western-Blot). Zudem war das Sec61 α -R24A/K29A-Protein nach einer semi-Permeabilisierung der Zellen (welche zytosolisch lokalisierte Bestandteile und damit fehlerhaft zum ER dirigierte Proteine entfernt) gegenüber kompletten Zellen nicht reduziert (nicht gezeigt). Letztere beiden Punkte sprechen dabei für eine native Membraninsertion der Sec61 α -IQ-Mutante und bildet damit eine Grundvoraussetzung für die funktionale Analyse dieser Variante in einem Testsystem (*in vitro* Transport oder Ca²⁺-„imaging“).

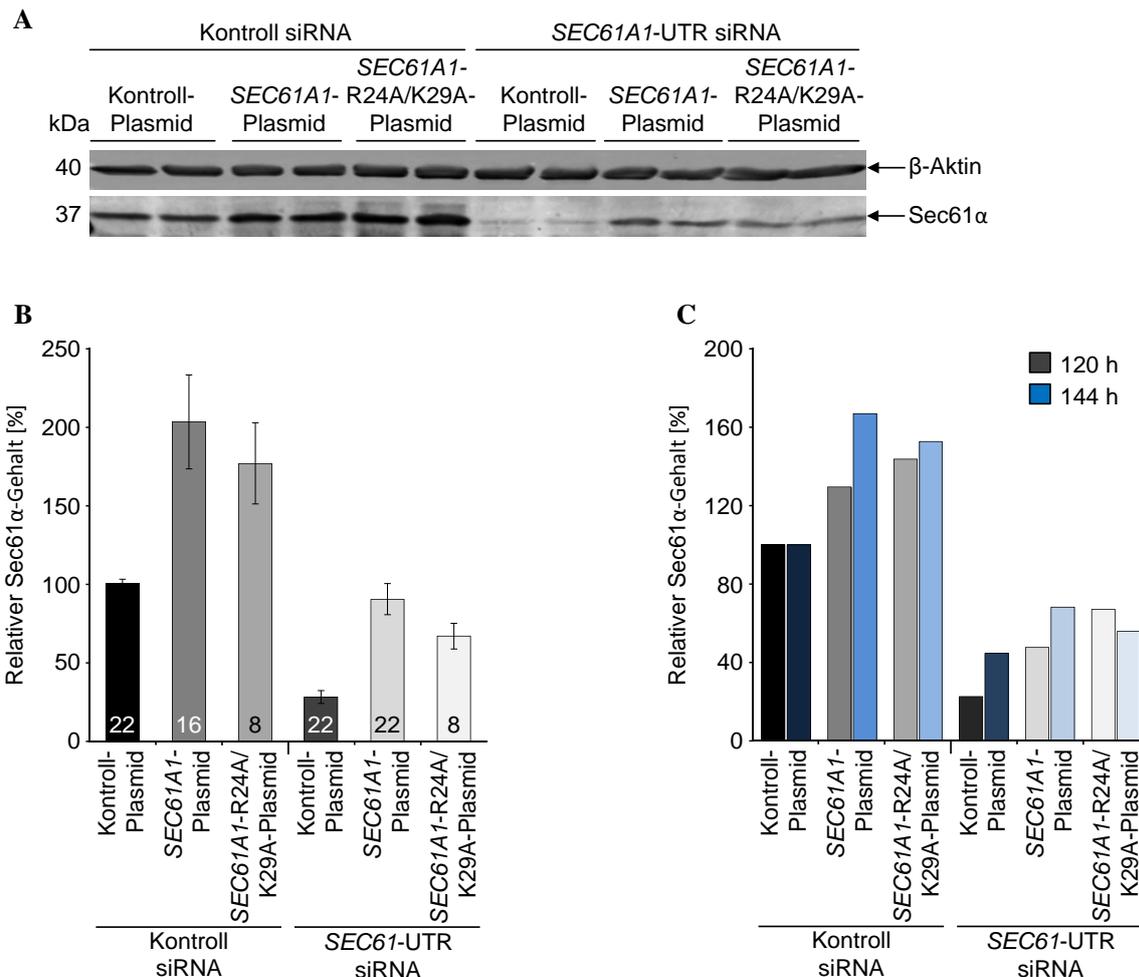


Abbildung 33: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der siRNA-vermittelten Sec61 α -Depletion und *SEC61A1*-Überexpression (Rettungsexperiment). **A**) Je $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (mit oder ohne 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 20 nM Kontroll-, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen jeweils nachtransfiziert und nach weiteren 8 h mit Kontroll-, *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid (IQ-Mutante) transfiziert (V.2.4.6.2) Die Zellen wurden nach insgesamt 96 h Inkubation geerntet, gezählt (V.2.4.3), lysiert und in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 56 °C erhitzt sowie mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt (15 %iges Polyacrylamidgel), auf eine PVDF-Membran transferiert (V.2.1.4) und mittels Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7) analysiert. Zum immunologischen Nachweis wurde ein Kaninchen-anti-Sec61 α -Antikörper (1:200, in 3 % Magermilch) sowie ein Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, für dessen Detektion ein monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und ein sekundärer Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) eingesetzt wurde. Die Visualisierung erfolgte mittels Typhoon TrioTM Scanner. Die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 2×10^5 . **B**) Statistische Auswertung der in (A) dargestellten Sec61 α -Rettung. Für die Quantifizierung der Western-Blot-Spuren wurden alle für diese Arbeit relevanten Experimente mit einbezogen. Die Sec61 α -Signale wurden jeweils durch das in der gleichen Spur bestimmte β -Aktin-Signal zur Normierung dividiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich immer auf den Mittelwert der Kontroll siRNA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht aufgrund der Mehrfachbestimmung einzelner Western-Blot-Proben der Anzahl technischer Replikate. Die Zellen der Transfektionsansätze jeweiliger Versuchstage wurden stets vereint und entsprachen je 2-4 biologischen Replikaten. Daher ergibt sich folgende Gesamtzahl biologischer Replikate: Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid = 20; Kontroll siRNA + *SEC61A1*-Plasmid = 21; Kontroll siRNA + *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid = 15; *SEC61A1*-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid = 21; *SEC61A1*-UTR siRNA + *SEC61A1*-Plasmid = 23; *SEC61A1*-UTR siRNA + *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid = 19. Die Gesamtzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben. **C**) Auswertung der Quantifizierung von Sec61 α -Rettungsexperimenten mit einer Gesamtkultivierungsdauer von 120 bzw. 144 h analog zu (B). Die Balken stellen Mittelwerte aus 3-4 normierten Sec61 α -Signalen dar (aus je 3 biologischen Replikaten).

VI.2.2. Einfluss der Sec61 α -Modulation auf Viabilität und ER-Morphologie

Als Basis für die folgenden Experimente und zum Zweck einer verbesserten Interpretierbarkeit potentieller Phänotypen wurden die Zellen, die den prolongierten Depletionszeiten von 96 h-144 h unterzogen wurden, zunächst auf Zellproliferation bzw. -viabilität und ihre ER-Morphologie untersucht, da Sec61 α ein essentielles Protein darstellt (Cao und Saier Jr, 2003; Lang *et al.*, 2012; Park und Rapoport, 2012) und darüber hinaus eine strukturelle Bedeutung für die Architektur des ER besitzt (Puhka *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2010).

VI.2.2.1. Sec61 α -Depletion für 96 h reduziert die Zellproliferation und -viabilität

Um die Proliferation sowie die Viabilität der *SEC61A1* siRNA behandelten HeLa-Zellen zu untersuchen wurden die Zellen nach der unter VI.2.1.1 dargestellten Prozedur mit Kontroll siRNA oder zwei verschiedenen siRNAs gegen *SEC61A1* (*SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR) transfiziert und 96 h kultiviert. Als weitere Referenz wurde ein Ansatz mit unbehandelten Zellen unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Zur Überprüfung der Zellviabilität wurden die vorbehandelten Zellen mittels „Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability reagent“ gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (V.2.5.2.1). Hierfür wurden pro Ansatz jeweils vier Aufnahmen von repräsentativen Bereichen des zellbewachsenen Deckglases im DAPI- sowie im FITC-Kanal des Nikon Eclipse TE 2000-S-Mikroskops (20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv) gemacht. Die blau fluoreszierenden ($\hat{=}$ alle Zellen) sowie die grün fluoreszierenden Zellkerne ($\hat{=}$ Zellen mit defekter Plasmamembran; tote Zellen) des jeweils gleichen Aufnahmebereichs wurden anschließend ausgezählt und der Anteil lebender Zellen ermittelt, indem die Anzahl toter Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt und der resultierende Wert von 1 (bzw. 100 %) subtrahiert wurde. Demnach ergab sich für unbehandelte HeLa-Zellen nach 96 h Kultivierung eine Viabilität von 97 %. Kontroll siRNA transfizierte Zellen hingegen zeigten im Vergleich eine niedrigere Viabilität von nur 88 %, was vermutlich auf die Transfektionsprozedur mit dem Lipofektionsreagenz zurückzuführen ist. Wurde anstelle der Kontroll siRNA eine der beiden *SEC61A1* siRNAs verwendet wurde eine zusätzliche Reduktion der Lebensfähigkeit (*SEC61A1* siRNA: 82 %; *SEC61A1*-UTR siRNA: 81 %) beobachtet (Abbildung 34, A). Als weitere Methode zur Untersuchung der Viabilität der manipulierten HeLa-Zellen wurde die Proliferation Kontroll siRNA transfizierter Zellen im Vergleich zu *SEC61A1*(-UTR) siRNA behandelten Zellen analysiert. Hierfür wurden die 96 h transfizierten Zellen mittels „Countess® Automated Cell Counter“ (V.2.4.3.2) gezählt. In Abbildung 34, B sind die Mittelwerte von 32-34 Zellzählungen entsprechender Experimente als relative Werte mit Standardfehler im Vergleich zur Kontroll siRNA dargestellt. Die Ansätze mit *SEC61A1* wie auch *SEC61A1*-UTR siRNA zeigten hierbei eine reduzierte Proliferation von ca. 70-76 % im Vergleich zu den Kontroll siRNA behandelten Zellen, was sich auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Viabilitätsanalyse mittels Nuclear-

VI. Ergebnisse

IDTM-Reagenz befindet. Somit zeigen HeLa-Zellen bei maximal reduziertem Sec61 α -Gehalt bereits eine leicht verminderte, jedoch noch akzeptable Zellproliferation und -viabilität.

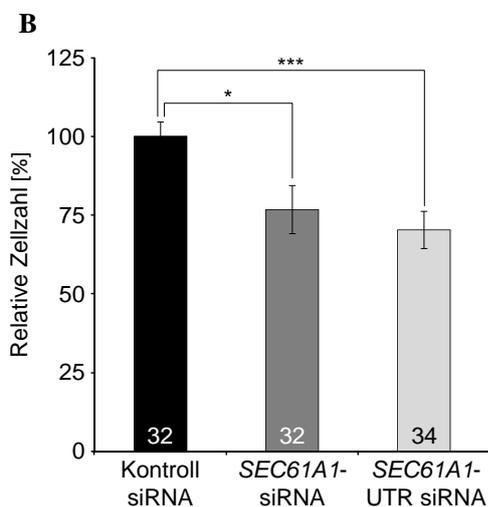
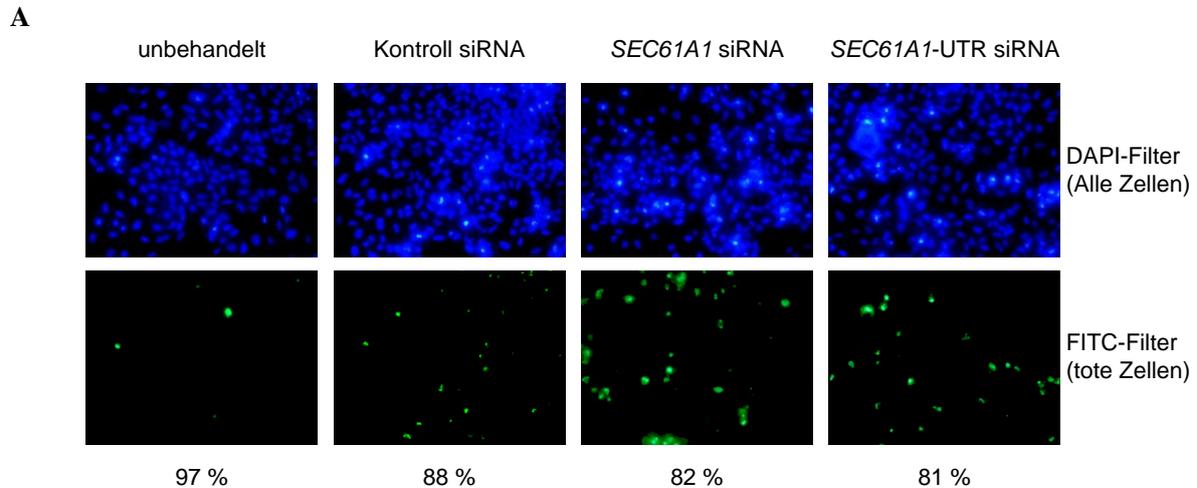


Abbildung 34: Einfluss der Sec61 α -Depletion (96) auf die Zellviabilität und -proliferation. **A**) Jeweils $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale auf einem Poly-L-Lysin vorbehandeltem (0,1 mg/ml) 25 mm Deckglas entweder ohne weitere Behandlung ausgesät oder zusätzlich entweder mit 20 nM Kontroll, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen mit der entsprechenden siRNA nachtransfiziert und alle Ansätze insgesamt 96 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit 1 μ M „Nuclear-IDTM Blue/Green cell viability reagent“ in PBS (V.2.5.2.1) für 30 min bei 37 °C gefärbt. Es sind jeweils repräsentative mikroskopische Aufnahmen jedes Zelltyps (unbehandelt oder siRNA transfiziert) dargestellt (20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv). Oben (DAPI-Filter) sind die DAPI-gefärbten Zellen zu sehen (und somit alle im Bildausschnitt erfassten Zellen). Unten (FITC-Kanal) ist der jeweils entsprechende Ausschnitt im Grün-Kanal gezeigt. Nur Zellen mit zerstörter Plasmamembran wurden angefärbt (= tote Zellen). Unterhalb der jeweiligen Ansätze ist die Auswertung der Zellviabilität aller Aufnahmen dargestellt (n = 4; je 2 Aufnahmen zweier biologischer Replikate). Die Viabilität ergibt sich aus dem Anteil der nicht grünfluoreszierenden Zellen von der Gesamtzellzahl (DAPI-Kanal) und wurde in % angegeben. **B**) $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale auf einem Poly-L-Lysin vorbehandeltem (0,1 mg/ml) 25 mm Deckglas ausgesät und entweder mit 20 nM Kontroll, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen mit entsprechender siRNA nachtransfiziert und alle Ansätze insgesamt für 96 h inkubiert. Die Zellen wurden nach Entnahme des Deckglases in Medium geerntet und mittels „Countess[®] Automated Cell Counter“ (V.2.4.3.2) ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zellzahlen (%) im Vergleich zum Mittelwert der Zellzahlen der Kontroll siRNA transfizierten HeLa-Zellen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl ausgezählter Zellkulturschalen ist am unteren Ende der Balken angegeben. Um die jeweiligen Zellzahlen untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,05 bzw. < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 1 Stern (*) bzw. 3 Sterne (***) markiert.

VI.2.2.2. Die Reduktion der Zellproliferation und -viabilität durch Sec61 α -Depletion kann durch Expression von *SEC61A1* und *SEC61A1-R24A/K29A* gerettet werden

Analog wurden auch die Rettungsansätze, die unter Punkt VI.2.1.2 mittels Western-Blot analysiert wurden, hinsichtlich Viabilität und Proliferation analysiert. HeLa-Zellen wurden demnach mit Kontroll- oder *SEC61A1*-UTR siRNA und nach 32 h mit Kontroll- oder *SEC61A1*-Plasmid transfiziert und für insgesamt 96 h kultiviert. Die Zellen wurden wie zuvor mit dem Nuclear-ID™-Reagenz gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (V.2.5.2.1). Der Ansatz mit Kontroll siRNA und Kontroll-Plasmid zeigte eine vergleichbare Viabilität (88 %) wie der Ansatz mit alleiniger Kontroll siRNA-Behandlung zuvor. Auch im Fall der *SEC61A1*-UTR siRNA-Transfektion mit zusätzlicher Kontroll-Plasmid-Behandlung wurde wie bei der reinen siRNA-Transfektion eine Reduktion der Viabilität (81 %) beobachtet. Entsprechend der Wiederherstellung des Sec61 α -Levels (*SEC61A1*-UTR siRNA + *SEC61A1*-Plasmid) auf das Niveau der Kontroll-Zellen im Western-Blot, wurde auch eine Viabilität von 89 % rekonstruiert. Die alleinige Überexpression von *SEC61A1* (ca. 200 % Proteingehalt) hatte hingegen weder positive noch negative Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der HeLa-Zellen (Abbildung 35, A). In einer vergleichbaren Untersuchung wurden zusätzlich zu den vier genannten Zellmanipulationen je ein Kontroll sowie ein *SEC61A1*-UTR siRNA-behandelter Ansatz mit *SEC61A1-R24A/K29A*-Plasmid transfiziert (analog zur Western-Blot-Analyse unter Punkt VI.2.1.2) und die Zellen darüber hinaus auch nach weiteren 120 und 144 h Inkubation überprüft. Wie Abbildung 35, B zeigt, besaßen alle manipulierten Zellen, welche eine adäquate *SEC61A1*- bzw. *SEC61A1-R24A/K29A*-Expression aufwiesen (vgl. Abbildung 33, B, C), der „Nuclear-ID™“-Färbung zufolge, auch bis zum Zeitpunkt 144 h eine Viabilität zwischen 85 und 90 %. Lediglich die Zellen mit mangelndem Sec61 α -Gehalt (*SEC61A1*-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid) zeigten einen stetigen Verlust ihrer Viabilität, welche nach 144 h bei nur noch 68 % lag. Hiermit einher ging auch die Stagnation sowie die anschließende Reduktion der Zellzahl eben dieser Zellen, während die Zellen in den restlichen Ansätzen über den Zeitraum der Untersuchung kontinuierlich weiter proliferierten. Von besonderer Bedeutung für die nachfolgenden Experimente ist hierbei die Tatsache, dass einerseits der letale Phänotyp nach Sec61 α -Depletion durch Plasmidexpression der wildtypischen *SEC61A1*-Varinante wieder gerettet werden kann und insbesondere, dass die Sec61 α -IQ-Mutation (*SEC61A1-R24A/K29A*) offenbar trotz der defekten CaM-Bindungsstelle eine grundsätzlich funktionale Sec61 α -Kopie darstellt und keine Beeinträchtigung des Zellwachstums hervorruft.

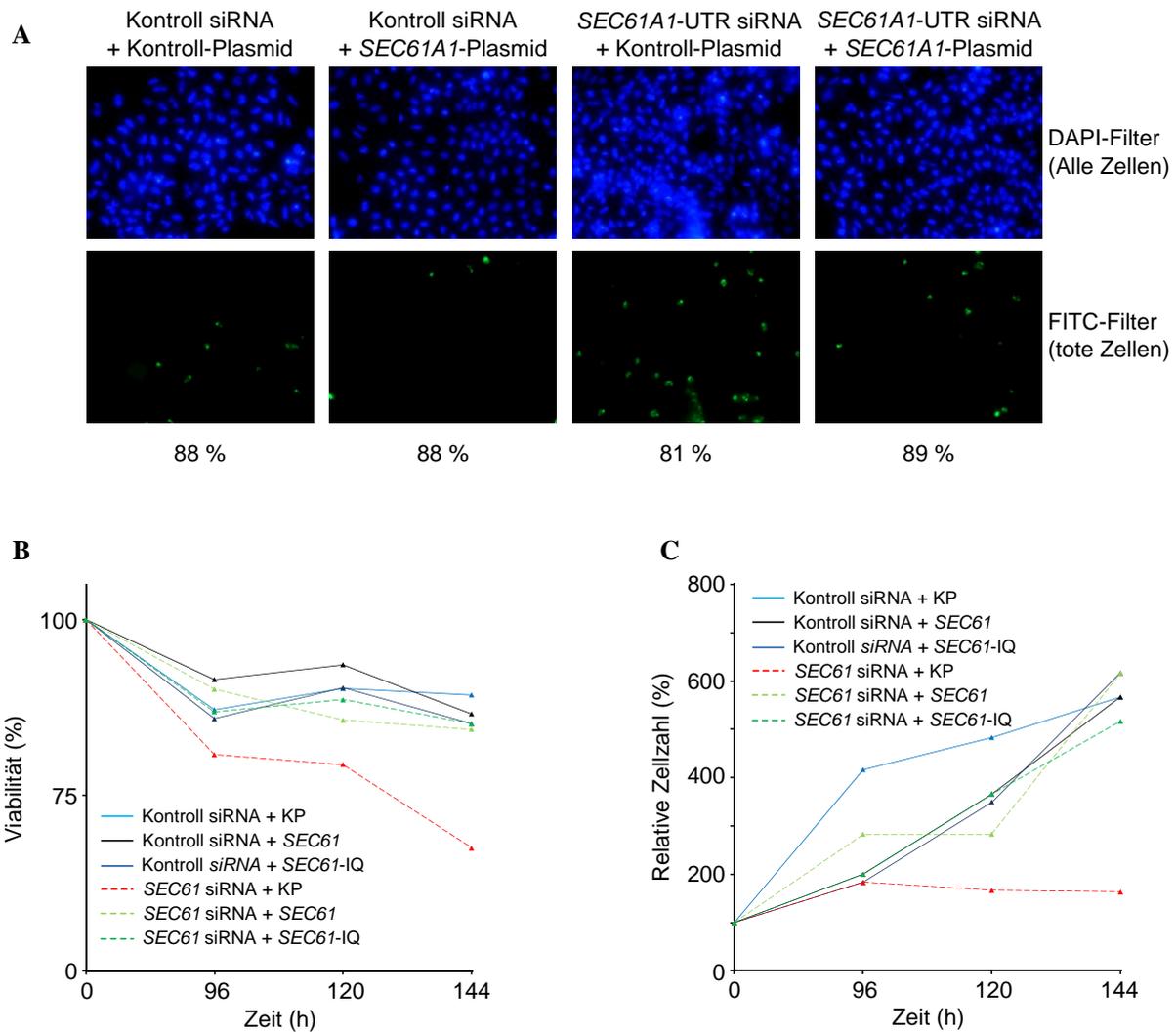


Abbildung 35: Auswirkung der Sec61 α -Manipulation auf die Zellviabilität und -proliferation. **A)** Je $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale auf einem Poly-L-Lysin vorbehandeltem (0,1 mg/ml) 25 mm Deckglas ausgesät und entweder mit Kontroll oder SEC61A1-UTR siRNA (20 nM) transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen mit siRNA nachtransfiziert und nach weiteren 8 h Kultivierung mit Kontroll- oder SEC61A1-Plasmid behandelt. Nach insgesamt 96 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 μ M „Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability reagent“ in PBS (V.2.5.2.1) für 30 min bei 37 °C gefärbt. Repräsentativ sind jeweils mikroskopische Aufnahmen jedes Zelltyps dargestellt (20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv). In der oberen Reihe sind die DAPI-gefärbten Zellen zu sehen (= alle Zellen). Darunter (FITC-Kanal) ist der jeweils entsprechende Ausschnitt im Grün-Kanal gezeigt, in dem nur die Zellen mit zerstörter Plasmamembran angefärbt wurden (= tote Zellen). Unter den jeweiligen Ansätzen ist die Auswertung der Zellviabilität aller Aufnahmen dargestellt (n = 4; je 2 Aufnahmen zweier biologischer Replikate). Die Viabilität berechnet sich aus dem Anteil der nicht grünfluoreszierenden Zellen von der Gesamtzellzahl (DAPI-Kanal) und wurde in % angegeben. **B)** Gleicher Versuchsaufbau wie in (A), jedoch mit zusätzlicher Transfektion des SEC61A1-R24A/K29A-Plasmids (IQ-Mutante). Zudem wurden die Zellen neben den 96 h auch für 120 sowie 144 h kultiviert. Die Auswertung der Zellviabilität ergibt sich jeweils aus dem Mittelwert der Berechnung von zwei Aufnahmen (n = 2; technische Replikate). Die Werte wurden in einem Diagramm über die Zeit aufgetragen. Zum Zeitpunkt t_0 wurde die Viabilität aller Ansätze als theoretisch 100 % angesehen (SEC61 siRNA = SEC61A1-UTR siRNA; KP = Kontroll-Plasmid; SEC61 = SEC61A1-Plasmid; SEC61-IQ = SEC61A1-R24A/K29A-Plasmid). **C)** Die Zellen aus den selben Kulturschalen, die in (B) verwendet wurden und nach Entnahme des Deckglases übrig geblieben sind wurden geerntet und mittels „Countess® Automated Cell Counter“ (V.2.4.3.2) ausgezählt. Angegeben ist die relative Zellzahl (beginnend bei 100 % zum Zeitpunkt t_0).

VI.2.2.3. Die Sec61 α -Depletion hat keine Auswirkung auf die ER-Morphologie

Die vorangegangenen Viabilitäts- und Zellproliferationsuntersuchungen haben gezeigt, dass sich in Folge einer Reduktion des endogenen Sec61 α -Proteins nach 96 h eine zunehmende Beeinträchtigung des Zellwachstums manifestiert. Da Sec61 α als essentielle Untereinheit der ER-Proteintranslokase einen Einfluss auf die Synthese einer Vielzahl ER-residenter Proteine hat, wurde weitergehend untersucht, ob dieser Verlust nach 96 h siRNA-Behandlung eine mögliche Auswirkung auf die ER-Morphologie nach sich zieht. Zu diesem Zweck wurde der unter Punkt V.2.5.1 beschriebene ER-Marker „ER-Tracker™ Blue-White Dapoxyl (DPX)“ verwendet. Dieser zellpermeable Lebendzell-Fluoreszenzfarbstoff weist eine hohe Selektivität für das ER auf und wird im Anschluss an eine Zellkultivierung appliziert. Für eine ER-Färbung wurden lediglich die Ansätze mit Kontroll sowie *SEC61A1* siRNA analysiert, da in der Viabilitätsanalyse nur ein deutlicher Unterschied nach Sec61 α -Reduktion beobachtet wurde. Als weitere Kontrolle für einen generellen Einfluss der Transfektionsprozedur auf die ER-Struktur wurde ein Ansatz mit unbehandelten Zellen mitgeführt. Die HeLa-Zellen wurden nach entsprechender Kultivierung der ER-Färbung unterzogen, mit PBS gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (zwecks einer verbesserten Auflösung mittels Ölimmersionsobjektiv; Plan Fluor 60x oil/1,25). Es wurde jeweils eine Aufnahme im Hellfeld (zur Darstellung der kompletten Zellen) sowie im DAPI-Kanal (Visualisierung des ER) angefertigt. Wie in Abbildung 36 zu sehen ist zeigten alle drei Zelltypen eine ausgeprägte retikuläre ER-Struktur und wiesen keinen Unterschied hinsichtlich des ER-Volumens im Vergleich zur Zellgröße auf. Somit treten infolge einer 90 %-igen Sec61 α -Depletion mittels siRNA für 96 h keine gravierenden Veränderungen struktur-revanter ER-Proteine auf. Den Daten zufolge liegt unter den gewählten Depletions-Bedingungen ein weitgehend intaktes ER vor, welchem lediglich die Kernkomponente der Translokase fehlt.

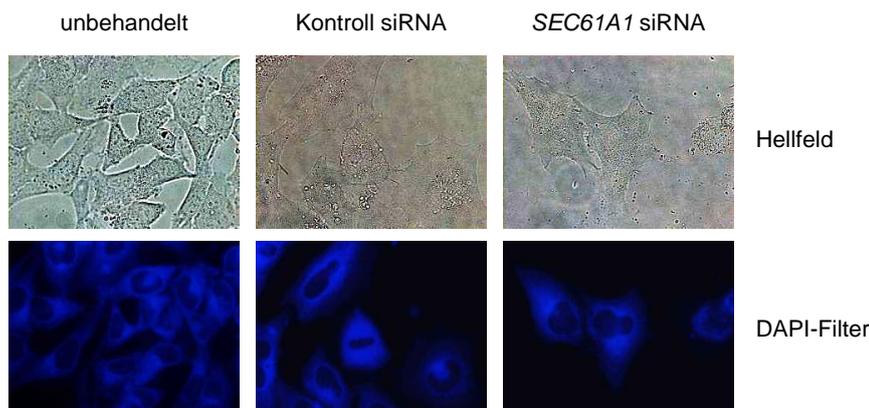


Abbildung 36: Einfluss der siRNA-vermittelten Sec61 α -Depletion (96 h) auf die ER-Morphologie von HeLa-Zellen. Je $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale auf einem Poly-L-Lysin vorbehandelten (0,1 mg/ml) 25 mm Deckglas entweder ohne weitere Behandlung ausgesät oder zusätzlich entweder mit 20 nM Kontroll siRNA oder *SEC61A1* siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 24 h erfolgte eine Nachtransfektion. Nach insgesamt 96 h Inkubation wurde eine ER-Färbung mittels ER-Tracker™ Blue-White DPX (V.2.5.1) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 1 mM ER-Tracker™ in HBSS über 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS wurden die Zellen mikroskopisch untersucht, indem eine Hellfeldaufnahme sowie eine entsprechende fluoreszenzmikroskopische Aufnahme im DAPI-Kanal gemacht wurden (600x, Plan Fluor 60x oil/1,25).

VI.2.3. Einfluss der Sec61 α -Modulation auf den *in vitro* Transport in SPZ

Auf der Grundlage der etablierten, reproduzierbaren *SEC61A1*-Manipulationsprozedur sollten nun funktionale Analysen, besonders im Hinblick auf den Einfluss der potentiellen Sec61 α -CaM-Interaktion in Säugetierzellen, durchgeführt werden. Da Sec61 α als porenbildende Untereinheit der ER-Translokase ausschlaggebend für den Transport diverser präsekretorischer sowie Membranproteine in das ER ist, zielte eine der wichtigsten Fragestellungen darauf ab, die Funktionalität der Sec61 α -IQ-Mutante (R24A/K29A) zu testen. Wie bereits von Sven Lang gezeigt wurde, hat eine Sec61 α -Depletion einen zu erwartenden inhibitorischen Effekt auf den *in vitro* Transport Signalpeptid-abhängiger Proteinsubstrate ins ER, welcher über eine Plasmid-gestützte Rettung via *SEC61A1*-Wildtyp-cDNA rekonstituiert werden kann (Lang, 2012; Lang *et al.*, 2012). Demnach sollte dieser Effekt reproduziert und anschließend in Bezug auf die genannte Sec61 α -Mutante untersucht werden. Hierzu wurden die unter VI.2.1 und VI.2.2 getesteten HeLa-Zellen verwendet, deren Sec61 α -Gehalt sowie Funktion mittels siRNA- und Plasmidtransfektion moduliert wurde. Die Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation entsprechend der unter Punkt V.2.4.5 beschriebenen, modifizierten Prozedur nach Wilson *et al.* mittels Digitonin-Behandlung semi-permeabilisiert und die endogene mRNA durch die Ca²⁺-abhängige S7-Nuklease degradiert (Wilson *et al.*, 1995). Als Modellsubstrat wurde das etablierte präsekretorische Protein Präprolaktin (ppl) verwendet, welches schon unter Punkt VI.1.1.1 zur Anwendung kam. Der cotranslationale *in vitro* Import ins ER-Lumen (V.2.3.3.1) wurde durch Abspaltung des Signalpeptids (Detektierbar durch Verringerung des Molekulargewichtes) sowie anschließende Sequestrierung analysiert. Wie erwartet wurde ppl im Kontroll-Ansatz (Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) zum reifen Prolaktin (pl) gespalten (24 % Prozessierungseffizienz), wobei der prozessierte Anteil gegenüber einer Proteinase K-Behandlung weitgehend geschützt war. Beide SPZ-Varianten, welche zuvor mit Kontroll siRNA und entweder *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid transfiziert wurden wiesen eine vergleichbare Transporteffizienz (22 bzw. 24 %) auf und waren ebenfalls vor einer Proteolyse geschützt. Wurde das Sec61 α -Protein zuvor depletiert (ca. 25 % Restprotein, s. Abbildung 33, A, B), war die Prozessierungseffizienz in Gegenwart von Kontroll-Plasmid signifikant reduziert (5 %). Wie erwartet konnte die Expression der wildtypischen *SEC61A1* cDNA in Anwesenheit der *SEC61A1*-UTR siRNA den Phänotyp nach Sec61 α -Depletion wieder retten, was in einer Erhöhung der Transportaktivität auf 20 % zu erkennen war. Wurde analog hierzu die *SEC61A1*-R24A/K29A-Variante im Depletionshintergrund exprimiert wurde eine vergleichbare Steigerung der Prozessierungseffizienz beobachtet (Abbildung 37, A). Somit ist die Sec61 α -IQ-Mutante, in gleicherweise wie die wildtypische Variante, transportkompetent. Die dargestellten Effizienzen zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler aus insgesamt fünf verschiedenen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob für alle *in vitro* Syntheseansätze die zuvor jeweils eingestellte Menge an zugesetzten Membranen im gleichen Bereich lag, wurde zusätzlich der Transport des TA-Membranproteins Synaptobrevin 2 (Syb2) mit den gleichen SPZ durchgeführt, da dessen Insertionseffizienz in

VI. Ergebnisse

die ER-Membran (zu sehen in Form einer Glykosylierung) nicht von der Anwesenheit der ER-Translokase (Kutay *et al.*, 1995; Whitley *et al.*, 1996), sondern lediglich von der Membrankonzentration abhängt. Somit bieten dieses Modelprotein eine interne Kontrolle, vergleichbar zur Ladekontrolle (β -Aktin) beim immunologischen Nachweis von Proteinen auf dem Western Blot (Lang, 2012). Zusätzlich wurde ein Teil der SPZ nach SDS-PAGE (V.2.1.1) mittels Coomassie Brilliant-Blue-Färbung (V.2.1.2) untersucht, da die Gesamtmenge an Proteinen der permeabilisierten Zellen indirekt die Konzentration an Membranen wiedergibt und somit als weitere Kontrolle dient. Wie in Abbildung 37, B und C zu sehen ist bewegt sich die relative Syb2-Insertionseffizienz ($n = 2$) wie auch die Proteinmenge ($n = 3$) jeweils im Bereich der Kontrolle (Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid), was somit belegt, dass die Menge an eingesetzten ER-Membranen vergleichbar und daher keinen Einfluss auf den Transport von ppl hatte.

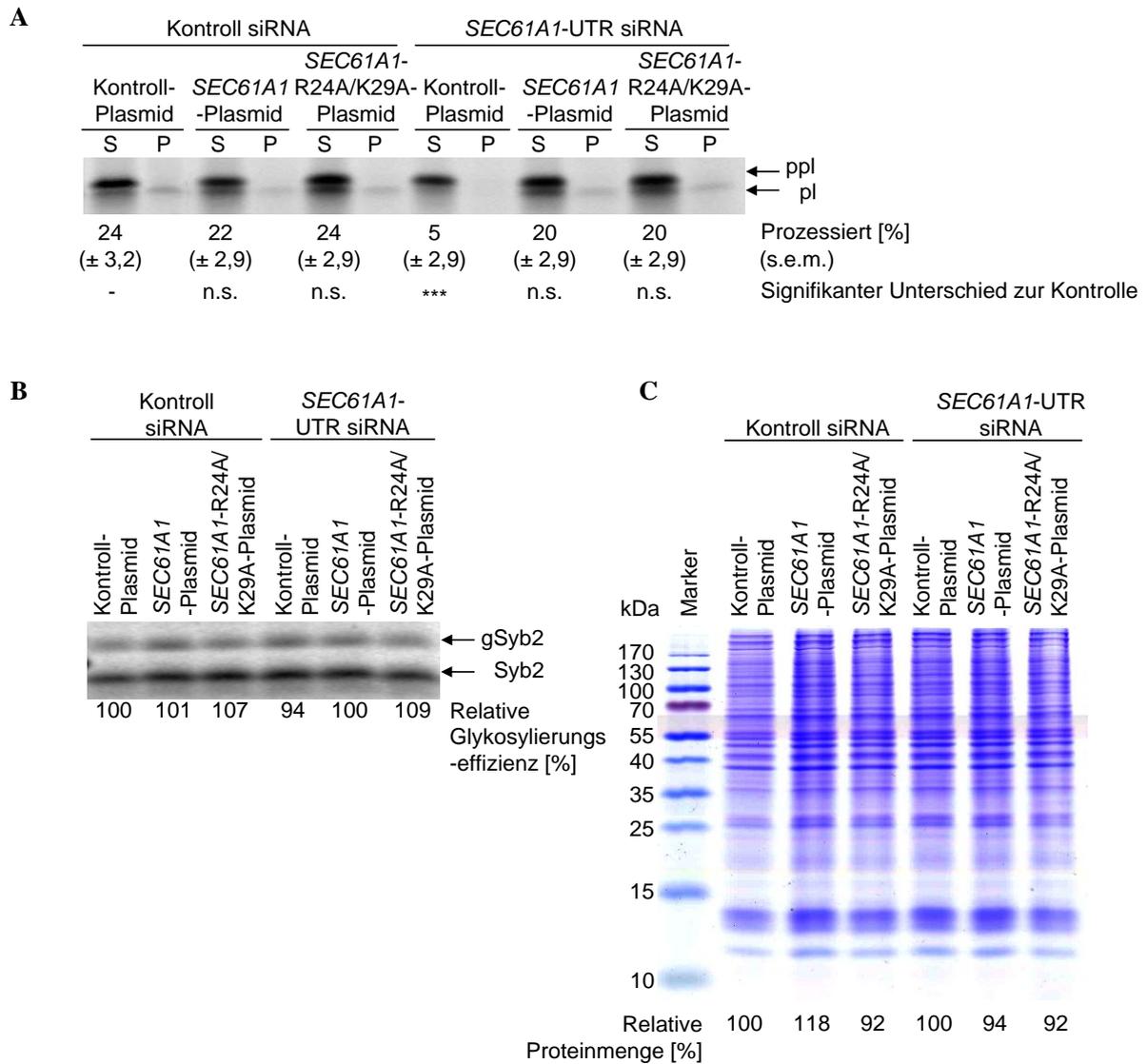


Abbildung 37: Einfluss der *SEC61A1*-Manipulation auf den Signalpeptid- und „tail-anchor“-abhängigen *in vitro* Transport (V.2.3.3.1) in humane, semi-permeabilisierte Zellen (SPZ). $5,2 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden jeweils in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und entweder mit Kontroll oder *SEC61A1*-UTR siRNA (20 nM) behandelt (V.2.4.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen mit siRNA nachtransfiziert und nach weiteren 8 h Kultivierung mit Kontroll-, *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid (IQ-Mutante) transfiziert (V.2.4.6.2). Nach insgesamt 96 h wurden die Zellen mit Digitonin semi-permeabilisiert (SPZ) **A**) Cotranslationaler Transport von ppl. Die mRNA von Präprolaktin (ppl) wurde im L416A-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [35 S]-Methionin sowie 32 % SPZ einer der sechs verschiedenen Ansätze translatiert (60 min, 30 °C; V.2.3.3.1). Im Anschluss wurde eine Sequestrierung (V.2.3.3.3) durchgeführt. Hierzu wurden die Ansätze zu je zwei Aliquots aufgeteilt und entweder mit Saccharose- (S) oder Proteinase K-Lösung (P) versetzt. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM PMSF (in Ethanol) für 5 min auf Eis inhibiert. Anschließend wurden die Proben auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch (V.2.1.1) aufgetrennt und die Proteine über „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert. (p = prä, Signalsequenz) Zur Angabe der Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren (unter S) der prozentuale Anteil des modifizierten Proteins im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + prozessierte Form) angegeben (n = 5 biologische Replikate). Um die jeweiligen Transporteffizienzen untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant deklariert (n.s.). **B**) Posttranslationale Membraninsertion von Syb2. Nach Translation der Syb2 mRNA im L416A-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [35 S]-Methionin für 15 min bei 30 °C wurden Cycloheximid (0,1 µg/µl) sowie RNase A (80 ng/µl) hinzugegeben und weitere 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 16 % SPZ einer der sechs verschiedenen *SEC61A1*-Transfektionsansätze hinzugegeben und zusätzliche 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden auf einem 17,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (V.2.1.1) aufgetrennt und die Proteine mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert (g = glykosyliert). Unterhalb der Gelspuren wurde der relative prozentuale Anteil (normiert auf den Ansatz Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) des glykosylierten Proteins im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + reife Form) angegeben (n = 2 biologische Replikate). **C**) Coomassie-Brillant-Blue-Färbung (CCB) der mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennten SPZ der verschiedenen Transfektionsansätze. Die Zellen wurden zuvor in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und bei 56°C erhitzt. Pro Gelspur wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen aufgetragen. Nach CCB-Färbung (V.2.1.2) wurde das Gel eingescannt (Image Scanner III) und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert. Unter den jeweiligen Spuren wurde die relative Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle (Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) angegeben (n = 3 biologische Replikate).

VI.2.4. Einfluss der Sec61 α -Modulation auf die Ca $^{2+}$ -Homöostase des ER

Wie bereits erwähnt, wurde der Sec61-Komplex mittels *in vitro* Analysen als ionenleitender Kanal charakterisiert (Erdmann *et al.*, 2009; Roy und Wonderlin, 2003; Wirth *et al.*, 2003) und konnte auch auf zellulärer Ebene als Ca $^{2+}$ -Leckkanal identifiziert werden (Amer *et al.*, 2009; Flourakis *et al.*, 2006; Giunti *et al.*, 2007; Ong *et al.*, 2007; Van Coppenolle *et al.*, 2004). Wie Frank Erdmann und Martin Jung zeigen konnten, kann Ca $^{2+}$ -CaM über ein IQ-Motiv (Abbildung 32) im zytosolischen N-Terminus der Sec61 α -Untereinheit an Sec61 binden und vermag die Konduktivität des Komplexes für diverse Ionen zu inhibieren (Erdmann *et al.*, 2011). In den folgenden Experimenten sollte demnach untersucht werden, ob der Sec61-Komplex im direkten Zusammenhang mit den im ersten Teil beschriebenen Effekten der CaM-Inhibition auf die zelluläre Ca $^{2+}$ -Homöostase steht.

VI.2.4.1. Sec61 α -Depletion inhibiert den Einfluss der CaM-Hemmung auf den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER

Neben der Verwendung verschiedener Proteinsyntheseinhibitoren konnte eine Beteiligung des Sec61-Komplexes am passiven Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER auch durch siRNA-vermittelte Sec61 α -Depletion demonstriert werden (Lang *et al.*, 2011). Daher sollte anhand der vorliegenden Daten eine Depletion der Translokationskomponente auch die Stimulation der passiven Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER durch die CaM-Antagonisten Ophiobolin A und TFP aufheben, vorausgesetzt diese Inhibition ist spezifisch und betrifft keine weiteren potentiellen Leckkanäle in der ER-Membran. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen entweder mit Kontroll-, SEC61A1 oder SEC61A1-UTR siRNA behandelt und für 96 h kultiviert. Zur Messung zytosolischer Ca²⁺-Änderungen wurden die Zellen mit Fura-2 AM beladen und in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert. Wie unter Punkt VI.1.2.1 wurden nach 1 min entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μ M Ophiobolin A oder 10 μ M TFP appliziert, nach weiteren 10 min 1 μ M TG hinzugegeben und die Messung für 9 min fortgesetzt.

Das Ergebnis der Ca²⁺-„imaging“-Experimente mit Kontroll siRNA-vorbehandelten Zellen wies keinen Unterschied zu denen mit unbehandelten Zellen auf (Vgl. Abbildung 26, A, B und Abbildung 38, A, D). Beide CaM-Antagonisten steigerten den durch TG demaskierten passiven Ca²⁺-Efflux aus dem ER auf etwa das Doppelte der Pufferkontrolle (von ca. 400 nM Maximum auf ca. 800 nM). Auch der initiale Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde erneut beobachtet. Wurden die Zellen zuvor mit SEC61A1 oder SEC61A1-UTR siRNA transfiziert zeigten diese jedoch einerseits einen erniedrigten Ca²⁺-Efflux (200 nM statt 380 nM im Kontrollansatz) und verloren zudem vollständig ihre Sensitivität gegenüber Ophiobolin A und TFP (Abbildung 38, B-D). Somit trägt CaM auf Ebene des Sec61-Komplexes zur Reduktion des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER bei.

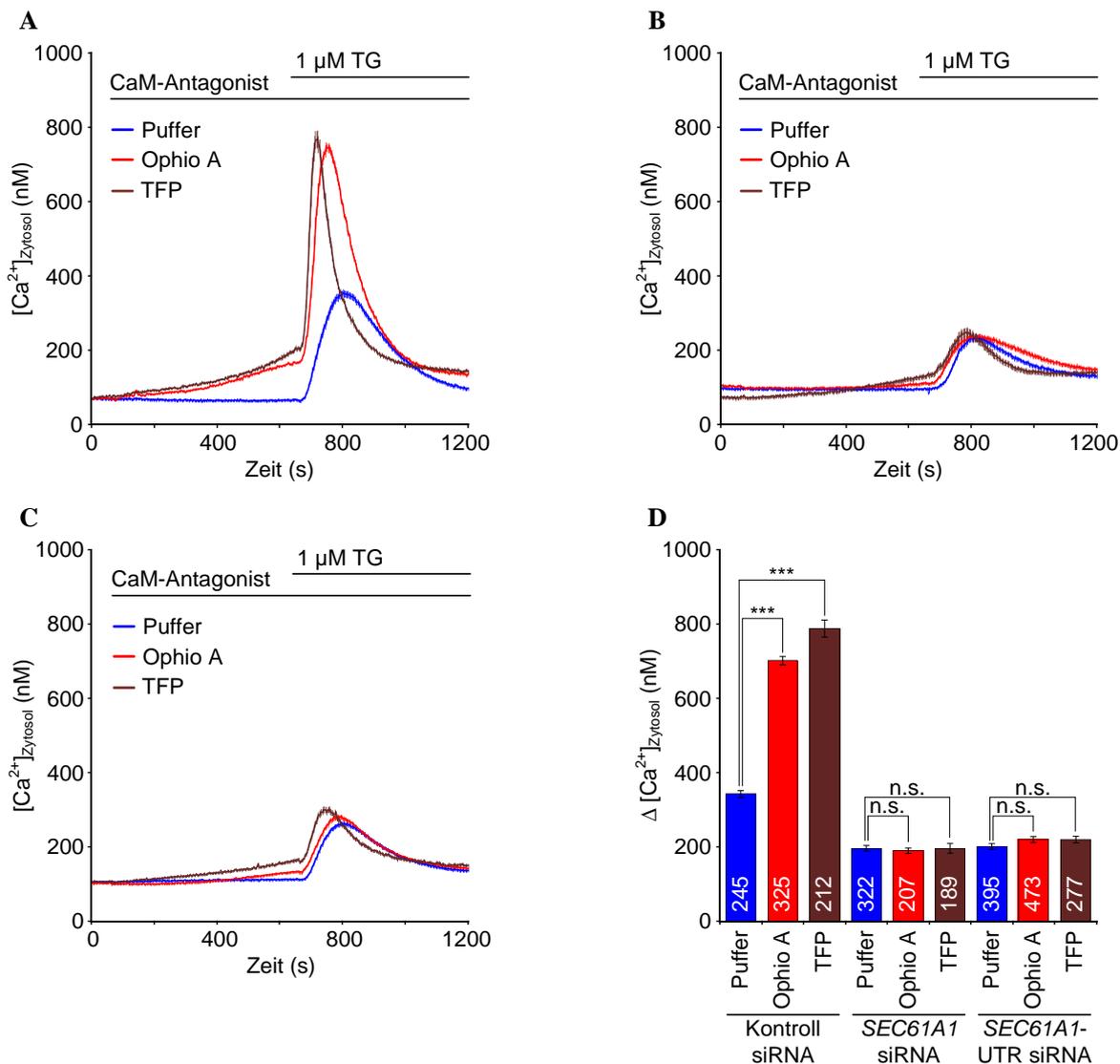


Abbildung 38: Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Änderung *Sec61 α* -depletierter HeLa-Zellen (96 h) nach Behandlung mit CaM-Antagonisten und Thapsigargin zur Untersuchung des Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Glasplättchen (25 mm) ausgesät und entweder mit **A**) Kontroll, **B**) *SEC61A1* oder **C**) *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert. 24 h später wurden die Zellen nachtransfiziert. Nach insgesamt 96 h Kultivierung wurden die Zellen mit 3,5 μ M Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μ M Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μ M Trifluoperazin (TFP) appliziert. Nach weiteren 10 min wurde 1 μ M Thapsigargin (TG) hinzugegeben und die Messung für 9 min fortgesetzt. Die y-Achse zeigt die gemessene zytosolische Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_{Zytosol}$, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. **D**) Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von TG der in (A), (B) und (C) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant deklariert (n.s.). Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 30-80 einzelne Zellen analysiert; A) $n_{Puffer} = 4$; $n_{Ophio} = 5$; $n_{TFP} = 4$; B) $n_{Puffer} = 5$; $n_{Ophio} = 5$; $n_{TFP} = 3$; C) $n_{Puffer} = 6$; $n_{Ophio} = 7$; $n_{TFP} = 4$. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI. Ergebnisse

Auch wenn nach 96 h *SEC61A1* siRNA-Behandlung keine gravierenden Auswirkungen auf die Viabilität und die ER-Morphologie der HeLa-Zellen zu beobachten war, sollte dennoch festgehalten werden, dass zu diesem Zeitpunkt bereits Veränderungen des Proteoms der Zelle sowie des zellulären Ca^{2+} -Gehaltes auftreten können (Lang, 2012). Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz mit den gleichermaßen manipulierten Zellen eine Behandlung mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin durchgeführt, um eine Aussage über den zellulären Gesamtgehalt an freiem Ca^{2+} , und damit einem potentiellen Verlust von Ca^{2+} aus dem ER, treffen zu können. Hierzu wurden die HeLa-Zellen wie zuvor 96 h mit siRNA transfiziert, mit Fura-2 AM beladen und in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. Nach einer Messdauer von 1 min wurde 5 μM Ionomycin appliziert und weitere 9 min gemessen. Beide Transfektionen zur Depletion von Sec61 α (*SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA) führten zu einem leichten, aber signifikanten Rückgang der zellulären Ca^{2+} -Konzentration um etwa 15-20 %, zu sehen in der erniedrigten Ratio 340/380-Änderung nach Ca^{2+} -Freisetzung (auf ca. 500) gegenüber den Kontroll siRNA behandelten Zellen (ca. 600) (Abbildung 39, A, B).

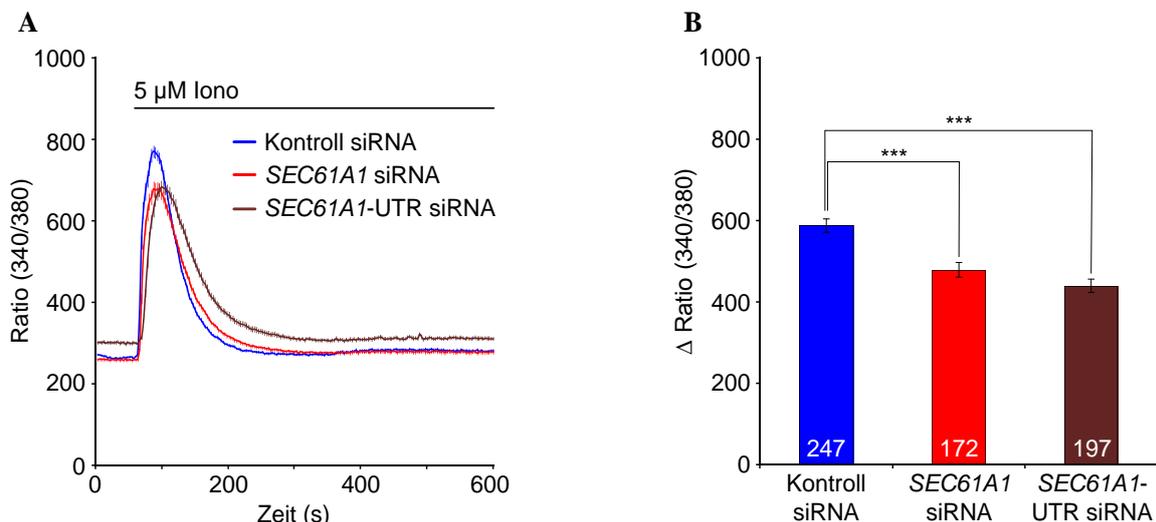


Abbildung 39: Messung der Änderung der Ratio (340/380) Sec61 α -depletierter HeLa-Zellen (96 h) nach Zugabe von Ionomycin zur Bestimmung des zellulären Gesamtgehaltes an Ca^{2+} . **A)** HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Glasplättchen (25 mm) ausgesät und entweder mit Kontroll, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert. 24 h später wurden die Zellen nachtransfiziert. Nach insgesamt 96 h Kultivierung wurden die Zellen mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurde 5 μM Ionomycin (Iono) appliziert und die Messung für 9 min fortgesetzt. Die y-Achse zeigt die gemessenen Ratio-Werte (340/380), welche gegen die entsprechen Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurden. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. **B)** Statistische Analyse der Änderung der Ratio nach Zugabe von Ionomycin der in (A) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 40-80 einzelne Zellen analysiert ($n_{\text{Kontroll siRNA}} = 4$; $n_{\text{SEC61A1 siRNA}} = 3$; $n_{\text{SEC61A1-UTR siRNA}} = 3$). Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

Um eine etwaige Fehlinterpretation der obigen Daten zu vermeiden, wurden die Experimente ebenfalls nach einer Inkubation der siRNA-transfizierten HeLa-Zellen für 48 h durchgeführt. Da hierbei der Sec61 α -Restproteingehalt noch ca. 25 % beträgt (Abbildung 31, A, D), kann zwar davon ausgegangen werden, dass der inhibitorische Effekt auf den Ca²⁺-Leckstrom weniger stark ausgeprägt ist, allerdings können so auch Langzeitfolgen sekundärer Art auf die Zelle reduziert werden. Wie zu erwarten war, zeigten die Zellen auch nach 48 h Kontroll siRNA-Transfektion, wie im korrespondierenden 96 h-Ansatz, eine deutliche Reaktion auf beide CaM-Antagonisten in Form eines erhöhten Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER nach TG-Zugabe (maximale Amplitude von ca. 400 nM in der Pufferkontrolle auf ca. 700 nM im Fall der CaM-Antagonisten) (Abbildung 40, A, C). Wurden die Zellen mit *SEC61A1*-UTR siRNA vorbehandelt erwies sich auch diese relativ kurze Transfektionsdauer als äußerst effizient. Der initiale Ca²⁺-Anstieg nach Applikation der CaM-Antagonisten wurde blieb zwar zum Teil bestehen, allerdings zeigte sich eine deutliche Reduktion der Amplitude der Einzelkurven im Mittel, welche sich nicht von der entsprechenden Pufferkontrolle unterschied (Abbildung 40, B, C). Somit kann auch 48 h nach *SEC61A1*-UTR siRNA-Transfektion, bzw. bei einer Sec61 α -Reduktion auf 25 %, eine eindeutige Inhibition des durch die CaM-Antagonisten erhöhten, passiven Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER festgestellt werden. Allerdings stellte sich auch hier die Frage, ob zu diesem Zeitpunkt der zelluläre Ca²⁺-Gesamtgehalt unverändert ist oder ob möglicherweise die Erniedrigung der Ca²⁺-Konzentration im ER den Ca²⁺-Gradienten über die ER-Membran verringert und somit den Ca²⁺-Leckstrom reduziert. Daher wurde auch hier analog eine Untersuchung des zellulären Ca²⁺-Gehaltes durch Applikation von Ionomycin durchgeführt. Nach 48 h Sec61 α -Depletion mittels *SEC61A1*-UTR siRNA wurde im Gegensatz zur Untersuchung nach 96 h kein signifikanter Unterschied in der Antwort auf die Ionomycin-Applikation im Vergleich zu den Kontroll siRNA-transfizierten Zellen beobachtet (Abbildung 40, A, D). Somit ist der Effekt der CaM-Antagonisten auf die Permeabilität der Translokationspore *per se* zurückzuführen.

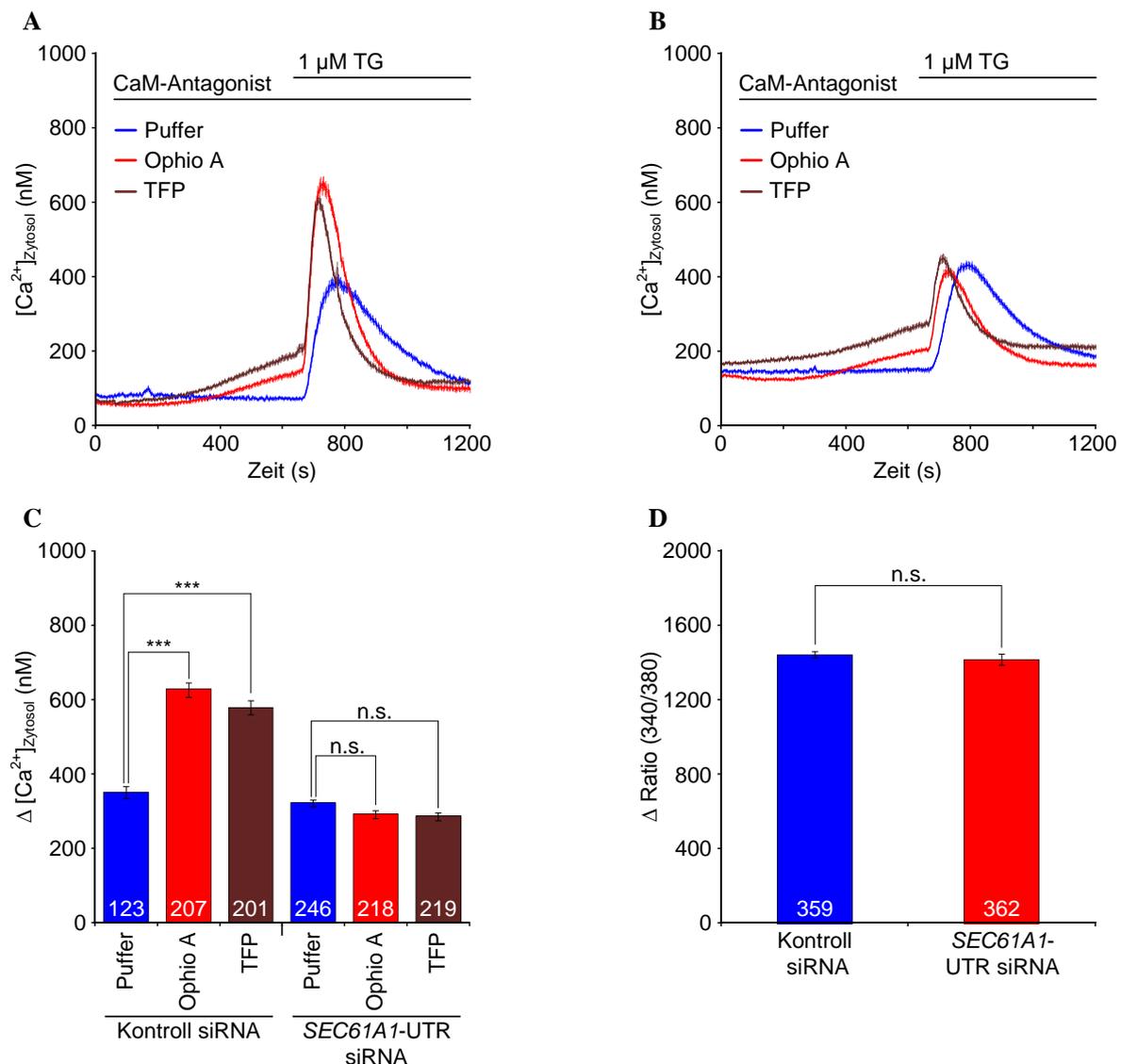


Abbildung 40: Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung Sec61α-depletierter HeLa-Zellen (48 h) nach Zugabe von CaM-Antagonisten und Thapsigargin (TG) zur Untersuchung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Glasplättchen (25 mm) ausgesät und mit **A**) Kontroll oder **B**) SEC61A1-UTR siRNA transfiziert. Nach 24 h erfolgte eine Nachtransfektion. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wurden die Zellen mit 3,5 μM Fura-2 AM beladen (45 min, dunkel), das Deckglas in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in das iMIC Mikroskop eingesetzt. Nach 1 min wurde Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μM Trifluoperazin (TFP) hinzugegeben. Nach weiteren 10 min wurde 1 μM TG appliziert und für weitere 9 min gemessen. Die Diagramme zeigen die zytosolische Ca²⁺-Konzentration, welche gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. **C**) Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG der in (A) und (B) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Experimente wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert, P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant (n.s.) deklariert. Pro Messung (n) wurden 30-80 Einzelzellen analysiert. (A) n_{Puffer} = 4; n_{Ophio} = 5; n_{TFP} = 4; (B) n_{Puffer} = 6; n_{Ophio} = 7; n_{TFP} = 4. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben. **D**) Messung der Ratio-Änderung (340/380) Sec61α-depletierter HeLa-Zellen (48 h) nach Zugabe von Ionomycin (Iono) zur Bestimmung des zellulären Ca²⁺-Gesamtgehaltes. Die Zellen wurden wie in (A) und (B) vorbehandelt. Nach 1 min wurde 5 μM Iono appliziert und die Messung für 6,5 min fortgesetzt. Die Statistische Analyse zeigt die Ratio-Änderung nach Iono-Zugabe. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. Zum Vergleich der Experimente wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant definiert (n.s.). Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 Zellen analysiert (n_{Kontroll siRNA} = 7; n_{SEC61A1-UTR siRNA} = 7). Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.2.4.2. Sec61 α -Depletion reduziert die Aktivierung des SOCE durch CaM-Antagonisten

Wie bereits eine genomweite, RNAi-basierende Studie zur Untersuchung von Proteinen mit einem Einfluss auf den „store-operated Ca²⁺ entry“ (SOCE) zeigte, spielt das Sec61 α -Protein auch in der Taufliege *Drosophila melanogaster* eine entscheidende Rolle als potentieller Ca²⁺-Leckkanal, da die siRNA-vermittelte Sec61 α -Reduktion zu einem verminderten kapazitiven Ca²⁺-Einstrom (CCE) über die Plasmamembran nach TG-induzierter Speicherentleerung führt (Zhang *et al.*, 2006). Die Untersuchung des SOCE sollte daher einen weiteren Aufschluss über den Einfluss von CaM auf den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER und das molekulare Ziel von CaM geben. Da mittels Sec61 α -Depletion die Steigerung des passiven Ca²⁺-Ausstroms gehemmt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass eine CaM-Inhibition, welche offensichtlich den Sec61-Komplex in seiner Öffnungswahrscheinlich modulieren kann, unter derartigen Bedingungen eine verringerte Speicherentleerung hervorruft.

HeLa-Zellen wurden wie zuvor beschrieben für 96 h mit Kontroll, *SEC61A1* oder *SEC61A1*-UTR siRNA behandelt und analog zu Punkt VI.1.2.2 mit 3,5 μ M Fura-2 AM beladen, in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert und 1 min nach Beginn des Ca²⁺ „imaging“-Experiments entweder mit Puffer (0,1 % DMSO), 100 μ M Ophiobolin A oder 10 μ M TFP für 10 min behandelt. Anschließend wurde Ca²⁺-Puffer hinzugegeben und die Messung für weitere 9 min fortgesetzt. Die Kontroll siRNA-transfizierten Zellen zeigten nach externer Ca²⁺-Applikation eine vergleichbare Reaktion auf die Vorbehandlung mit den CaM-Antagonisten, wie unbehandelte HeLa-Zellen (Abbildung 41, A). Beide Inhibitoren bewirkten eine deutliche Aktivierung des SOCE (Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration auf jeweils über 1 μ M). Wurden die Zellen mit einer der beiden siRNAs gegen *SEC61A1* vorbehandelt zeigte sich eine signifikante Reduktion des SOCE nach CaM-Inhibition im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollansätzen (Abbildung 41, B-D). Demnach erfolgt die Speicherentleerung über eine Ca²⁺-Freisetzung durch den Sec61-Komplex, welcher mittels CaM-Inhibition in einen geöffneten Zustand überführt wird.

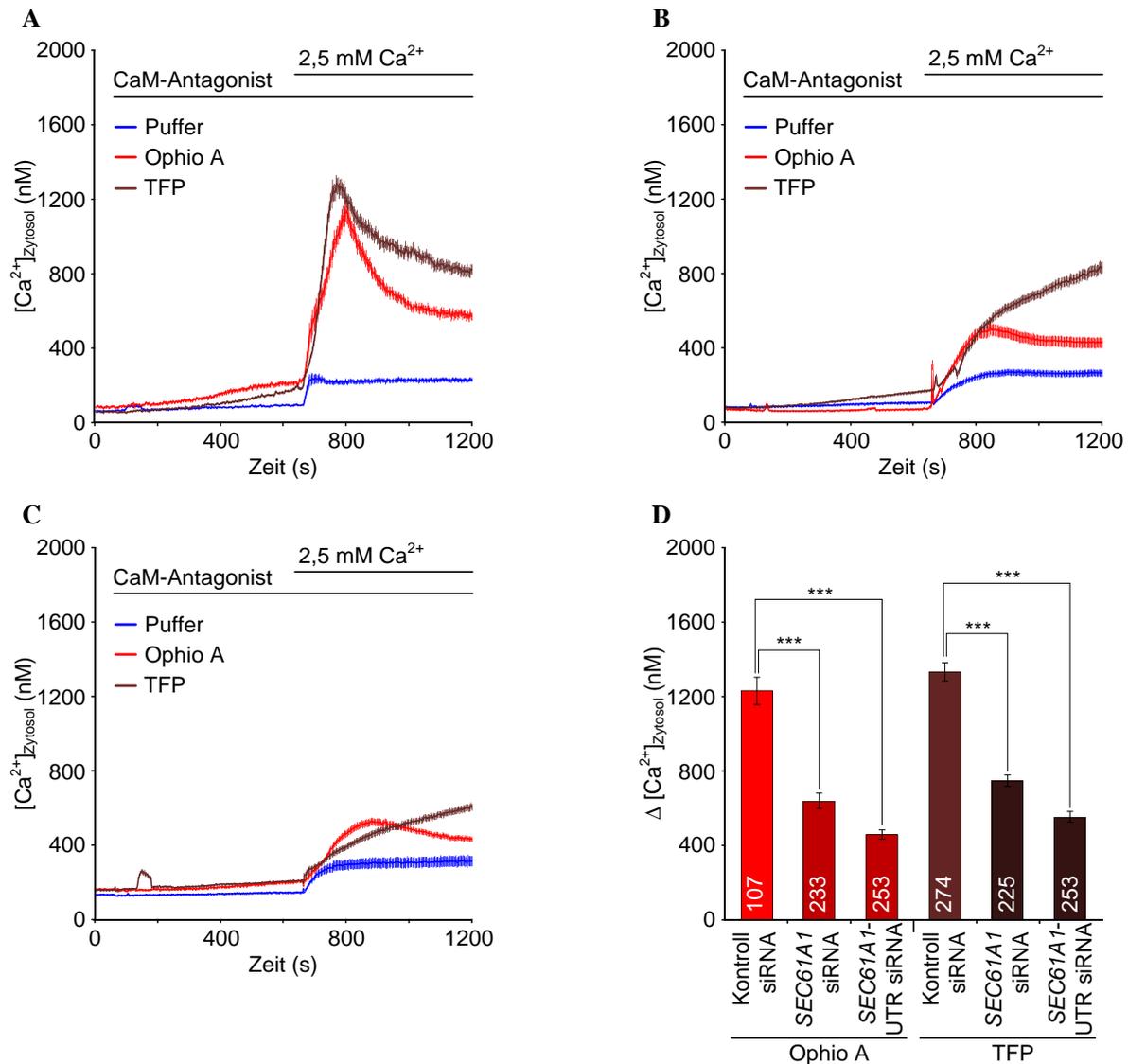
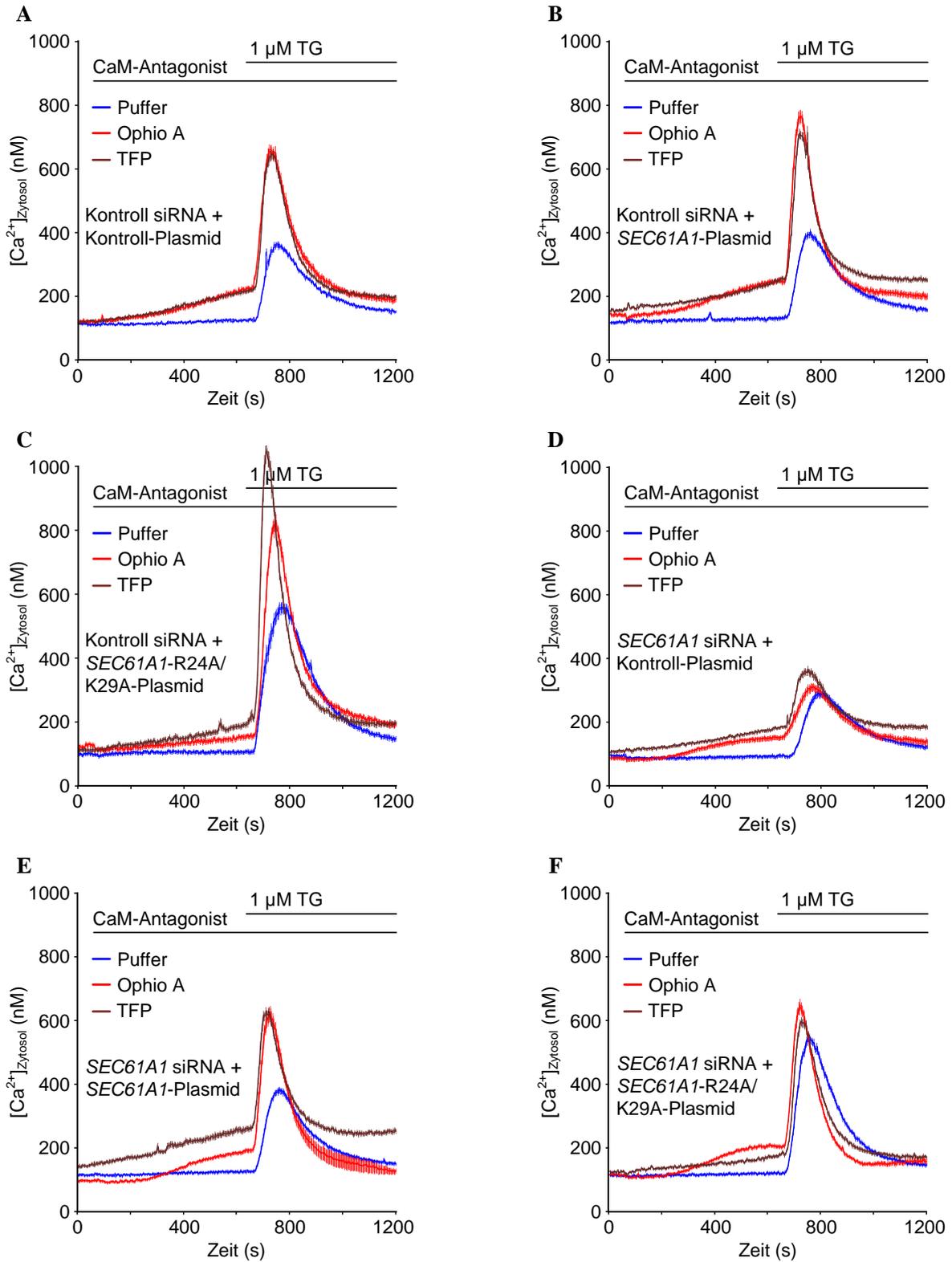


Abbildung 41: Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Änderung *Sec61α*-depletierter HeLa-Zellen nach Behandlung mit CaM-Antagonisten und Ca^{2+} -Puffer zur Untersuchung des SOCE („store-operated calcium entry“). HeLa-Zellen wurden auf einem Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckglas (25 mm) ausgesät und entweder mit **A**) Kontroll, **B**) *SEC61A1* oder **C**) *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert und für 96 h kultiviert. Die Zellen wurden mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln) und das Deckglas in die Messkammer eingespannt. Die Zellen wurden zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μM Trifluoperazin (TFP) appliziert. Nach 10 min wurde Ca^{2+} -Puffer hinzugegeben (Theoretische Ca^{2+} -Endkonzentration: 2,5 mM) und weitere 9 min gemessen. Die y-Achse zeigt die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, welche gegen die entsprechenden Messpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler aller Messungen dar. (Anzahl ausgewerteter Einzelzellen, (A) Kontroll siRNA: Puffer = 146 ; Ophio A = 107; TFP = 274 (B) *SEC61A1* siRNA: Puffer = 183 ; Ophio A = 233; TFP = 225 oder (C) *SEC61A1*-UTR siRNA: Puffer = 209 ; Ophio A = 233; TFP = 253). **D**) Statistische Analyse der zytosolischen Ca^{2+} -Änderung nach Zugabe von Ca^{2+} -Puffer infolge einer Ophio A- oder TFP-Vorbehandlung der in (A), (B) und (C) dargestellten Experimente mit unterschiedlich transfizierten HeLa-Zellen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Es wurden jeweils 2 Messungen durchgeführt und stets 50-90 Einzelzellen analysiert. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.2.4.3. Der Effekt der CaM-Antagonisten kann durch *SEC61A1*-, jedoch nicht durch *SEC61A1*-R24A/K29A-Expression wiederhergestellt werden

Um die obigen Experimenten zu bestätigen, sollte der Sec61 α -Depletions-Phänotyp durch Expression einer *SEC61A1*-cDNA-Kopie gerettet werden. HeLa-Zellen wurden hierzu analog zu Punkt VI.2.1.2 entweder mit Kontroll oder *SEC61A1*-UTR siRNA und anschließend mit Kontroll-, *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid transfiziert und für insgesamt 96 h kultiviert. Die Zellen wurden mit Fura-2 AM beladen, in Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen und in selbigem inkubiert. Die Ca²⁺-„imaging“-Experimente wurden analog zu Punkt VI.2.4.1 durchgeführt, indem die Zellen für 10 min mit Puffer, Ophiobolin A oder TFP vorbehandelt und anschließend der Ca²⁺-Leckstrom durch Zugabe von TG demaskiert wurde. Die Kontrollzellen (Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) zeigten keinen Unterschied zu den unbehandelten (Abbildung 26) oder Kontroll siRNA transfizierten Zellen (Abbildung 38, A, D) und auch die Expression der *SEC61A1*-cDNA in Gegenwart der Kontroll siRNA hatte keinen Einfluss auf den Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER (Abbildung 42, A, B, G). Wurde stattdessen die IQ-Mutante *SEC61A1*-R24A/K29A überexprimiert erhöhte sich die Amplitude nach TG-Applikation bereits in der Pufferkontrolle um fast 50 % auf ca. 600 nM und auch die Ca²⁺-Änderung nach Vorbehandlung mit Ophiobolin A (800 nM) und TFP (1 μ M) wurde in vergleichbarem Maße gesteigert (Abbildung 42, C, G). Diese Variante weist somit offenbar einen gegenüber dem Wildtypprotein dominanten Phänotyp auf. Wurde eine *SEC61A1*-UTR siRNA-Behandlung in Gegenwart von Kontroll-Plasmid durchgeführt, zeigte sich die zu erwartende Inhibition der Effekte der beiden CaM-Inhibitoren, wie sie bereits unter Punkt VI.2.4.1 beschrieben wurde (Abbildung 42, D, G). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im zuvor gezeigten *in vitro* Transport (VI.2.3) wurde der Effekt der Sec61 α -Depletion auf die Ca²⁺-Homöostase durch Expression der Wildtyp-*SEC61A1*-cDNA-Kopie wieder gerettet (Abbildung 42, E, G). Im Gegensatz hierzu war die IQ-Mutante Sec61 α -R24A/K29A bei gleichzeitiger Depletion des endogenen Sec61 α -Proteins nicht in der Lage den Effekt der CaM-Antagonisten wiederherzustellen. Darüber hinaus führte diese Variante unabhängig von der siRNA-Behandlung und in An- und Abwesenheit der CaM-Antagonisten zu einem gesteigerten Ca²⁺-Efflux (ca. 50%) aus dem ER *per se* (Abbildung 42, F, G). Diese Erhöhung rührt vermutlich daher, dass Sec61-Komplexe die eine Sec61 α -Kopie mit defektem IQ-Motiv tragen nicht durch CaM reguliert werden können und somit eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit besitzen.



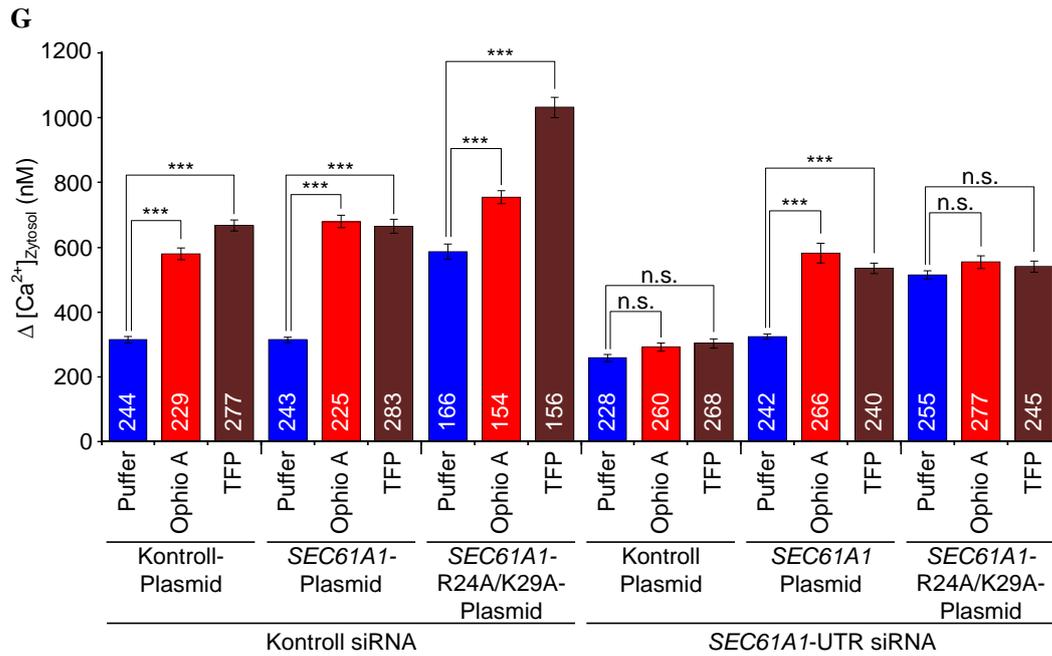


Abbildung 42: Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung von *SEC61A1*-UTR siRNA- und *SEC61A1*-Plasmid-transfizierten HeLa-Zellen nach Behandlung mit CaM-Antagonisten und Thapsigargin zur Untersuchung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER. **A-F)** HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Glasplättchen (25 mm) ausgesät und entweder mit Kontroll- oder *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit siRNA nachtransfiziert und nach weiteren 8 h Kultivierung mit Kontroll-, *SEC61A1*- oder *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid (*Sec61α*-IQ-Mutante) transfiziert (V.2.4.6.2). Nach insgesamt 96 h Kultivierung wurden die Zellen mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln). Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Puffer (0,1 % DMSO), 100 μM Ophiobolin A (Ophio A) oder 10 μM Trifluoperazin (TFP) appliziert. Nach weiteren 10 min wurde 1 μM Thapsigargin (TG) hinzugegeben und die Messung für 9 min fortgesetzt. Die y-Achse zeigt die gemessene zytosolische Ca²⁺-Konzentration, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert inklusive Standardfehler aller Messungen dar. **G)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG der in (A-F) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert, P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant (n.s.) deklariert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-100 einzelne Zellen analysiert; A) n_{Puffer} = 3; n_{Ophio} = 3; n_{TFP} = 3; B) n_{Puffer} = 3; n_{Ophio} = 3; n_{TFP} = 4; C) n_{Puffer} = 3; n_{Ophio} = 2; n_{TFP} = 2; D) n_{Puffer} = 3; n_{Ophio} = 4; n_{TFP} = 3; E) n_{Puffer} = 4; n_{Ophio} = 4; n_{TFP} = 4; F) n_{Puffer} = 4; n_{Ophio} = 4; n_{TFP} = 3. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.2.5. Einfluss der Retrotranslokation auf den Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass pflanzliche und bakterielle Exotoxine den Sec61-Komplex nutzen können, um über den Sekretionsweg ins Zytosol von Zellen zu gelangen (Schmitz *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1999). Hierzu gehört auch das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches nach endozytotischer Aufnahme über die Plasmamembran das ER retrograd mit Hilfe eines C-terminalen KDEL-Motivs, einem ER-Retentionssignal, erreicht (Jackson *et al.*, 1999). Um letztlich zum eigentlichen Ziel zu gelangen, dem im Zytosol befindlichen, eukaryotischen Elongationsfactor 2, welcher durch das Exotoxin A mittels einer Adenosindiphosphat-Ribosylierung inhibiert wird

(Pavlovskis *et al.*, 1978), kann das Toxin den Sec61-Komplex als Exportkanal nutzen. Dabei assoziiert das Exotoxin A mit dem Sec61-Komplex auf der ER-luminalen Seite und vermag spezifisch mit dem Export antigener Peptide zu interferieren (Koopmann *et al.*, 2000). Mittels Einzelkanalmessungen wurde darüber hinaus gezeigt, dass der Sec61-Kanal zwei Hauptkonduktivitätszustände für Ionen aufweist, welche zwischen Porendurchmessern von 0,6-6 nm fluktuieren können. Die Zugabe von Exotoxin A blockt dabei den hohen Konduktivitätszustand (Wirth *et al.*, 2003). Es kann somit angenommen werden, dass das Toxin unter zellulären Bedingungen, während des Exportes ins Zytosol an den Sec61-Komplex bindet und dessen dynamisches Gleichgewicht zum geschlossenen Zustand verschiebt. Ein Einfluss auf den Ca^{2+} -Leckstrom wäre demnach plausibel. Um dies zu untersuchen wurden unbehandelte HeLa-Zellen für 48 h kultiviert und mit Fura-2 AM beladen. Aufgereinigtes Exotoxin A (2,5 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) wurde 10 min vor einem Ca^{2+} -„imaging“-Experiment auf 37 °C vorgewärmt, um dessen biologische Aktivität zu gewährleisten. Die Zellen wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und 1 min nach Beginn der Messung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Exotoxin A oder Ca^{2+} -freiem Puffer behandelt. Nach 10 min erfolgte die Zugabe von 1 μM Thapsigargin (TG), woraufhin die die Messung für weitere 9 min fortgesetzt wurde.

Während die Applikation des Puffers die erwartete Reaktion der Zellen auf TG in Form einer zytosolischen Ca^{2+} -Änderung von ca. 400 nM bewirkte, hatte die Präinkubation mit Exotoxin A eine signifikante Erniedrigung dieser mittleren Amplitude um etwa 100 nM zur Folge (Abbildung 43, A, B). Wurde in einem vergleichbaren Versuchsaufbau anstelle von TG 5 μM Ionomycin hinzupipettiert, wiesen die Exotoxin A-vorbehandelten Zellen keinen Verlust an Ca^{2+} auf, sondern zeigten sogar eine leichte, jedoch signifikante Erhöhung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration gegenüber den Kontrollzellen (Abbildung 43, C, D). Exotoxin A hemmt somit den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER, vermutlich durch Bindung an den Sec61-Komplex.

Nachdem im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, dass die Leitfähigkeit des Sec61-Komplexes für Ionen wie den sekundären Botenstoff Ca^{2+} , durch das ubiquitäre Ca^{2+} -Sensorprotein CaM gesteuert werden kann, stellte sich im folgenden die Frage nach weiteren regulatorischen Mechanismen. Der Fokus lag dabei auf ER-luminalen Proteinen, wie dem molekularen Chaperon BiP.

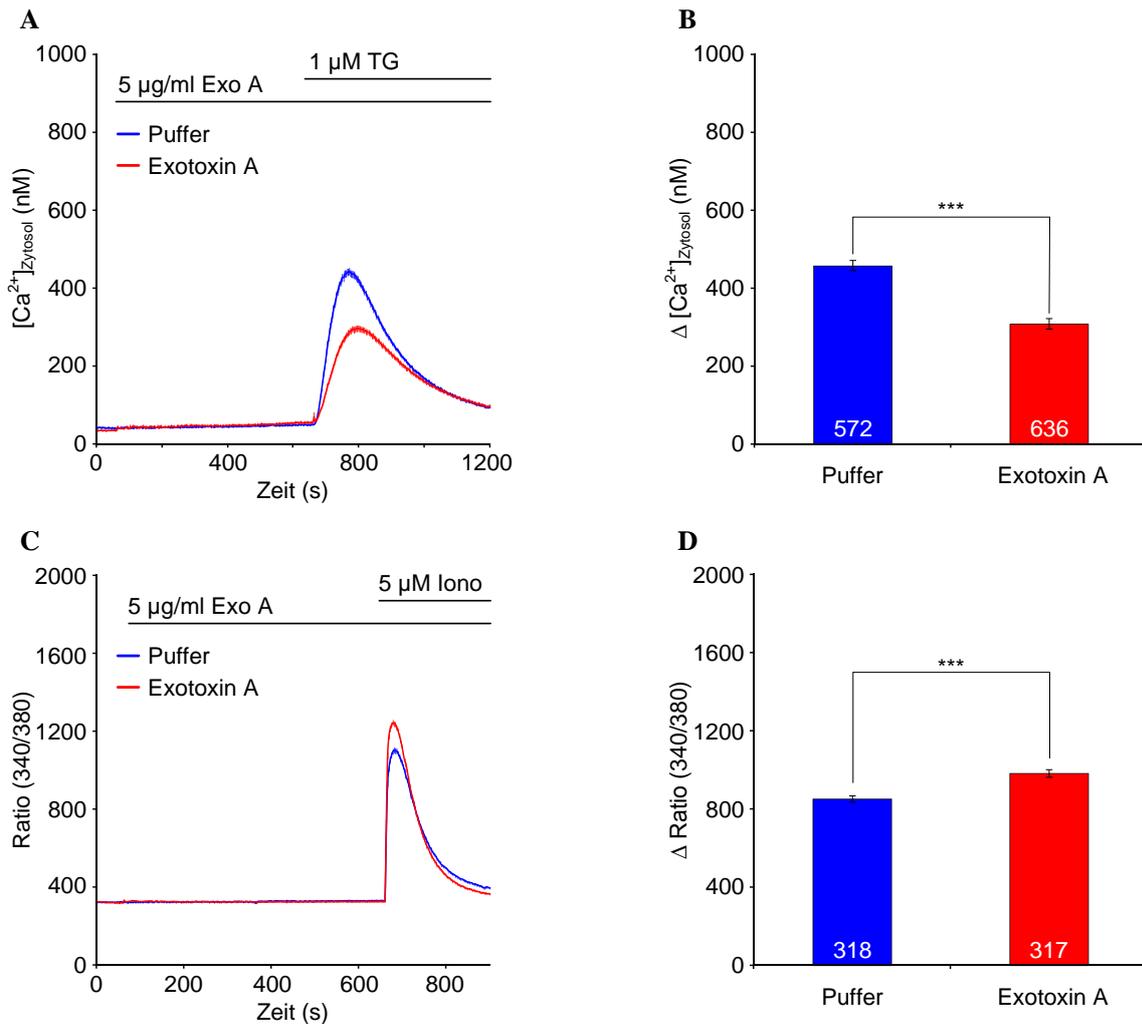


Abbildung 43: Ca²⁺-„imaging“ zur Untersuchung zellulärer Ca²⁺-Änderungen in HeLa-Zellen nach Behandlung mit Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*) **A)** Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung nach Zugabe von Exotoxin A (Exo A) und Thapsigargin (TG) zur Untersuchung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Glasplättchen (25 mm) ausgesät und für 48 h kultiviert. Die Zellen wurden mit 3,5 µM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln) und das Deckglas in die Messkammer eingespannt. Nach zweimaligem Waschen mit Ca²⁺-freiem Puffer wurden die Zellen in selbigem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurden entweder Ca²⁺-freier Puffer oder auf 37 °C vorgewärmtes Exo A appliziert. Nach weiteren 10 min wurde 1 µM TG hinzugegeben und die Messung für 9 min fortgesetzt. Die zytosolische Ca²⁺-Konzentration wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler der Messungen dar. **B)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG der in (A) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Um die Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert (n_{Puffer}= 11; n_{Exo A} = 12). Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben. **C)** Messung der Ratio-Änderung (340/380) nach Zugabe von Exo A und Ionomycin (Iono) zur Bestimmung der zellulären Gesamtmenge an freiem Ca²⁺. HeLa-Zellen wurden 48 h auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/mg) vorbehandelten Glasplättchen (25 mm) kultiviert, mit 3,5 µM Fura-2 AM beladen und zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen. Nach Inkubation in diesem wurde die Messung gestartet. Nach 1 min wurden entweder Ca²⁺-freier Puffer oder auf 37 °C vorgewärmtes Exo A appliziert. Nach 10 min wurde 5 µM Iono hinzugegeben und weitere 9 min gemessen. Die Ratio (340/380) wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler der Messungen dar. **D)** Statistische Analyse der Ratio-Änderung nach Zugabe von Iono der in (C) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zur Auswertung wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert (n_{Puffer}= 6; n_{Exo A} = 6). Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.3. Einfluss der BiP-Manipulation auf den ER-Import und den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER

Das ER-luminale, molekulare Chaperon BiP der Hsp70-Familie ist neben einer Vielzahl weiterer Chaperone wie Grp94, Grp170, Pdi sowie den Lektinen Calretikulin und Calnexin einer der wichtigsten Proteinfaltungskatalysatoren im ER. Viele dieser Enzyme liegen in einem Multiprotein-Komplex mit weiteren Chaperonen und Cochaperonen vor, welcher mit unvollständig gefalteten Proteinsubstraten assoziiert (Bergeron *et al.*, 1994; High *et al.*, 2000; Meunier *et al.*, 2002; Schrag *et al.*, 2003). Neben der Bindung neu synthetisierter Proteine (Blount und Merlie, 1991; Knittler und Haas, 1992) spielt BiP auch insbesondere bei der Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR) eine bedeutende Rolle, indem es durch Rekrutierung zu fehlgefalteten Proteinen von den Membranständigen UPR-Mediatoren Perk1, Ire1 und ATF6 freigesetzt wird und deren Repression aufgehoben wird (Bertolotti *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2002a). Eine vergleichbare Modulation ER-Membran-residenter Proteine durch BiP wurde auch bereits vielfach in Zusammenhang mit dem Sec61-Komplex gezeigt. *In vitro* Experimenten zufolge kann BiP die Öffnung des Translokons (Dierks *et al.*, 1993; Dierks *et al.*, 1996; Klappa *et al.*, 1991) sowie den effizienten Durchtritt von Polypeptiden durch die Translokationspore (Tyedmers *et al.*, 2003) vermitteln. Zudem gibt es auf Basis von Arbeiten mit rauen Mikrosomen und Proteoliposomen indirekte Hinweise auf eine Interaktion von BiP mit dem Sec61-Komplex und einer im Gegensatz zur Funktion beim Transport stehenden Rolle beim Schließen des Translokons, welche insbesondere in Abwesenheit oder vor der vollständigen Insertion von Polypeptiden erfolgt (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003). Diese regulatorische Funktion des Sec61-Translokons durch BiP, welche möglicherweise über eine direkte Modulation der Dynamik des Komplexes während distinkten Stadien erfolgt, wurde in dieser Arbeit auf Grundlage lebender Zellen analysiert. Dabei wurde der Fokus vor allem auf den Proteintransport sowie die Ca^{2+} -Homöostase gelegt. Als Strategie diente die Manipulation der *BIP*-Expression durch unterschiedliche siRNA- und Plasmid-Transfektionen und der anschließenden, funktionalen Untersuchung der Zellen.

VI.3.1. Überprüfung des zellulären BiP-Gehaltes mittels Western-Blot

Analog zu den Sec61 α -Manipulations-Experimenten in Teil VI.2 wurde als Ausgangspunkt für die folgenden funktionalen Analysen eine geeignete BiP-Depletions- und Plasmid-Rettungsstrategie entwickelt.

VI.3.1.1. BiP kann in HeLa-Zellen mittels siRNA effizient reduziert werden

Basierend auf einem etablierten BiP-Depletionsprotokoll mit zwei verschiedenen siRNAs (Cappel, 2011) wurde eine BiP-Reduktionskinetik von 24-96 h nach siRNA-Transfektion von HeLa-Zellen erarbeitet. Zur Überprüfung der effizienten Proteindepletion wurden die Zellen an jedem der vier Tage geerntet, aufbereitet (V.2.4.4) und die Proteinmenge semi-quantitativ mittels Western-Blot-Analyse (V.2.1.4) bestimmt, indem jeweils die entsprechenden Kontrollzellen als Referenz herangezogen wurden. Da die Reduktion des Sec61 α -Proteins, wie unter Punkt VI.2.4.1 gezeigt, bereits nach relativ kurzer Zeit zu Veränderungen der zellulären Ca²⁺-Konzentration führt, war das Ziel einen möglichst frühen Zeitpunkt nach *BIP* siRNA-Behandlung zu finden, welcher eine effiziente Proteindepletion bei gleichzeitig minimalen sekundären Effekten auf die Viabilität und das zelluläre Milieu bietet. Ein weiteres Kriterium war die Frage nach einer Korrelation des Restproteingehaltes mit der Ausprägung potentieller Phänotypen der Ca²⁺-Homöostase.

Zur Reduktion des BiP-Proteins wurden 6 x 10⁵ HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit Kontroll, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert und entweder bereits nach 24 h Kultivierung geerntet oder mit entsprechender siRNA nachtransfiziert (V.2.4.6.1). Solche zusätzlich behandelten Zellen wurden nach insgesamt 48 h, 72 h oder 96 h gleichermaßen geerntet. In bestimmten Fällen (z.B. *in vitro* Transport) wurden die Zellen zuvor semi-permeabilisiert (V.2.4.5). Die Proben wurden anschließend mittels Western-Blot (V.2.1.4) und Immundetektion (V.2.1.5) auf den BiP-Proteingehalt untersucht. Zur Quantifizierung wurden die BiP-Signale mit Hilfe des Signals der Proteinladekontrolle β -Aktin in der gleichen Gelspur normiert und die Signalintensität der BiP-Depletionsansätze mit denen der Kontroll siRNA-Ansätze des jeweiligen Erntezeitpunktes verglichen. Bereits nach 24 h Inkubation der HeLa-Zellen mit einer der beiden *BIP* siRNAs wurde eine Reduktion von BiP auf ca. 50-60 % des Proteingehaltes der Kontroll-Zellen beobachtet (Abbildung 44, A, B). Wurden die Zellen längere Zeit kultiviert stellte sich nach 48 h ein annähernd maximaler Depletionsgrad ein (ca. 30% Restprotein), der nur im Fall der *BIP*-UTR siRNA nach insgesamt 72 h noch leicht gesteigert wurde (ca. 25 % Restprotein). Bei einer Depletionsdauer von 96 h war die Effizienz der Proteinreduktion wieder leicht rückläufig und lag im Fall der *BIP* siRNA nur noch bei 35 % und nach Transfektion mit *BIP*-UTR siRNA bei 30 % (Abbildung 44, A, B). Da eine längerfristige Reduktion des BiP-Proteins die Synthese der UPR-induzierten, ER-luminalen Chaperone Grp170 und Grp94 aktiviert (Cappel, 2011), wurden die Proben der BiP-Depletionskinetik zusätzlich auf den Gehalt dieser beiden Proteine untersucht, indem die bereits analysierten PVDF-Membranen mit Grp94- und Grp170-Antikörper inkubiert wurden (V.2.1.5). Während nach 24 h der Proteingehalt der Chaperone unverändert war zeichnete sich ab 48 h BiP-Depletion mit beiden *BIP* siRNAs eine Synthesesteigerung beider Chaperone auf ca. 150-180 % ab, welcher sich in den folgenden 48 h nur noch auf ca. 190 % im Fall von Grp170 und ca. 220 % im Fall von Grp94 erhöhte (Abbildung 44, C). Aufgrund dieser Sekundäreffekte sowie der effizienten BiP-Reduktion nach 48 h wurden lediglich Vorversuche zur Viabilität (VI.3.2.1) und UPR-Induktion (VI.3.2.2) sowie eine Depletionskinetik zur Etablierung der

VI. Ergebnisse

Ca²⁺-Messungen (VI.3.4.1) mit längeren siRNA-Behandlungen von 96 h durchgeführt, während alle anderen Untersuchungen nach 48 h Transfektion erfolgten.

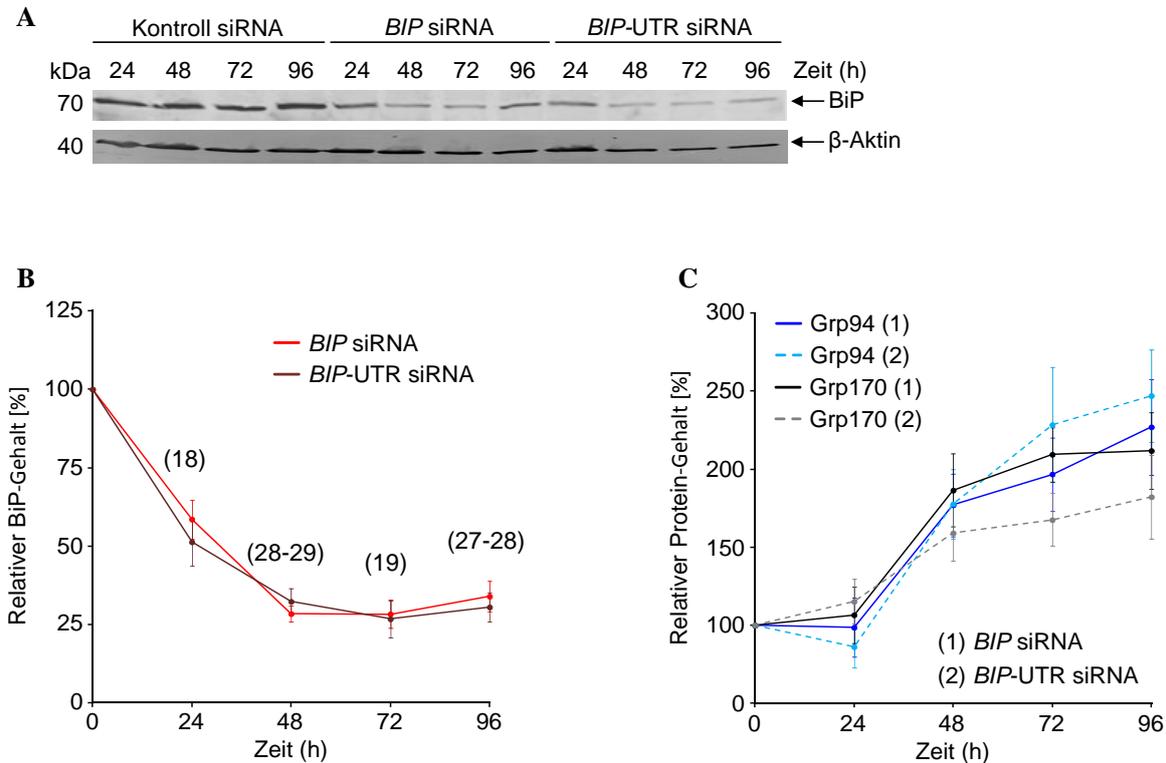


Abbildung 44: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der siRNA-vermittelten BiP-Depletion nach 24-96 h. **A)** Je 6×10^5 HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (mit oder ohne 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 35 nM Kontroll, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Die Ansätze für Inkubationszeiten von 48-96 h wurden 24 h danach nachtransfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h Inkubation geerntet, gezählt (V.2.4.3), lysiert und in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 56 °C erhitzt sowie mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt (12,5 %iges PA-Gel), auf eine PVDF-Membran transferiert (V.2.1.4) und mit Hilfe einer Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7) analysiert. Zum immunologischen Nachweis wurde ein Kaninchen-anti-BiP-Antikörper (1:500, in 3 % Magermilch) sowie ein Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, welches mit einem monoklonalen Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) detektiert wurde. Die Visualisierung erfolgte jeweils mittels Typhoon Trio™ Scanner. Die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer Zellzahl von 3×10^5 (kDa = Kilo-Dalton). **B)** Statistische Auswertung der in (A) dargestellten BiP-Depletionskinetik. Für die Quantifizierung der Western-Blot-Spuren wurden alle für diese Arbeit relevanten Experimente mit einbezogen. Die BiP-Signale wurden jeweils mit Hilfe des in der gleichen Spur bestimmten β -Aktin-Signals normiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich immer auf den Mittelwert der Kontroll siRNA (Werte nicht gezeigt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl quantifizierter Banden wurde über jedem der Zeitpunkte im Diagramm angegeben (je zutreffend für Kontroll, *BIP* und *BIP*-UTR siRNA). **C)** Sekundäre Regulation der ER-luminalen Chaperone Grp94 und Grp170 nach BiP-Reduktion. Die in (B) verwendeten Western-Blots der BiP-Depletionskinetik wurden mittels Immundetektion (V.2.1.5) zusätzlich auf den Grp94- und Grp170-Proteingehalt der entsprechenden Zellen analysiert. Zum Nachweis wurden jeweils ein Kaninchen-Antikörper gegen Grp94 und Grp170 (je 1:500, in 3 % Magermilch) sowie je ein Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Die Signale wurden wie in (B) mit Hilfe des β -Aktin-Signals normiert und analog quantifiziert (je 13-18 quantifizierte Banden). Aufgrund der Mehrfachbestimmung einzelner Western-Blot-Proben handelt es sich in (A) und (B) jeweils um technische Replikate. Die Zellen der Transfektionsansätze jeweiliger Versuchstage wurden stets vereint und entsprachen je 1-3 biologischen Replikaten. Daher ergibt sich folgende Gesamtzahl biologischer Replikate pro Transfektionstyp: 24 h-Wert = je 8; 48 h-Wert = je 20; 72 h-Wert = je 8; 96 h-Wert = je 5.

VI.3.1.2. Effiziente Depletion von BiP in HeLa-CES2-Zellen

In Anlehnung an die unter VI.3.1.1 verifizierte *BIP* siRNA-Transfektion wurde eine identische Depletionsprozedur zur Reduktion von BiP in der ebenfalls verwendeten Zelllinie HeLa-CES2 (V.1.7) angewandt, um mit diesen Zellen nachfolgend ER-luminale Ca^{2+} -Messungen durchführen zu können (VI.3.4.1). Da der Proteingehalt in herkömmlichen HeLa-Zellen nach 48 h siRNA-Behandlung bereits ausreichend reduziert war (Abbildung 44, B), wurde die stabil transfizierte HeLa-Zelllinie CES2, die sich ansonsten nicht von den Ursprungszellen unterscheidet, ebenfalls nach 48 h Transfektion (*BIP* und *BIP*-UTR siRNA) geerntet und aufbereitet (V.2.4.4). Die Zellen wurden zur Überprüfung des BiP-Proteingehaltes gleichermaßen einer Western-Blot-Analyse (V.2.1.4) unterzogen. Auch im Fall der HeLa-CES2 zeigte sich nach Behandlung mit beiden siRNAs eine BiP-Depletion auf ca. 30 %, welche somit im gleichen Bereich wie bei den HeLa-Zellen lag (Abbildung 45, A, C). Zudem wurde überprüft, ob diese Erniedrigung des ER-luminalen Chaperons einen Einfluss auf den Carboxylesterase-Gehalt (Ces) der Zellen ausübt. Da BiP als entscheidende Komponente für die Sec61-vermittelte Proteintranslokation ins ER beschrieben wird (Brodsky *et al.*, 1995), wäre daher nach 48-stündiger Depletion eine Reduktion des ins ER-Lumen importierten Proteins denkbar (Jaepel und Blum, 2011; Rehberg *et al.*, 2008). Zu diesem Zweck wurde in den selben BiP-depletierten HeLa-CES2-Zellen der Ces-Gehalt mittels Western-Blot untersucht (V.2.1.4). Als weitere Referenzen wurden unbehandelte HeLa- sowie HeLa-CES2-Zellen mitgeführt. Als Ladekontrolle diente wie zuvor β -Aktin. Während in der Gelspur mit HeLa-Zellen wie erwartet keine Bande für das Ces-Protein zu erkennen war, wurde im Fall der unbehandelten HeLa-CES2-Zellen ein deutliches Signal detektiert, wodurch zusätzlich die stabile Expression der Carboxylesterase verifiziert wurde (Abbildung 45, B). Auch die drei siRNA-Transfektionsansätze wiesen eine vergleichbare Expression auf und zeigten darüber hinaus anhand der statistischen Auswertung keine Veränderungen des Ces-Gehaltes nach 48 h-stündiger Behandlung mit *BIP* bzw. *BIP*-UTR siRNA gegenüber Kontroll-Zellen (Abbildung 45, B, C).

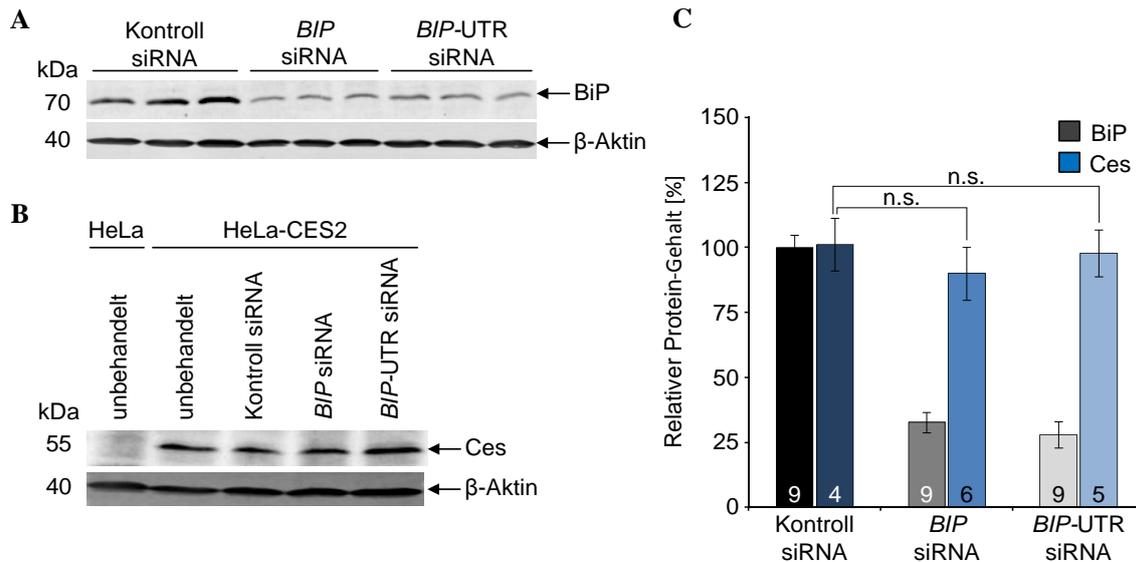


Abbildung 45: Nachweis der siRNA-vermittelten BiP-Depletion in HeLa-CES2-Zellen für 48 h mittels Western-Blot. **A)** Je 6×10^5 HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (mit 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 35 nM Kontroll siRNA, *BIP* siRNA oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 48 h Kultivierung wurden die Zellen geerntet, gezählt (V.2.4.3) und nach der Zelllyse mit Lämmli-Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden für 10 min bei 56 °C erhitzt sowie mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min) und nachfolgend mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt (12,5 %iges Polyacrylamidgel). Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (V.2.1.4) und mittels Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7) analysiert. Die Immundetektion erfolgte mit einem Kaninchen-anti-BiP-Antikörper (1:500, in 3 % Magermilch) sowie einem Cy5-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA). Zur Detektion der Ladekontrolle β-Aktin wurde ein monoklonaler Maus-anti-β-Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und ein sekundärer Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte jeweils mittels Typhoon Trio™ Scanner. Die Proben der aufgeführten siRNA-Transfektionsansätze wurden jeweils als 3-fach-Bestimmung auf das PA-Gel aufgetragen und die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 3×10^5 (M = Marker; kDa = Kilo-Dalton). **B)** Analoges Ansatz wie in (A) zur Untersuchung des Carboxylesterase-Gehaltes (Ces) BiP-depletierter Zellen. Als weitere Referenzen wurden zusätzlich unbehandelte HeLa- bzw. HeLa-CES2-Zellen mitgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Kaninchen-anti-Ces-Antikörper (Abcam, Cambridge; 1:1.000, in 3 % Magermilch) in Kombination mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch). Als Ladekontrolle diente wie in (A) das Zytoskelettprotein β-Aktin. Die Visualisierung des Ces-Signals erfolgte mittels Lumi Imager F1 (Roche). **C)** Statistische Auswertung der in (A) und (B) dargestellten BiP-Depletions-Ansätze. Die BiP- bzw. Ces-Signale wurden jeweils durch das in der gleichen Spur bestimmte β-Aktin-Signal zur Normierung dividiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich stets auf den Mittelwert der Kontroll siRNA-behandelten Zellen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht aufgrund der Mehrfachbestimmung einzelner Western-Blot-Proben der Anzahl technischer Replikate. Die Zellen der Transfektionsansätze jeweiliger Versuchstage wurden stets vereint und entsprachen je 3-4 biologischen Replikaten. Daher ergibt sich folgende Gesamtzahl biologischer Replikate: Kontroll siRNA = 11; *BIP* siRNA = 12; *BIP*-UTR siRNA = 12. Zum Vergleich der Datensätze wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant definiert (n.s.).

VI.3.1.3. Rettung der BiP-Depletion mit *BIP*-, *BIP*-R197E/H- und *KAR2*-cDNA

Nach der Etablierung einer erfolgreichen BiP-Depletionsstrategie mittels siRNA wurde basierend auf der Transfektion mit *BIP*-UTR siRNA, in Analogie zu Punkt VI.2.1.2 (*Sec61α*-Rettung), die Expression verschiedener *BIP*-Varianten sowie des Hefe-Orthologs *KAR2* (Rose *et al.*, 1989) im Hintergrund der endogenen BiP-Depletion in HeLa-Zellen überprüft.

VI.3.1.3.1. Quantifizierung von Kar2 in Hefemikrosomen zur Bestimmung der relativen KAR2-Expression in HeLa-Zellen

Zur Quantifizierung von Kar2 in Säugetierzellen wurde die Menge von Kar2, nach heterologer Expression der cDNA in HeLa-Zellen ermittelt und mit der des BiP-Proteins in unbehandelten Zellen verglichen. Hierzu wurde zunächst die Konzentration einer Lösung mit aufgereinigtem Kar2 (Weitzmann *et al.*, 2007) bestimmt, indem diese zusammen mit einer BSA-Reihe auf einem Coomassie-Brillant-Blue-Gel (CCB) aufgetrennt und die Signalintensitäten quantifiziert wurden (V.2.1.8.2). Die ermittelte Steigung der Regressionsgeraden der CCB-Signalintensitäten der BSA-Reihe wurde zur Bestimmung der Massen der Kar2-Reihe verwendet und eine Konzentration der Kar2-Stocklösung von 424 ng/μl berechnet (Abbildung 46, A, B). Ausgehend von dieser Kar2-Lösung wurde analog mittels Western-Blot (V.2.1.4) eine Masse von 320 ng Kar2 pro eq Hefe-RM bestimmt (Abbildung 46, C-E).

VI.3.1.3.2. Die Plasmidexpression der cDNA von BIP, BIP-R197E/H sowie von KAR2 in BiP-depletierten HeLa-Zellen liegt im Bereich der endogenen BIP-Expression

Zur Rettung potentieller Phänotypen durch die BiP-Depletion und somit zur weiteren Validierung der Spezifität der Transfektionsprozedur wurde auf Basis der 48-stündigen *BIP*-UTR siRNA Transfektion (VI.3.1.1, VI.3.1.2), analog zur *SEC61A1*-Expressionsmanipulation (VI.2.1.2), die Plasmid-kodierte *BIP*-cDNA im Hintergrund der endogenen BiP-Depletion exprimiert (V.2.4.6.1). Als Grundlage für die späteren Untersuchungen wurde zunächst überprüft, ob die Zellen durch die Plasmidtransfektion wieder einen ausreichenden BiP-Proteingehalt erreichen. Analog zu Punkt VI.3.1.1 wurden HeLa-Zellen mit Kontroll oder *BIP*-UTR siRNA behandelt (V.2.4.6.1) und nach 8 h Inkubation mit Kontroll- bzw. *BIP*-Plasmid transfiziert sowie nach weiteren 16 h mit siRNA nachtransfiziert. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wurden die Zellen mittels Western-Blot (V.2.1.4) auf den BiP-Proteingehalt untersucht. In Anwesenheit von Kontroll-Plasmid zeigte die *BIP*-UTR siRNA die erwartete Proteinreduktion, jedoch wiesen die Zellen im Vergleich zur reinen siRNA-Behandlung eine leichte Abnahme der Depletionseffizienz auf, welche von ursprünglich 25 % Restprotein (Abbildung 44, A, B) auf 35 % anstieg (Abbildung 47, A-C). Wurde stattdessen die *BIP*-cDNA mittels Plasmid exprimiert, erreichte der BiP-Gehalt der HeLa-Zellen nach endogener Depletion einen Level von ca. 230 %, der damit sogar über dem der Kontroll-Zellen lag.

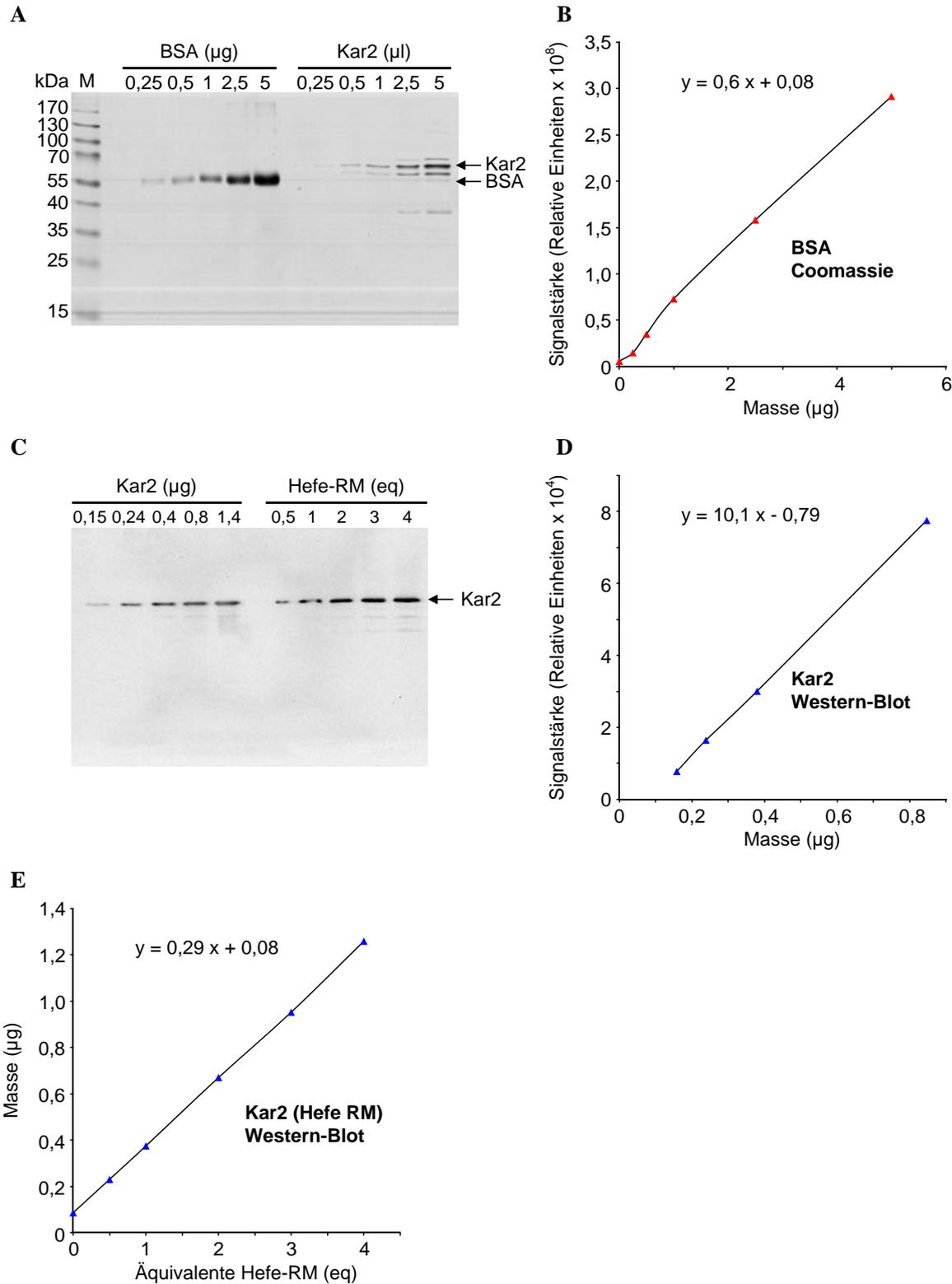


Abbildung 46: Bestimmung der Kar2-Konzentration in Hefemikrosomen **A**) Coomassie-Brilliant-Blue (CCB)-Färbung einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration (links) und verschiedener Volumina Kar2 (aus Hefe-RM aufgereinigt; rechts). Die Proteine wurden zuvor mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, bei 56 °C für 10 min erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE (V.2.1.1, 12,5%-iges PA-Gel) aufgetrennt **B**) Regressionsgerade basierend auf den Signalintensitäten der BSA-Reihe, aufgetragen gegen die jeweiligen Massen. Durch Einsetzen der Intensitätswerte der Kar2-Verdünnungsreihe in die errechnete Steigung wurden die entsprechenden Kar2-Massen und daraus die Konzentration der Kar2-Stocklösung ermittelt (= 424 ng/µl) **C**) Western-Blot (V.2.1.4) derselben Kar2-Verdünnungsreihe wie in (A) mit nun bekannten Massen (links) und

VI. Ergebnisse

einer Hefemikrosomen-Verdünnungsreihe mit unbekanntem Massen (rechts). Die Immundetektion (V.2.1.5) erfolgte mittels Schaf-anti-Kar2-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch) und sekundärem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Esel-anti-Schaf-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch) **D**) Analog zu **(B)** wurde mit Hilfe der Steigung der aus der Kar2-Reihe ermittelten Regressionsgerade, durch Einsetzen der Intensitätswerte der Hefemikrosomenreihe, eine Kar2-Konzentration von 320 ng/eq errechnet **E**) Durch Auftragung der ermittelten Kar2-Massen in Hefemikrosomen gegen die entsprechenden Äquivalente (eq) kann anhand der Steigung die Kar2-Masse beliebiger Äquivalente Hefemikrosomen errechnet werden. Somit kann wiederum die Masse an Kar2 in einem Zelllysate bestimmt werden, indem auf einem Western-Blot die Kar2-Signalintensitäten von transient mit *KAR2*-Plasmid transfizierten Zellen mit den Signalintensitäten von Hefemikrosomen verglichen werden (M = Marker; kDa = Kilo-Dalton; eq = Äquivalent).

Im Zuge dieser Rettungsexperimente wurde auch die Expression von *KAR2* untersucht, welches als orthologes Hsp70-Chaperon der Hefe mit einer Sequenzhomologie von 67 % (Rose *et al.*, 1989) theoretisch in der Lage sein könnte einen BiP-Mangelphänotyp zu rekonstituieren. Zuvor wurde jedoch getestet, ob eine potentielle Kompensation nicht bereits auf Ebene der Proteinsynthese scheitert. Wie Sabine Cappel in ihrer Dissertation gezeigt hat, ist Expression von *KAR2* in HeLa-Zellen möglich (Cappel, 2011), jedoch wurde nicht geklärt, in welcher Konzentration das Protein im Vergleich zum endogenen BiP-Level vorlag. Um den Kar2-Gehalt in HeLa-Zellen mit der physiologischen Konzentration von BiP in Relation setzen zu können wurden Hefemikrosomen (hRM), deren Kar2-Konzentration unter Punkt VI.3.1.3.1 ermittelt wurde, zusammen mit den BiP-Rettungsansätzen in der Western-Blot-Analyse (V.2.1.4) densitometrisch analysiert (V.2.1.7) und deren Signalintensität mit dem des heterolog exprimierten *KAR2* in HeLa-Zellen verglichen. Ausgehend von einer Kar2-Masse von 0,96 µg in 3 eq hRM ergab sich im Mittel (n = 6 technische Replikate) eine Masse von 0,7 µg Kar2-Protein pro 300.000 Kontroll siRNA transfizierten sowie 1,15 µg pro 300.000 *BIP*-UTR siRNA transfizierten Zellen. Analog wurde auch die Signalintensität des BiP-Proteins in Kontroll-Zellen mit der entsprechenden Intensität in Hundepankreas-mikrosomen (RM) verglichen. Deren BiP-Konzentration (5 µM) wurde bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe Zimmermann bestimmt (Weitzmann *et al.*, 2007) und entspricht umgerechnet einer Masse von 1,08 µg BiP-Protein pro 3 eq RM. Wurden die Western-Blot-Signale von RM und Kontroll-Zellen in Relation gesetzt, ergab sich eine Masse von 0,76 µg BiP-Protein in 300.000 HeLa-Zellen. Den berechneten Proteinmassen zufolge wurde somit im Vergleich zur physiologischen BiP-Konzentration für Kontroll siRNA + *KAR2*-Plasmid-transfizierte HeLa-Zellen eine relative Kar2-Konzentration von 93 % und für *BIP*-UTR siRNA + *KAR2*-Plasmid-transfizierte Zellen eine relative Kar2-Konzentration von 150 % (Abbildung 47, D) bestimmt. Da Kar2 und BiP aufgrund ihrer hohen Homologie (Rose *et al.*, 1989) sehr ähnliche molekulare Massen besitzen (74 bzw. 72 kDa) wurde keine Umrechnung der kalkulierten Massen in eine Stoffmenge vorgenommen. Damit enthalten insbesondere die *BIP*-UTR siRNA behandelten Zellen ausreichend Kar2-Protein, um nach einer BiP-Depletion theoretisch eine Rettung des Proteingehaltes zu ermöglichen. Schließlich befand sich auch die *BIP*-Plasmidexpression in Gegenwart der Kontroll siRNA mit 250 % im vergleichbaren Bereich wie bei simultaner *BIP*-UTR siRNA-Transfektion während eine heterologe *KAR2*-Expression keinen Einfluss auf die BiP-Depletion (39 % Restprotein) hatte (Abbildung 47, A, C). Neben den zuvor

genannten BiP-Rettungsansätzen, stellte sich weiterhin die Frage nach einem Einfluss spezifischer Punktmutationen auf die Funktionalität des BiP-Proteins. Die Mutation eines positiv geladenen Arginin-Restes an Position 197 zu einem neutralen (His) oder negativ-geladenen (Glu) Aminosäurerest hat eine nahezu vollständige Inhibition der Interaktion zwischen BiP und Proteinen mit J-Domäne (Hsp40-Cochaperone) zur Folge. Zudem zeigen entsprechende Mutanten eine erhöhte intrinsische ATPase-Aktivität sowie ein reduziertes Vermögen gebundene Substrate freizusetzen (Alder *et al.*, 2005; Awad *et al.*, 2008). Zur Untersuchung der Expression dieser BiP-Varianten wurden die Säugetier-Expressionsplasmide pcDNA3-BIP-R197E-IRES-GFP und pcDNA3-BIP-R197H-IRES-GFP generiert. Hierzu wurde jeweils die cDNA-Sequenz durch gerichtete Klonierung (V.2.2.2, V.2.2.3) in den Vektor pcDNA3-BIP-IRES-GFP (*Eco91I/NheI*) inseriert (Restriktionsschnittstellen: *Eco91I/XbaI*) und die Plasmide hinsichtlich einer funktionalen und mengenmäßig adäquaten Expression in HeLa-Zellen untersucht. Die Durchführung der siRNA- und Plasmid-Transfektion erfolgte analog zu den oben beschriebenen BiP-Rettungsansätzen. Wurde die Mutanten *BIP-R197E* oder *BIP-R197H* im BiP-Depletionshintergrund exprimiert zeigte sich ein ähnlich hoher Proteingehalt (200-230 %) wie im Fall des Wildtyps (Abbildung 47, B, C). Somit kann eine proteasomale Degradation aufgrund einer Fehlfaltung weitgehend ausgeschlossen und die theoretische Möglichkeit einer Rettung eines Phänotyps nach BiP-Depletion angenommen werden.

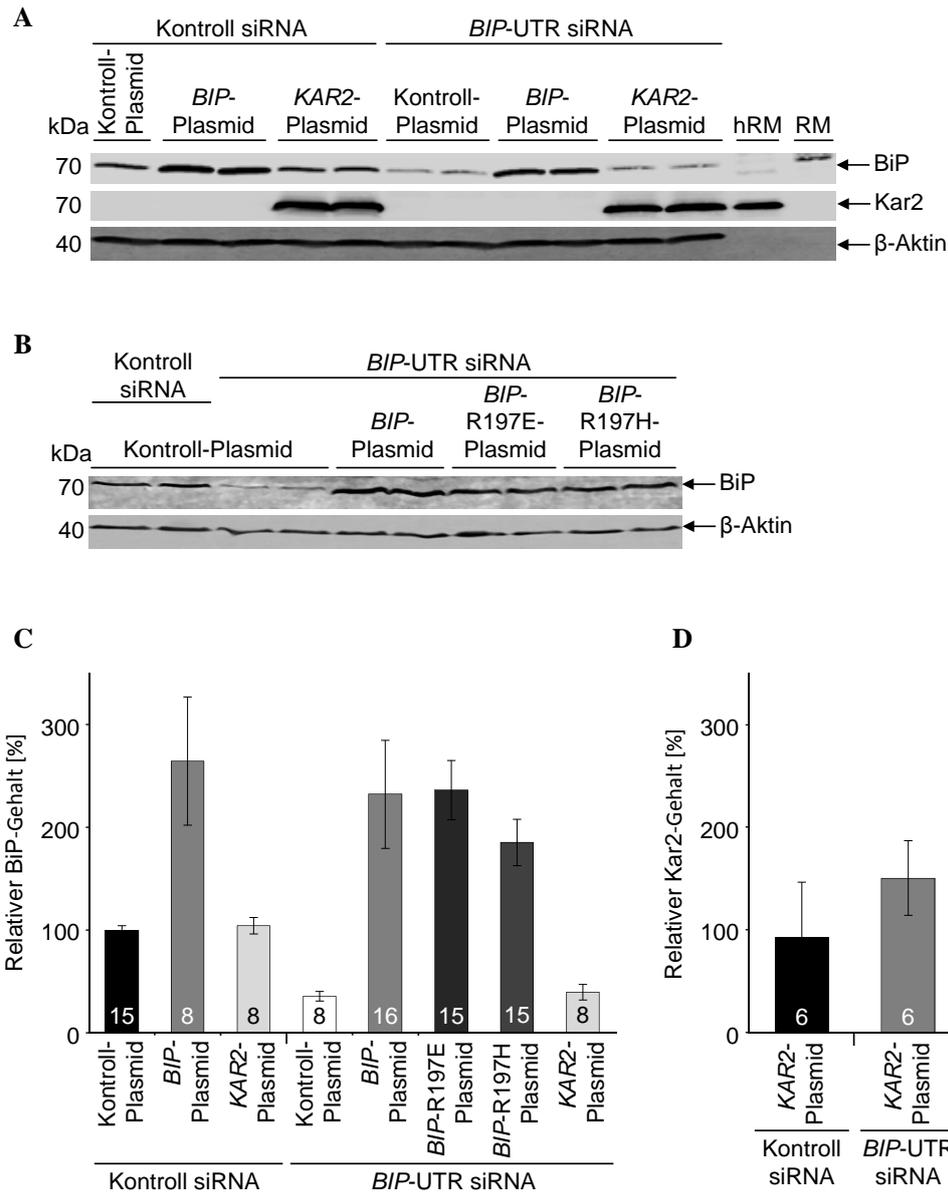


Abbildung 47: Western-Blot zur Untersuchung der siRNA-vermittelten BiP-Depletion (48 h) und Plasmid-Expression von *BIP*-, *BIP*-R197E/H bzw. *KAR2*-cDNA (40 h) in HeLa-Zellen. Je 6×10^5 HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (mit oder ohne 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 35 nM Kontroll oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Die Zellen wurden nach 8 h mit **A**) Kontroll-, *BIP*- oder *KAR2*-Plasmid bzw. **B**) *BIP*-R197E- oder *BIP*-R197H-Plasmid transfiziert und erhielten 24 h nach der siRNA-Behandlung ein zweites Mal siRNA. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wurden die Zellen geerntet, gezählt (V.2.4.3), lysiert und mit Lämmli-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 56 °C erhitzt sowie mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend erfolgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE (V.2.1.1; 12,5 %-iges PA-Gel) und der Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (V.2.1.4) sowie eine Analyse der Proteine mittels Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7). Die Detektion von Kar2 erfolgte mit einem Schaf-anti-Kar2-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundärem Meerrettich-Peroxidase (POD)-gekoppeltem Esel-anti-Schaf-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch). Der Nachweis von BiP wurde mit Hilfe eines Kaninchen-anti-BiP-Antikörpers (1:500, in 3 % Magermilch) sowie einem Cy5-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) durchgeführt. Als Ladekontrolle diente β-Aktin, welches mit einem Maus-anti-β-Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) detektiert wurde. Die Visualisierung der Cy-gekoppelten Antikörper erfolgte mittels Typhoon Trio™ Scanner, die des POD-gekoppelten mit Hilfe des Lumi Imager F1 (Roche). Die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 3×10^5 . (M = Marker; kDa = Kilo-Dalton). **C**) Statistische Auswertung der in (A) und (B) dargestellten BiP-Manipulationsansätze. Die BiP-Signale wurden durch das in der gleichen Spur bestimmte β-Aktin-Signal zur Normierung dividiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich stets auf den Mittelwert der Kontroll siRNA. Die Fehlerbalken

VI. Ergebnisse

geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht aufgrund der Mehrfachbestimmung einzelner Western-Blot-Proben der Anzahl technischer Replikate. Die Zellen der Transfektionsansätze jeweiliger Versuchstage wurden stets vereint und entsprachen je 3-4 biologischen Replikaten. Daher ergibt sich folgende Gesamtzahl biologischer Replikate: Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid = 18; Kontroll siRNA + *BIP*-Plasmid = 10; Kontroll siRNA + *KAR2*-Plasmid = 10; *BIP*-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid = 19; *BIP*-UTR siRNA + *BIP*-Plasmid = 16; *BIP*-UTR siRNA + *BIP*-R197E-Plasmid = 9; *BIP*-UTR siRNA + *BIP*-R197E-Plasmid = 9; *BIP*-UTR siRNA + *KAR2*-Plasmid = 10. **D**) Statistische Auswertung der in (A) dargestellten *KAR2*-Expressions-Ansätze. Die *Kar2*-Signale wurden entsprechend der unter Punkt VI.3.1.3.1 beschriebenen Prozedur durch Vergleich mit den Signalen der Hefemikrosomen quantifiziert, mit der endogenen BiP-Menge von Kontroll-Zellen verglichen und als relativer Proteingehalt (%) angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden (technische Replikate) ist am unteren Ende der Balken angegeben. (Anzahl biologischer Replikate: je 3; RM = raue Hundepankreasmitochondrien; hRM = raue Hefemikrosomen).

Da in Säugetierzellen bislang nur gezeigt wurde, dass eine prolongierte BiP-Reduktion (96 h) einen letalen Phänotyp verursacht (Cappel, 2011; Schäuble *et al.*, 2012), jedoch nicht die Spezifität der siRNA-vermittelten Depletion durch Kompensation mittels *BIP*-cDNA-Expression gezeigt wurde, wurde ein analoges Rettungsexperiment für 96 h durchgeführt, allerdings mit kleinen technischen Modifikationen. $4,5 \times 10^6$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und zunächst nach 24 h Inkubation mit Kontroll-, *BIP*-, *KAR2*- oder *BIP*-R197E/H-Plasmid transfiziert (V.2.4.6.2). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 10 nM Kontroll bzw. *BIP*-UTR siRNA transfiziert und 24 h danach entsprechend nachtransfiziert (V.2.4.6.1). Die Ansätze wurden für eine siRNA-Gesamttransfektionsdauer von 96 h kultiviert und mittels Western-Blot auf den BiP- bzw. *Kar2*-Gehalt überprüft (V.2.1.4).

Wurde der BiP-Gehalt der jeweiligen Manipulationsansätze mit dem der Kontroll-Zellen (Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) verglichen zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach 48 h Transfektion. In Gegenwart von Kontroll- oder *KAR2*-Plasmid wurde nach 96 h *BIP*-UTR siRNA-Behandlung eine signifikante Reduktion des BiP-Proteins beobachtet, welche jedoch im Fall der zusätzlichen Kontroll-Plasmid-Transfektion mit einem Restproteingehalt von ca. 50 %, weniger effizient ausfiel als dies in den bisherigen Genexpressionsminderungen zu sehen war. Die Konzentration der verschiedenen BiP-Varianten nach Plasmidexpression in Gegenwart von *BIP*-UTR siRNA lag in allen Fällen im Bereich von etwa 200 % (Abbildung 48, A, B). Auch die relative *KAR2*-Expression befand sich oberhalb der erwünschten Rate von mindestens 100 % im Vergleich zur endogenen *BIP*-Expression (Vergleich der Signalintensität von rauen Hefemikrosomen mit der Signalintensität von heterolog in HeLa-Zellen synthetisiertem *Kar2*; Abbildung 48, A; Quantifizierung nicht gezeigt).

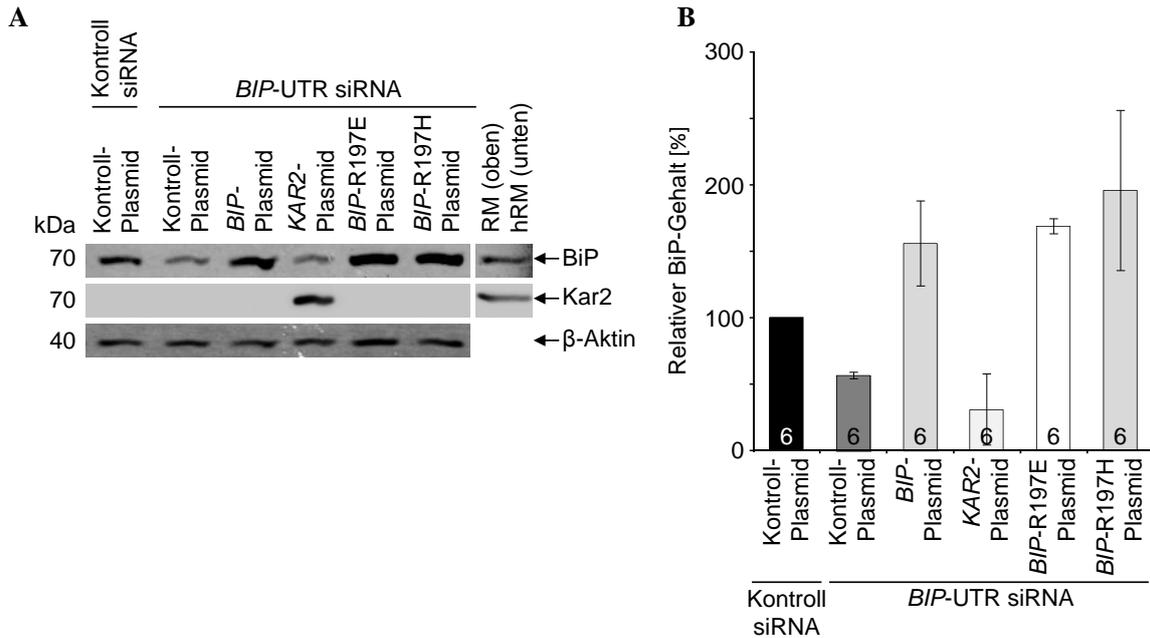


Abbildung 48: Western-Blot zum Nachweis der BiP-Depletion (96 h) sowie der Rettung mittels Plasmid-Expression von *KAR2*- oder verschiedenen *BIP*-Varianten (120 h) in HeLa-Zellen. **A)** Je $4,5 \times 10^5$ HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit *BIP*-, *KAR2*-, *BIP*-R197E- oder *BIP*-R197E-Plasmid transfiziert und nach weiteren 24 h mit 10 nM Kontroll oder *BIP*-UTR siRNA behandelt (V.2.4.6.1). Nach weiteren 24 h erfolgte eine siRNA-Nachtransfektion. Die Zellen wurden für insgesamt 96 h nach der ersten siRNA-Transfektion inkubiert und daraufhin geerntet, gezählt (V.2.4.3), lysiert und mit Lämmli-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 56 °C erhitzt und mit „Glassbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend erfolgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE (V.2.1.1; 12,5 %-iges PA-Gel) und der Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (V.2.1.4). Die Proteine wurden mittels Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7) analysiert. Zur Detektion von BiP wurde ein Kaninchen-anti-BiP-Antikörper (1:500, in 3 % Magermilch) in Kombination mit einem Cy5-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Der Nachweis von Kar2 erfolgte mit einem Schaf-anti-Kar2-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundärem Meerettich-Peroxidase (POD)-gekoppeltem Esel-anti-Schaf-Antikörper (1:1.000, in 3 % Magermilch). Als Ladekontrolle diente β -Aktin, das mit Hilfe eines Maus-anti- β -Aktin-Antikörpers (1:5.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) detektiert wurde. Zur Visualisierung der Cy-Antikörper wurde der Typhoon TrioTM Scanner und zur Dokumentation der ECL-Signale Lumi Imager F1 verwendet. Die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 3×10^5 (M = Marker; kDa = Kilo-Dalton; RM = raue Hundepankreas-mikrosomen; hRM = raue Hefemikrosomen). Die Signale der Mikrosomen (RM und rRM) entstammen jeweils der gleichen Abbildung, wie die links daneben gezeigten Banden der transfizierten HeLa-Zellen und wurden lediglich zur besseren Darstellung der Bereiche von Interesse ausgeschnitten direkt daneben angeordnet **B)** Statistische Auswertung der in (A) dargestellten BiP-Rettungsansätze. Die Signale wurden mit Hilfe des jeweiligen β -Aktin-Signals normiert und der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich stets auf den Mittelwert der Kontroll siRNA. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht der Anzahl technischer Replikate (biologische Replikate: jeweils 2).

VI.3.2. Einfluss der BiP-Modulation auf Zellproliferation und ER-Stress

Analog zu den Sec61 α -Manipulationsexperimenten wurde auch im Vorfeld zu den *in vitro* Transport-Experimenten und den Untersuchungen der Ca²⁺-Homöostase des ER eine Analyse wichtiger zellulärer Parameter wie der Proliferation sowie ER-spezifischer Charakteristika wie dessen Stresstatus (UPR-Induktion; „unfolded protein response“) nach Manipulation des BiP-Proteingehaltes durchgeführt. Die daraus gewonnen Informationen sollten einer verbesserten Etablierung der

Versuchsbedingungen sowie Interpretation der Ergebnisse dienen. Im Vorfeld wurde bereits durch Stefan Schorr, mittels SIM-Fluoreszenzmikroskopie („structured illumination microscope“) anhand eines etablierten ER-Markers (Sec62), gezeigt, dass die Integrität der ER-Struktur nach 96 h BiP-Depletion nicht beeinträchtigt wird (Gustafsson *et al.*, 2008; Schäuble *et al.*, 2012).

VI.3.2.1. Prolongierte BiP-Depletion führt zur Inhibition der Zellproliferation

Die in der BiP-Depletionskinetik (VI.3.1.1) beschriebenen Ansätze wurden jeweils nach erfolgter Kultivierung der Zellen, d.h. vor der Überprüfung des Proteingehaltes und vor den eigentlichen funktionalen Analysen (VI.3.3, VI.3.4) mittels „Countess® Automated Cell Counter“ (IV.2.4.3.2) gezählt (im Fall von Ca²⁺-„imaging“-Experimenten nach Entnahme des Deckglases aus der 6 cm Zellkulturschale) und jeweils mit den entsprechenden Kontroll siRNA-behandelten Zellen verglichen.

Bis zu einer Inkubationsdauer von 48 h lag die Gesamtzellzahl BiP-depletierter HeLa-Zellen im Bereich derer von Kontroll siRNA-transfizierten Zellen (ca. 2,5-fache Verdopplung im Vergleich zur Ausgangszellzahl; Abbildung 49, A), wobei zu diesem Zeitpunkt bereits eine annähernd maximale BiP-Reduktion (25-30 % Restprotein) mit beiden siRNAs zu beobachten war (Abbildung 44, A, B). Während sich die Kontroll-Zellen nach 96 h bis auf das 5-fache der ursprünglichen Zellzahl vermehrt hatten, stagnierte die Proliferation beider BiP-Depletionsansätze fast vollständig, was die von Sabine Cappel gezeigte Bedeutung des Hsp70-Chaperons für die Viabilität von HeLa-Zellen bestätigt (Cappel, 2011). Wie bereits erläutert stellte sich die Frage, ob eine Rettung dieses letalen Phänotyps nach BiP-Reduktion möglich ist (VI.3.1.3.2). Wie zuvor anhand des Proteingehaltes der HeLa-Zellen nach 96 h Expressionsmanipulation in der Western-Blot-Analyse gezeigt wurde (Abbildung 48, A, B), besteht aufgrund der ausreichenden Proteinkonzentration der BiP-Varianten als auch an Kar2, in allen Fällen die theoretische Möglichkeit einer Rettung der BiP-depletierten Zellen. Die Zellen aus jeweils zwei Ansätzen wurden in Form einer 3-fach-Bestimmung gezählt und die Zellzahl mit dem Kontroll-Ansatz (Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) in Relation gesetzt. In Analogie zur BiP-Reduktionskinetik (Abbildung 49, A) und in Korrelation zur entsprechenden Proteindepletion (Abbildung 48, A, B) zeigten auch die zusätzlich mit Kontroll-Plasmid behandelten Zellen nach *BIP*-UTR siRNA-Transfektion eine entsprechende Reduktion der Zellproliferation auf ca. 55 % (Abbildung 49, B). Wurde unter den gleichen Voraussetzungen die *BIP*-cDNA überexprimiert (ca. 150 % Proteingehalt, Abbildung 48, A, B), wiesen die Zellen wieder eine normale Vermehrungsrate (ca. 110 % im Vergleich zur Kontrolle) auf (Abbildung 49, B). Somit kann die BiP-Depletion und die daraus resultierende Letalität der HeLa-Zellen durch eine Plasmid-gestützte Expression der *BIP*-cDNA wieder aufgehoben werden.

Es stellte sich jedoch die Frage, ob die Funktion des Säugetier-Hsp70-Chaperon auch durch ein orthologes, eukaryotisches Protein, wie dem Hefeprotein Kar2, kompensiert werden kann. Da Kar2 in *S. cerevisiae* an entscheidenden zellulären Vorgängen, wie der Proteintranslokation ins ER (Boisramé *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2001), der Faltung neu synthetisierter Proteine (Simons *et al.*, 1995), der „unfolded protein response“ (Kohno *et al.*, 1993; Okamura *et al.*, 2000) sowie der Dislokation fehlgefalteter Proteine ins Zytosol für die proteasomale Degradation (Kabani *et al.*, 2003) beteiligt ist, wäre aufgrund dessen sowie seiner Homologie zu BiP (Rose *et al.*, 1989) eine Komplementation denkbar. Zudem wurde durch Sabine Cappel gezeigt, dass eine Synthese von Kar2 über 72 h in HeLa-Zellen zumindest keinen nachteiligen Einfluss auf deren Vitalität ausübt (Cappel, 2011). Es sollte jedoch bemerkt werden, dass Kar2 in Fluoreszenzquenching-Experimenten einen dominant-negativen Effekt auf die Funktion von BiP beim Schließen der Translokationspore aufweist (Alder *et al.*, 2005).

Nach Transfektion mit *BIP*-UTR siRNA wiesen die HeLa-Zellen sowohl in An- als auch Abwesenheit des *KAR2*-Plasmids eine reduzierte Proliferation (50 %) auf. Kar2 war somit nicht in der Lage, zumindest bestimmte, essentielle Funktionen von BiP zu übernehmen und den Depletionsphänotyp zu retten (Abbildung 49, B). Auch die beiden BiP-R197-Mutanten, welche eine defekte Interaktionsdomäne für Proteine mit J-Domäne und eine Substratbindungsdefizienz aufweisen, waren trotz gleicher Proteinkonzentration wie im Fall des Wildtyps (Abbildung 48, A, B) nicht in der Lage den durch Reduktion des endogenen BiP-Levels resultierenden letalen Phänotyp zu retten. Darüber hinaus wiesen diese sogar Anzeichen weiterer Beeinträchtigungen der Zellviabilität auf und damit offensichtlich einen dominant-negativen Effekt, denn die Proliferation lag im Fall des Ansatzes mit BiP-R197H bei nur 40 %, im Fall von BiP-R197E sogar nur noch bei 35 % (Abbildung 49, B). Dieses Ergebnis wird zudem durch die Tatsache bestätigt, dass bereits die alleinige Überexpression der beiden Mutanten zu einem deutlichen Wachstumsdefizit führte (Daten nicht gezeigt).

Zuletzt wurden alle weiteren, für die Folgeexperimente relevanten Transfektionskombinationen über 48 h hinsichtlich einer Beeinflussung der Zellproliferation untersucht. Hierzu gehören die unter VI.3.1.3 genannten Rettungsansätze sowie der im späteren Teil der Arbeit präsentierte BiP-/Sec61 α -Doppeldepletionsansatz (VI.3.4.4.1). Alle Zellzahlen der jeweiligen Experimentgruppen wurden mit dem zugehörigen Kontroll-Ansatz verglichen und stets als relative Werte angegeben. Die Anzahl der Zellen bewegte sich dabei, mit leichten Abweichungen, im Bereich der Kontrollzellen. Lediglich Zellen die für 48 h mit *BIP*-UTR siRNA sowie 40 h mit *BIP*-R197E- bzw. *BIP*-R197H-Plasmid transfiziert wurden, wiesen eine auffallende Reduktion der Zellproliferation mit ca. 65-70 % im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 49, C). Dies bestätigt auch nochmals die zuvor gemachte Beobachtung des zusätzlichen Rückgangs der Proliferation im Rettungsansatz mit 96 h siRNA-Behandlung (Abbildung 49, B).

VI.3.2.2. BiP-Mangel führt zur Aktivierung der „unfolded protein response“

Die „unfolded protein response“ (UPR) stellt einen zellulären Mechanismus dar, der in Folge einer Akkumulation ungefalteter oder fehlgefalteter, ER-luminaler Proteine aktiviert wird, wenn diese nicht mehr ausreichend über die ER-assoziierte Protein-Degradation (ERAD) beseitigt werden können (Malhotra und Kaufman, 2007). Die Antwort auf diesen ER-Stress fällt dabei auf verschiedenen Wegen aus, welche die Reduktion des Proteinimports in das ER, die Steigerung der Faltungskapazität durch gezielte Aktivierung von Chaperonen sowie die verstärkte Elimination fehlgefalteter Proteine über den ERAD-Weg einschließen (Kaufman *et al.*, 2010). Die UPR wird in Säugetierzellen über die drei ER-residenten Membranrezeptoren Ire1, PERK und ATF6 vermittelt, welche unter normalen Bedingung durch das molekulare Chaperon BiP gebunden werden. Durch Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen wird BiP zu diesen rekrutiert und dissoziiert so von den Membranrezeptoren, deren Repression infolgedessen aufgehoben werden (Bertolotti *et al.*, 2000; Oikawa *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2002a). Die Aktivierung dieser Rezeptoren über Autophosphorylierung oder proteolytische Spaltung setzt eine UPR-Signalkaskade in Gang, welche die Expression von Genen für die ER-Stressantwort induziert. Kann dieser Zustand nicht innerhalb einer gewissen Zeit revidiert werden, leitet die Zelle als letzte Lösung die Apoptose ein (Kim *et al.*, 2006; Zhang und Kaufman, 2004). Frühe Marker einer UPR-Aktivierung bilden hierbei die durch Ire1 gespleißte mRNA von *XBPI* (*XBPI*-sp1) sowie die über ATF4 induzierte mRNA des proapoptotischen Transkriptionsfaktors *CHOP* (Calfon *et al.*, 2002; Harding *et al.*, 2000; Malhi und Kaufman, 2010; Schröder und Kaufman, 2005). Spätere Vertreter in Form von Proteinen sind typische, molekulare Chaperone, zu denen unter anderem Grp170 und Grp94 zählen (Eletto *et al.*, 2010; Lee, 2001; Wang *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 1998).

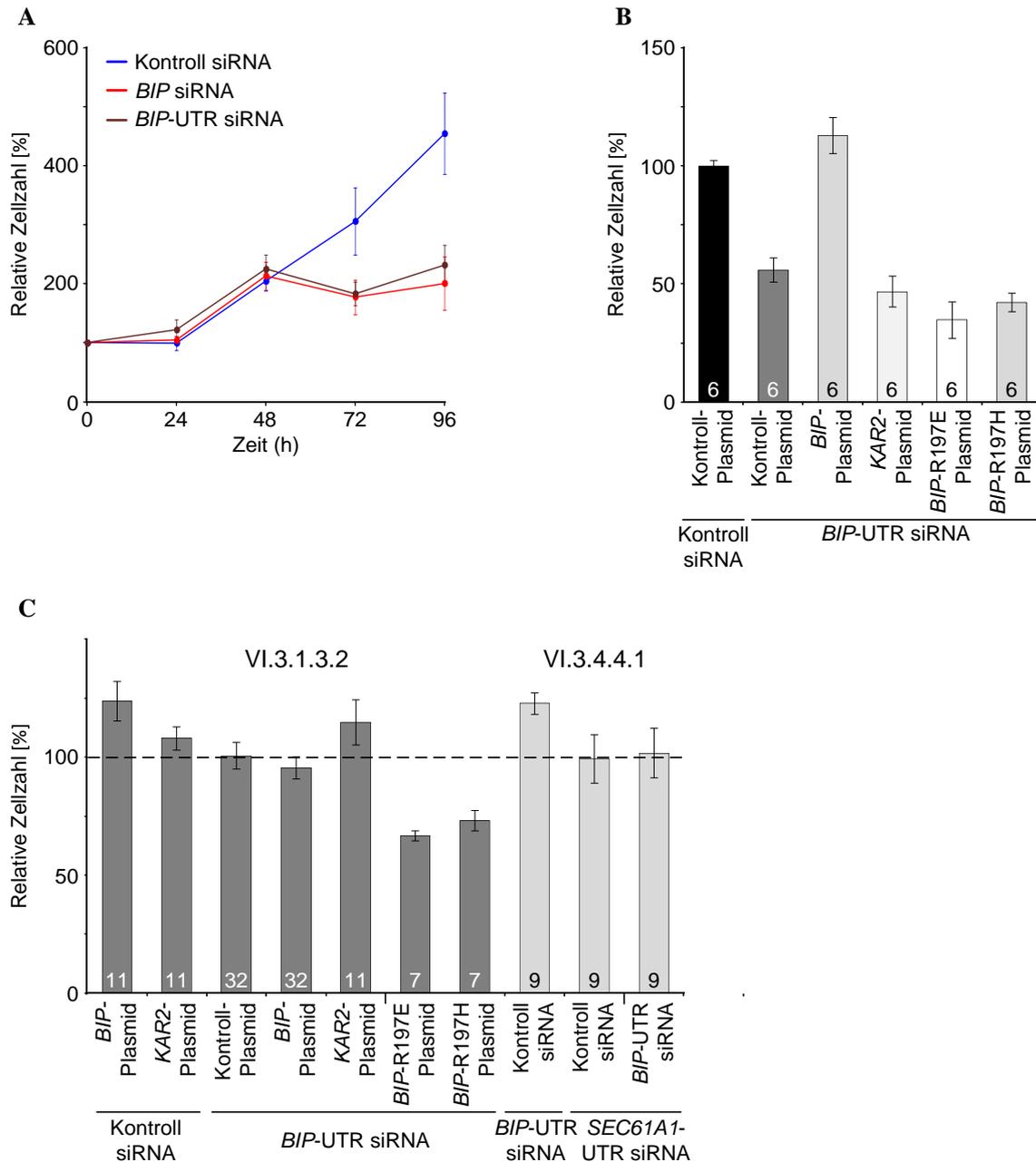


Abbildung 49: Einfluss der BiP-Manipulation im Zeitraum von 24-96 h auf die Zellproliferation. A) 6×10^5 HeLa-Zellen wurden wie unter Punkt VI.3.1.1 mit 35 nM Kontroll, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert (V.2.4.6.1) und für 24-96 h kultiviert. Zu jedem Zeitpunkt (24, 48, 72 und 96 h) wurden die Zellen geerntet und mittels „Countess® Automated Cell Counter“ (V.2.4.3.2) ausgezählt (Anzahl biologischer Replikate: $n_{24\text{ h}} = 6$, $n_{48\text{ h}} = 26$; $n_{72\text{ h}} = 6$; $n_{96\text{ h}} = 9-11$). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zellzahlen (%) der jeweiligen Ansätze im Vergleich zur Zellzahl zum Zeitpunkt des Aussäens t_0 (= 100 %). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. B) Relative Zellzahl der in Abbildung 48 dargestellten Rettungsansätze nach 96 h BiP-Depletion und 120 h Plasmid-Expression. Die Zellen wurden geerntet und mittels „Countess® Automated Cell Counter“ (V.2.4.3.2) 3-fach ausgezählt (biologische Replikate = 2). Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zellzahlen (%) im Vergleich zum Mittelwert der Zellzahl der Kontroll siRNA transfizierten HeLa-Zellen (= 100 %). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl der Zellzählungen ist am unteren Ende der Balken angegeben. C) Relative Zellzahl aller unter VI.3.1.3.2 und VI.3.4.4.1 gezeigten Transfektionsansätze nach 48 h BiP-Manipulation. Die Zellen wurden geerntet und mittels „Countess® Automated Cell Counter“ (V.2.4.3.2) ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Zellzahlen (%) im Vergleich zum Mittelwert der jeweiligen Kontroll-Zellen (= 100 %; nicht gezeigt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl ausgezählter Zellkulturschalen (biologische Replikate) ist am unteren Ende der Balken angegeben.

Durch eine Reduktion des zellulären BiP-Gehaltes sinkt die Verfügbarkeit von BiP für die UPR-Mediatoren Ire1, ATF6 und PERK, was letztlich zu einer artifiziellen UPR-Induktion führen kann (Cappel, 2011; Suzuki *et al.*, 2007). Derartige Auswirkungen waren bereits in Abbildung 44, C anhand der verstärkten Synthese von Grp94 und Grp170 (ca. 200 %) nach 48 h *BIP* siRNA-Behandlungen zu sehen.

Um den Einfluss der BiP-Manipulation auf die UPR-Aktivierung genauer zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Hilfe einer quantitativen „real-time“ PCR (qRT-PCR) analysiert, welche freundlicherweise durch Johannes Linxweiler durchgeführt wurde (persönliche Mitteilung). Hierzu wurden HeLa-Zellen des zuvor beschriebenen Rettungsansatzes über 96 h (VI.3.2.1) eingesetzt. Diese Zellen schienen als geeignet, da sie zum Einen einer maximalen BiP-Depletionsdauer unterzogen wurden und bereits eindeutige Auswirkungen auf die Zellproliferation zeigten (Abbildung 48, Abbildung 49, B) und zum anderen die Ansätze alle relevanten Plasmid-Transfektionen für eine potentielle Rettung enthielten.

Zur Quantifizierung der zellulären mRNA wurde diese aus den genannten Zellen isoliert und jeweils die *XBP*-sp1- sowie die *CHOP*-mRNA mit Hilfe geeigneter Oligo-dT-Primer revers transkribiert. Von den resultierenden cDNAs wurde eine qRT-PCR durchgeführt und die erhaltene DNA-Konzentration nach Normierung durch die mitgeführte Ladekontrolle GAPDH jeweils mit der entsprechenden DNA-Konzentration der Kontroll-Zellen (Kontroll-siRNA + Kontroll-Plasmid) verglichen. Die relative mRNA-Expression BiP-depletierter HeLa-Zellen wies dabei einen Anstieg von *XBP*-sp1 auf 400 % bzw. von *CHOP* auf 600 % auf, was somit auf eine Aktivierung der UPR hindeutet (Abbildung 50, A). In Übereinstimmung mit der Wiederherstellung des Proteingehaltes (Abbildung 48) sowie der Zellproliferation (Abbildung 49, B) zeigten die HeLa-Zellen nach endogener BiP-Depletion in Anwesenheit des *BIP*-Plasmids eine nahezu vollständige Reduktion von *XBP*-sp1 sowie *CHOP* und somit eine Unterdrückung der UPR-Reaktion, was die Funktionalität der cDNA und die Spezifität der *BIP*-UTR siRNA bestätigt (Abbildung 50, A). Das Kar2-Protein sowie die beiden Mutanten BiP-R197E und -R197H hingegen waren passend zu den Ergebnissen der Zellproliferationsanalysen (Abbildung 49, B) nicht in der Lage die UPR-Induktion zu unterdrücken. Zudem wurde in Korrelation mit der verstärkten Reduktion der Zellzahl der *BIP*-R197E/H-Plasmid-transfizierten Zellen eine weitere Steigerung der Konzentration der *XBP*-sp1-mRNA auf etwa 600 % sowie der *CHOP*-mRNA auf etwa 900 % festgestellt (Abbildung 50, A). Sowohl hinsichtlich der Zellproliferation als auch der UPR-Induktion zeigte die Mutante BiP-R197E, welche einen Aminosäureaustausch von einem positiv zu einem negativ geladenen Rest erfuhr, jeweils einen leicht ausgeprägteren Effekt als das Pendant mit dem Histidin-Austausch. Somit kann festgehalten werden, dass bereits nach 48 h BiP-Depletion eine UPR-Aktivierung (Abbildung 44, C) erfolgt, welche jedoch durch gleichzeitige Expression der *BIP*-cDNA unterdrückt wird. Sowohl die cDNA von *KAR2* als auch die der Mutanten *BIP*-R197E und -R197H sind dazu nicht in der Lage.

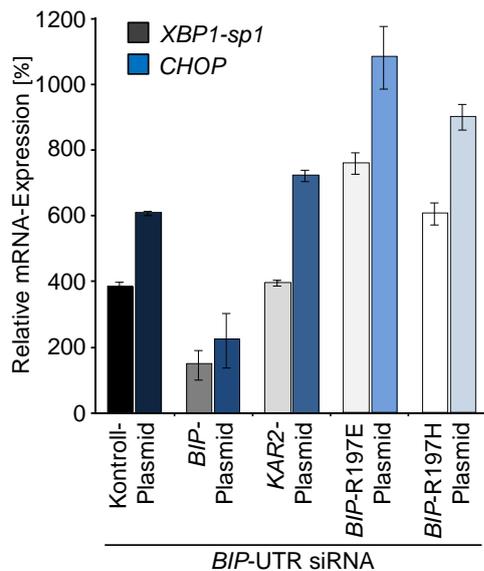


Abbildung 50: Untersuchung BiP-depletierter HeLa-Zellen hinsichtlich einer UPR-Aktivierung. **A)** Quantitative „real-time“ PCR-Analyse der in Abbildung 48, B beschriebenen *BIP*-Rettungs-Ansätze mit 96 h *BIP*-UTR siRNA-Transfektion und 120 h Plasmidtransfektion (*BIP*, *KAR2*, *BIP*-R197E/H). Die Zellen wurden nach der Ernte und der Auszählung pelletiert und die mRNA mittels NucleoSpin RNA II Kit isoliert. Anschließend erfolgte eine reverse Transkription mittels SuperScript II und Oligo-dT Primer und eine quantitative „real-time“ PCR jeweils für die mRNA von *XBP1-sp1* sowie *CHOP* mit Hilfe des TaqMan® Gene Expression Kits. Die Δ ct-Werte und die daraus abgeleitete relative mRNA-Expression wurde durch Normierung mit Hilfe des Standards GAPDH ermittelt und jeweils ins Verhältnis zum Kontroll-siRNA + Kontroll-Plasmid-Ansatz gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der einzelnen Messungen (n = 3). Jede Probe beinhaltet wiederum eine Mischung aus zwei biologischen Replikaten.

VI.3.3. *In vitro* Proteintransport in das ER BiP-depletierter Säugetierzellen

Analog zur Untersuchung der Sec61 α -Expressionsmanipulation (VI.2.3) wurde nach Analyse der Phänotypen infolge der *BIP* siRNA-Transfektion eine *in vitro* Proteintranslokation in semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) durchgeführt, um den Einfluss der siRNA-vermittelten BiP-Reduktion auf die Translokationseffizienz präsekretorischer Proteine ins ER zu überprüfen. Der Literatur zu Folge kommen dem molekularen Chaperon BiP/Kar2 bedeutende Aufgaben während der post- sowie der cotranslationalen Proteintranslokation ins ER eukaryotischer Zellen zu (Awe *et al.*, 2008; Boisramé *et al.*, 1998; Brodsky *et al.*, 1995; Lyman und Schekman, 1995; Matlack *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001). Untersuchungen von HeLa-Zellen nach BiP-Degradation durch das effiziente, BiP-spezifische Subtilase AB5-Toxin (Hu *et al.*, 2009; Paton *et al.*, 2004) zeigen zudem, dass BiP in Säugetierzellen einen Substrat-abhängigen Einfluss auf den ER-Import ausübt (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse erklären wiederum die Beobachtung, dass Präprolaktin, das in den Subtilase AB5-behandelten Zellen keine Beeinträchtigung der Translokationseffizienz erfuhr, auch in Proteoliposomen importiert wird, die lediglich den heterotrimeren Sec61-Kernkomplex sowie den SRP-Rezeptor enthalten (Görlich und Rapoport, 1993; Lang, 2012). Basierend auf diesen Daten wurde der Transport verschiedener Proteinvorläufer ins ER von HeLa-Zellen untersucht, deren *BIP*-

Expression zuvor mittels siRNA- oder Plasmid-Transfektion manipuliert wurde. Als Modellsubstrate wurden der als stark BiP-abhängig beschriebene Vorläufer des Hsp40 Cochaperons ERj3 (Bies *et al.*, 2004; Vembar *et al.*, 2009) sowie das bereits zuvor eingesetzte Präprolaktin (ppl) verwendet (Lang, 2012). Als Ausgangspunkt dienten die unter Punkt VI.3.1.1 beschriebenen HeLa-Zellen, die für 48 h entweder mit Kontroll-, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA behandelt wurden oder in Form eines Rettungsexperimentes (VI.3.1.3.2) 8 h nach siRNA-Zugabe zusätzlich mit Kontroll- bzw. *BIP*-Plasmid transfiziert wurden. Die Menge an BiP-Protein wurde dabei auf 30-40 % (Abbildung 44, Abbildung 47, A, B) reduziert. Die Zellen wurden nach Inkubation mittels Digitonin-Behandlung semi-permeabilisiert (V.2.4.5) und die mRNA von ppl bzw. ERj3 in einem cotranslationalen *in vitro* Transportansatz (V.2.3.3.1) in Anwesenheit der verschiedenen SPZ translatiert. Im Anschluss wurde eine Sequestrierung (V.2.3.3.3) durchgeführt. Die Translokationseffizienz der radioaktiv-markierten Proteine wurde durch Quantifizierung der zusätzlich in Anwesenheit von ER-Membranen in Erscheinung tretenden Proteinbanden unterhalb (Signalsequenz-Abspaltung: Verringerung des Molekulargewichtes) oder oberhalb (N-Glykosylierung: Erhöhung des Molekulargewichtes; im Fall von ERj3) des Vorläufers in Relation zur Gesamtproteinmenge der jeweiligen Gelspur berechnet. Die Sequestrierung diente der Verifizierung der Translokation der modifizierten Proteine. Die Kontroll-Zellen (Kontroll siRNA oder Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid) wiesen eine Prozessierungseffizienz von 29 % bzw. 32 % auf (da ERj3 sowohl eine abspaltbare Signalsequenz als auch eine Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung besitzt, wurde stets die Summe der Signalintensitäten beider Gelbereiche ober- und unterhalb des Vorläufers in die Quantifizierung mit einbezogen), welche ausschließlich durch die glykosylierte ERj3-Form repräsentiert wurde und generell eine hohe Proteaseresistenz aufwies (Abbildung 51, A, Spur 1, 2, 7 + 8). Wurden die Zellen zuvor mit *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA (in An- oder Abwesenheit von Kontroll-Plasmid) transfiziert, wurde entgegen einer erwarteten Translokationsdefizienz eine deutliche Steigerung der Prozessierung auf 49-56 % beobachtet, die darüber hinaus einen Anteil von gespaltenem, unglykosyliertem ERj3-Protein aufwies (ca. 30 %). Beide Varianten waren vollständig gegenüber einer proteolytischen Degradation resistent und wurden somit auch importiert (Abbildung 51, A, Spur 3-6, 9 + 10). Letztlich wurde der Effekt durch Expression der *BIP*-cDNA wieder aufgehoben, was sich einerseits in einer reduzierten Prozessierung (35 %) sowie dem Verschwinden der unglykosylierten ERj3-Form einstellte (Abbildung 51, A, Spur 11 + 12; $n_{ERj3} = 7-9$ biologische Replikate). Ein analoger Aufbau mit ppl als Transportsubstrat zeigte zwar eine ähnliche Tendenz, jedoch weitaus weniger stark ausgeprägt. In den Kontrollen wurde ppl mit einer Effizienz von 22-24 % zum reifen Prolaktin (pl) gespalten und war gegenüber der Proteinase K-Behandlung weitgehend geschützt. Die Depletion des BiP-Proteins führte zu einem Anstieg der Prozessierungseffizienz (29-36 %), was ebenfalls durch simultane Expression des *BIP*-Plasmids wieder reduziert (24 %) wurde. Bis auf den Ansatz mit *BIP* siRNA waren die Unterschiede in der Prozessierung jedoch nicht signifikant (Abbildung 51, B, $n_{ppl} = 5-6$ biologische Replikate). Zur Überprüfung der eingesetzten Membranmengen erfolgte ein posttranslati-

Transport des Sec61-unabhängigen „tail-anchored“-Membranproteins Synaptobrevin 2 (Syb2) mit den genannten SPZ. Die Insertionseffizienz wurde als relative Glykosylierung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle unterhalb der Gelspuren angegeben. Diese Modifikation von Syb2 lag in allen Ansätzen, mit leichten Schwankungen von 10-20 %, im gleichen Bereich (Abbildung 51, C, $n_{\text{Syb2}} = 4$). Im Gegensatz zur BiP-Depletion durch eine Behandlung mit SubtilaseAB-Zytotoxin (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012), war die siRNA vermittelte BiP-Depletion demnach offenbar nicht in der Lage, den Proteinimport ins ER von SPZ zu inhibieren, was auf die unterschiedliche Depletionseffizienz zurückzuführen sein könnte.

Neben der routinemäßigen Überprüfung des BiP-Gehaltes mittels Western-Blot (V.2.1.4) wurde in einem Teil der manipulierten SPZ der obigen Transportexperimente zusätzlich der endogene ERj3-Gehalt analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die effiziente, siRNA-vermittelte BiP-Depletion mit oder ohne zusätzliche Kontroll-Plasmid-Transfektion (*BIP* siRNA = 28 %; *BIP*-UTR siRNA = 23 %; *BIP*-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid = 27 %) bereits nach 48 h zu einem drastischen Anstieg des endogenen ERj3-Gehaltes (300-500 % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle) führt. Dieser Effekt wurde bei gleichzeitiger Expression der *BIP*-cDNA (177 % ERj3-Gehalt) wieder partiell aufgehoben (Abbildung 51, D). Da die *ERJ3*-Expression durch die UPR induziert wird (Shen und Hendershot, 2005), welche wiederum durch BiP-Reduktion aktiviert wird (Abbildung 44, C, Abbildung 50) handelt es sich bei der gesteigerten Importrate der entsprechenden SPZ möglicherweise um einen sekundären Effekt, welcher durch den ER-Stress hervorgerufen wird.

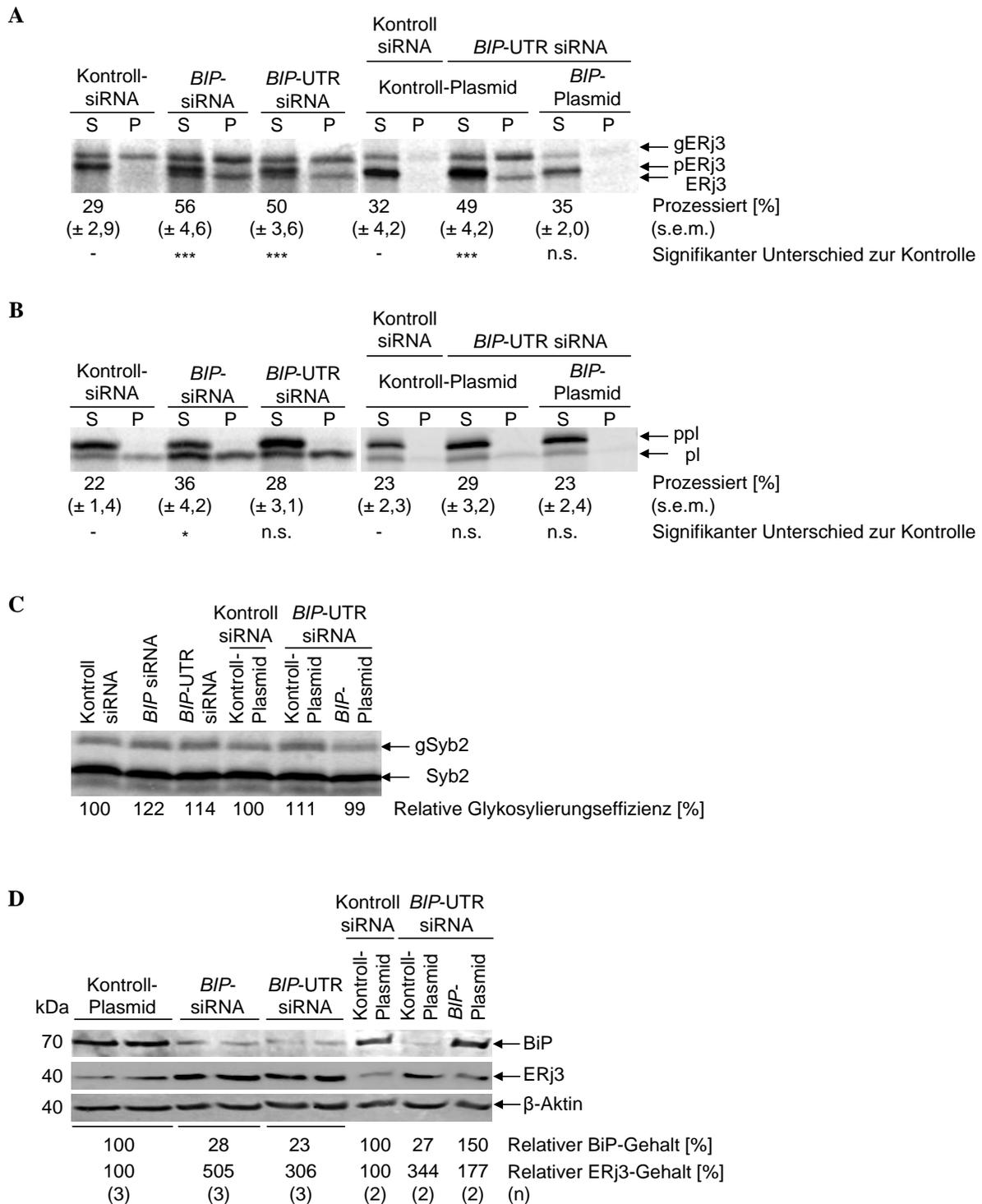


Abbildung 51: Einfluss der *BIP*-Manipulation auf den cotranslationalen Signalpeptid-abhängigen sowie den posttranslationalen „tail-anchored“-abhängigen *in vitro* Transport (V.2.3.3.1) in semi-permeabilisierte Zellen (SPZ). 6×10^5 HeLa-Zellen wurden jeweils in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und entweder mit Kontroll-, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA (35 nM) transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 8 h wurden die Zellen, wenn angezeigt, mit Kontroll- oder *BIP*-Plasmid transfiziert (V.2.4.6.2). 24 h nach der siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit siRNA nachtransfiziert. Nach insgesamt 48 h wurden die Zellen mit Digitonin semi-permeabilisiert (SPZ). Cotranslationaler Transport von **A**) ppl bzw. **B**) ERj3. Die jeweilige mRNA wurde im L416A-Retikulumlysat (Promega) in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin sowie 32 % SPZ einer der sechs verschiedenen Transfektionsansätze translatiert (V.2.3.3.1) und im Anschluss eine Sequestrierung (V.2.3.3.3) durchgeführt. Hierzu wurden die Ansätze zu je zwei Aliquots aufgeteilt und entweder mit Saccharose- (S) oder Proteinase K-Lösung (P) versetzt. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mM PMSF (in Ethanol) für 5 min auf Eis inhibiert. Anschließend wurden die Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel (ppl: 17,5 %; ERj3:

10 %) elektrophoretisch (V.2.1.1) aufgetrennt und die Proteine mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert. (p = prä, Signalsequenz, g = glykosyliert) Zur Angabe der Prozessierungseffizienz wurde jeweils unterhalb der Gelspuren (unter S) der Mittelwert des prozentualen Anteils des modifizierten Proteins (inklusive Standardfehler: s.e.m.) im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + prozessierte Form) angegeben ($n_{\text{ppI}} = 5-6$; $n_{\text{ERj3}} = 7-9$; je biologische Replikate) Um die jeweiligen Transporteffizienzen untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ bzw. $< 0,001$ wurden als signifikant definiert und durch 1 Stern (*) bzw. 3 Sterne (***) markiert. P-Werte $> 0,001$ wurden als nicht signifikant deklariert (n.s.). **C)** Posttranslatonaler Proteintransport von Syb2. Nach Translation der Syb2 mRNA im L416A-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin für 15 min bei 30 °C wurden Cycloheximid (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) sowie RNase A (80 ng/ μl) hinzugegeben und weitere 5 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 16 % SPZ einer der sechs verschiedenen *BIP*-Manipulationsansätze hinzugegeben und für weitere 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem 17,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (V.2.1.1) aufgetrennt und die Proteine mittels „phosphorimaging“ (V.2.1.6) detektiert und densitometrisch (V.2.1.7) analysiert. (g = glykosyliert) Unterhalb der Gelspuren wurde der prozentuale Anteil des glykosylierten Proteins im Vergleich zur Gesamtproteinmenge (Vorläufer + reife Form) und normiert auf den jeweiligen Kontrollansatz angegeben ($n_{\text{Syb2}} = 4$ jeweils biologische Replikate). **D)** Western-Blot zur Untersuchung des BiP- und ERj3-Gehalts in HeLa-Zellen nach siRNA-vermittelter BiP-Depletion (48 h) und Rettung mittels *BIP*-Plasmid (40 h). Ein Teil der in (A)-(C) verwendeten SPZ wurde nach Überprüfung des BiP-Gehaltes zusätzlich hinsichtlich einer sekundären Regulation des ERj3-Levels untersucht. Zur Detektion von ERj3 wurde ein Kaninchen-anti-ERj3-Antikörper (1:200, in 3 % Magermilch) sowie ein POD-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Zur Detektion von BiP wurde ein Kaninchen-anti-BiP-Antikörper (1:500, in 3 % Magermilch) in Kombination mit einem Cy5-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, das mit Hilfe eines Maus-anti- β -Aktin-Antikörpers (1:5.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) detektiert wurde. Zur Visualisierung der Cy-Antikörper wurde der Typhoon TrioTM Scanner und zur Dokumentation der ECL-Signale der Lumi Imager F1 verwendet. Die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 3×10^5 (kDa = Kilo-Dalton). Unterhalb der Gelspuren ist der Mittelwert der relativen ERj3-Synthese im Vergleich zum jeweils entsprechenden Kontroll-Ansatz angegeben. Darunter ist die Anzahl (n) der analysierten biologischen Replikate angezeigt.

VI.3.4. Einfluss der BiP-Depletion auf die Ca^{2+} -Homöostase des ER

Ein Hauptaugenmerk der vorangegangenen BiP-Modulationsansätze lag auf der Etablierung geeigneter Messbedingungen zur Untersuchung eines Einflusses auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER. Wie Fluoreszenzquenching-Experimente und Einzelkanalmessungen mit rauen Mikrosomen bzw. Proteoliposomen gezeigt haben hat BiP *in vitro* eine reprimierende Wirkung auf die Sec61-vermittelte Ionenpermeabilität über die ER-Membran (Alder *et al.*, 2005; Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003). Martin Jung konnte darüber hinaus mittels Peptidspot-Analysen eine Nukleotid-abhängige, und damit substratähnliche Interaktion von BiP mit einem Peptid korrespondierend zur Aminosäuresequenz der ER-luminalen Schleife 7 von Sec61 α nachweisen (Schäuble *et al.*, 2012). Im Folgenden wurden daher, in Analogie zu den Untersuchungen in Teil VI.1.2 und VI.2.4, zytosolische sowie ER-luminale Ca^{2+} -Änderungen nach Reduktion oder Rettung von BiP mittels Ca^{2+} -„imaging“ (V.2.6) analysiert.

VI.3.4.1. BiP-Reduktion verstärkt den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER

Zu Beginn der Untersuchungen wurde zunächst der allgemeine Einfluss einer BiP-Depletion auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER ermittelt. Hierzu wurden die in der BiP-Depletionskinetik (Kontroll, *BIP* bzw. *BIP*-UTR siRNA-Transfektion) charakterisierten HeLa-Zellen nach Kultivierung für die entsprechende Dauer von 24-96 h mit Fura-2 AM beladen und in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. Im Gegensatz zu den bisherigen Ca^{2+} -Messungen erfolgte keine Präinkubation mit weiteren Substanzen, sondern nur die direkte Applikation von 1 μM Thapsigargin (TG) nach 1 min Messdauer. Anschließend wurde die Ca^{2+} -Messung für 11,5 min fortgesetzt.

Bereits nach 24 h Behandlung mit einer der beiden *BIP* siRNAs wiesen die HeLa-Zellen infolge der TG-Zugabe gleichermaßen einen leichten, jedoch signifikant verstärkten Ca^{2+} -Ausstrom (von ca. 325 nM auf ca. 400-450 nM) aus dem ER auf (Abbildung 52, A, C). Zu diesem Zeitpunkt war der BiP-Level auf ca. 60 % reduziert (Abbildung 44). In Korrelation mit dem weitaus höheren und annähernd maximalen Reduktionsgrad nach 48 h (ca. 30 % Restprotein, Abbildung 44), wurde auch eine deutliche Steigerung des Ca^{2+} -Leckstroms infolge der BiP-Depletion gegenüber den Kontroll-Zellen beobachtet (von ca. 350 nM auf ca. 900 nM; Abbildung 52, B, C). Nach 72 h Inkubation wurde der Effekt, trotz einer geringfügigen Verbesserung des BiP-Depletionsgrades (25 % Restprotein, Abbildung 44) nochmals gesteigert (von ca. 450 nM auf ca. 1,1 μM ; Abbildung 52, C). Entgegen der Erwartung zeigte sich jedoch auch 96 h nach *BIP* siRNA-Transfektion ein weiterer Anstieg des Ca^{2+} -Ausstroms infolge der TG-Zugabe (von ca. 600 nM auf ca. 1,4-1,9 μM ; Abbildung 52, C), obwohl zu diesem Zeitpunkt die Depletionseffizienz bereits wieder rückläufig war (Abbildung 44). Als eine weitere nicht unwesentliche Beobachtung zeigte sich zudem ein stetiger Anstieg des Ca^{2+} -Leckstroms über den untersuchten Zeitraum von 24-96 h in den Kontroll-Zellen, der sich von ausgehend rund 325 nM insbesondere ab dem 72 h-Wert (450 nM) auf bis zu 600 nM bei 96 h Inkubation erhöhte (Abbildung 52, C). Diese allgemeine Zunahme könnte möglicherweise mit der Dichte des Zellrasen bzw. der Wachstumsphase der Zellen zusammenhängen. Wird mit diese Tatsache zugrundeliegend nun der Anstieg des Ca^{2+} -Ausstroms nach BiP-Depletion als relativer Wert im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Zellen errechnet, so steigt dieser Wert bei Vergleich der Effekte nach 48 h und 96 h nur von ca. 250 % auf ca. 280 %.

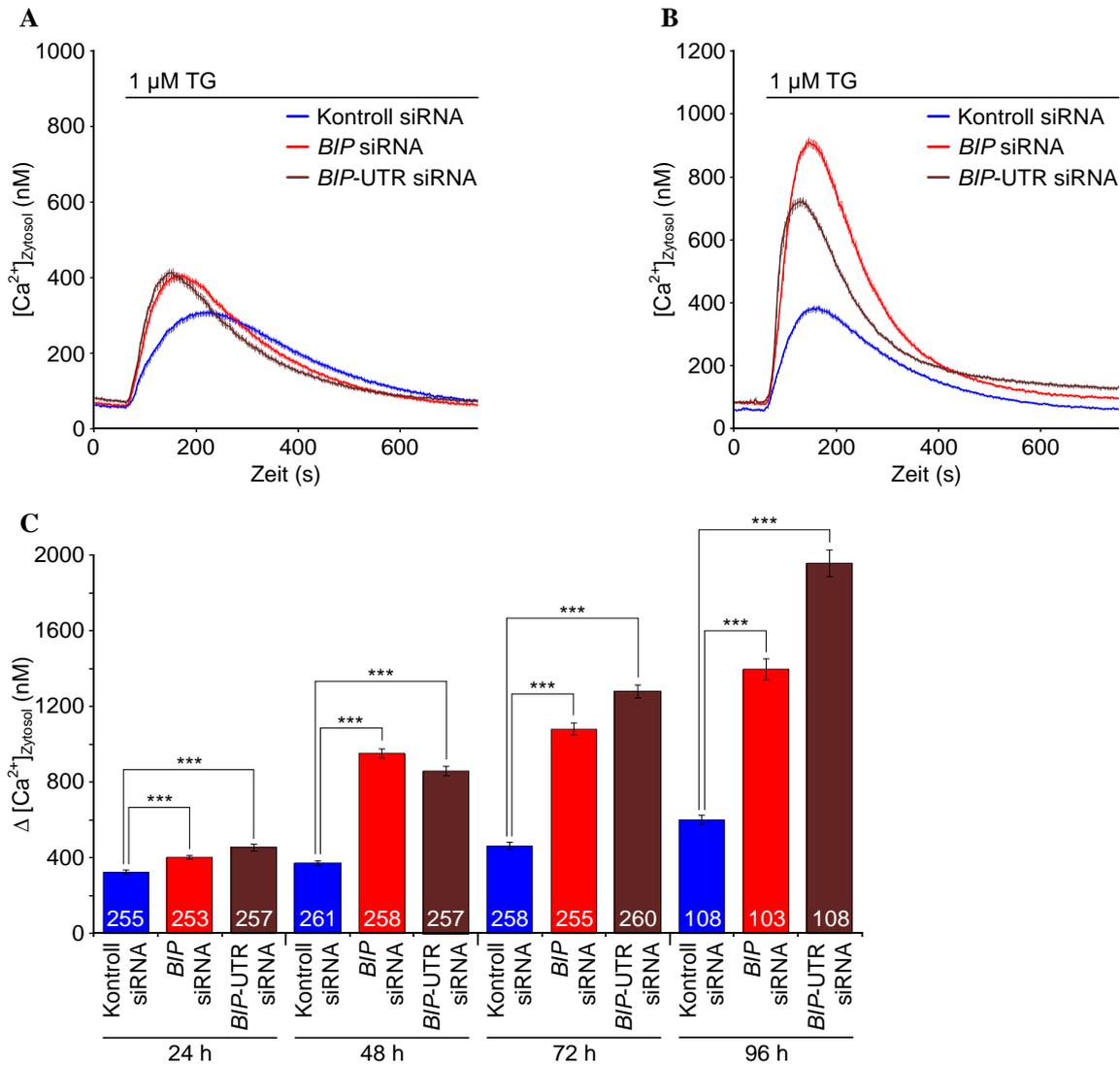


Abbildung 52: Messung zytosolischer Ca²⁺-Änderungen in HeLa-Zellen zur Untersuchung des Einflusses der siRNA-vermittelten BiP-Depletion (24-96 h) auf den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelten Deckgläsern (25 mm) ausgesät und wie unter Punkt VI.3.1.1 beschrieben mit Kontroll, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert und für jeweils 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen, das Deckglas in die Messkammer eingespannt und zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. Nach 1 min Messdauer wurde 1 μM Thapsigargin (TG) verabreicht und für weitere 11,5 min gemessen. Die Diagramme zeigen die zytosolische Ca²⁺-Konzentration über die Zeit und die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler der Messungen von Zellen nach **A**) 24 h oder **B**) 48 h siRNA-Transfektion dar. **C**) Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG der in (A) und (B) dargestellten Experimente sowie analoger Messungen nach 72 h und 96 h siRNA-Behandlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Experimente wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert. Für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h wurden je 5 unabhängige Messungen durchgeführt. Im Fall des 96 h-Wertes wurden 2 Messungen durchgeführt. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.3.4.2. Prolongierte BiP-Reduktion erhöht die ER-Ca²⁺-Konzentration

Da die Erfahrung gezeigt hat, dass eine verlängerte Depletionsdauer von ER-Proteinen wie Sec61 α globale, zelluläre Auswirkungen zur Folge hat, wie die Veränderung des Gehaltes an freiem Ca²⁺ (Abbildung 39) sowie eine reduzierte Zellproliferation (Abbildung 49, A, B) oder die Aktivierung der UPR (Abbildung 50), sollte die siRNA-Behandlung zeitlich so gering wie möglich gehalten werden, um Sekundäreffekte und deren Einfluss auf einen primären Phänotyp zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde, wie bereits schon unter Punkt VI.2.4.1, der relative Ca²⁺-Gehalt der zuvor untersuchten, manipulierten HeLa-Zellen (VI.3.4.2) bestimmt. Die HeLa-Zellen wurden zu jedem Zeitpunkt (24-96 h) mit Fura-2 AM beladen, in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert und nach einer Messdauer von 1 min anstelle von TG mit 5 μ M Ionomycin behandelt und die Messung für weitere 6,5 min fortgesetzt. Im Gegensatz zu den Ansätzen nach 24 und 48 h Inkubation, welche bis auf eine geringe, aber signifikante Erniedrigung des Ca²⁺-Gehaltes nach 24 h *BIP* siRNA-Behandlung, keinen Unterschied untereinander zeigten (24 h: ca. Ratio 1.000; 24 h: ca. Ratio 1.300), wiesen die Zellen nach 72 sowie 96 h BiP-Depletion durchweg eine signifikante Erhöhung des zellulären Ca²⁺-Gehalts im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Zellen auf (von ca. Ratio 1300 auf 1800; Abbildung 53).

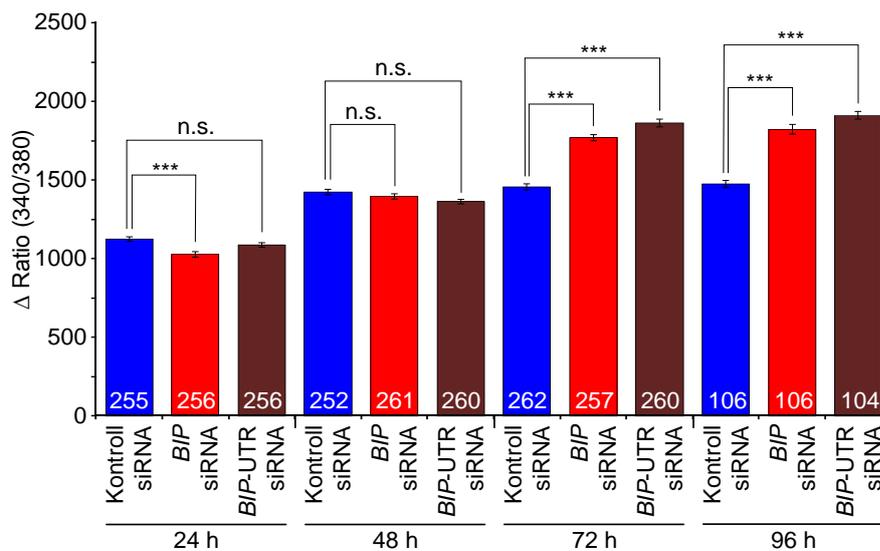


Abbildung 53: Messung der Ratio-Änderung (340/380) nach Zugabe von Ionomycin zur Untersuchung des Einflusses der siRNA-vermittelten BiP-Depletion (24-96 h) auf die zelluläre Gesamtmenge an freiem Ca²⁺. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelten Deckgläsern (25 mm) ausgesät und wie unter Punkt VI.3.1.1. mit Kontroll, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert sowie für 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 3,5 μ M Fura-2 AM in DMEM beladen, das Deckglas in die Messkammer eingespannt und zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in Ca²⁺-freiem Puffer inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. Nach 1 min Messdauer wurde 1 μ M Thapsigargin (TG) appliziert und für weitere 11,5 min gemessen. Das Diagramm zeigt die statistische Auswertung der Ratio-Änderung (340/380) nach Zugabe von Ionomycin der Messungen nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h siRNA-Behandlung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Experimente wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant (n.s.) deklariert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert. Für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h wurden jeweils 5 unabhängige Messungen durchgeführt. Im Fall des 96 h-Wertes wurden 2 Messungen durchgeführt. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

Demzufolge kann angenommen werden, dass die zusätzliche Steigerung des Ca^{2+} -Leckstroms zu den späteren BiP-Depletionszeitpunkten mitunter die Folge einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im ER darstellt. Da jedoch keine Veränderung nach 48 h zu beobachten war, der Effekt auf den Ca^{2+} -Leckstrom hierbei aber sehr stark ausgeprägt war, zeigen diese Daten, dass das BiP-Protein grundsätzlich dazu beiträgt den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER zu reduzieren. Aufgrund der obigen Beobachtung wurde für alle Folgeexperimente stets eine maximale siRNA-Transfektionsdauer von 48 h gewählt.

VI.3.4.3. BiP-Depletion fördert die Abnahme von ER-luminalem Ca^{2+} nach SERCA-Inhibition

Zur Verifizierung der Ergebnisse unter Punkt VI.3.4.1 wurde analog zu den Versuchen in Teil VI.1.2.1 eine direkte Messung ER-luminaler Ca^{2+} -Änderungen vorgenommen. Hierzu wurden die bereits zuvor beschriebenen HeLa-CES2-Zellen verwendet, welche für 48 h mit Kontroll-, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert wurden (VI.3.1.2). Der BiP-Gehalt lag dabei wie bereits gezeigt bei 30 % und damit im gleichen Bereich wie in den HeLa-Zellen für die zytosolischen Ca^{2+} -Messungen nach 48 h. Zudem hatte diese Manipulation wie bereits gezeigt keine Auswirkungen auf den Carboxylesterase-Gehalt der Zellen (Abbildung 45).

Die Zellen wurden nach der Kultivierung mit Fluo-5N AM beladen und anschließend in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. 1 min nach Messbeginn wurde 1 μM Thapsigargin (TG) appliziert und die Messung für 9 min fortgesetzt. Danach erfolgte die Zugabe von 5 μM Ionomycin. Unter diesen Bedingungen führte die BiP-Depletion mit beiden siRNAs ebenfalls nach TG-Applikation zu einer verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (Abbildung 54, A). Die statistische Auswertung durch Berechnung von $\tau_{1/2}$ (Zeitpunkt bei 50 % relativer Fluoreszenzreduktion) wies einen signifikanten Unterschied der BiP-Depletionsansätze (ca. 100 s) zur Kontrolle (330 s) auf (Abbildung 54, B).

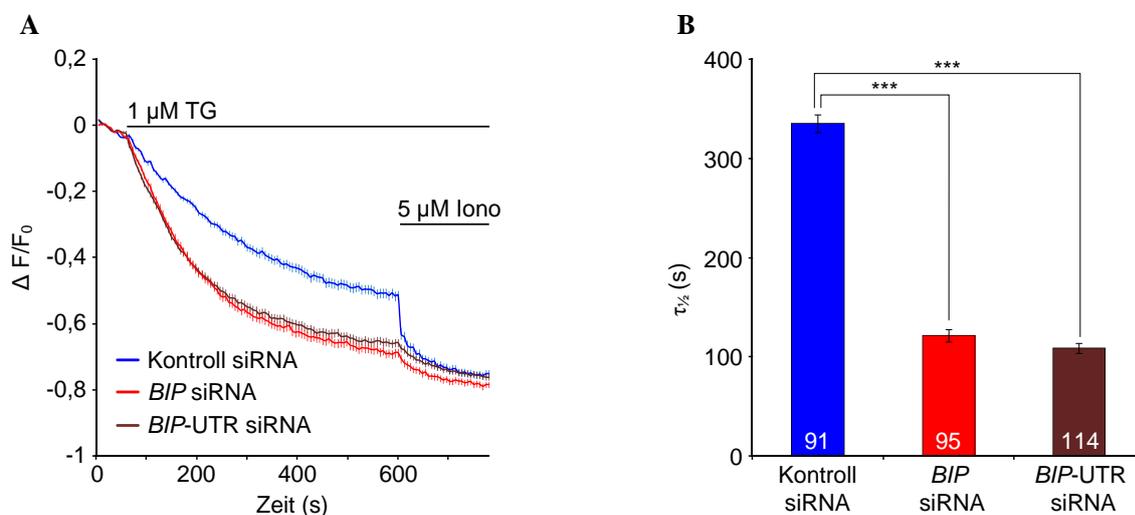


Abbildung 54: Messung von ER-luminalen Ca^{2+} -Änderungen nach Depletion von BiP (48 h) und Zugabe von Thapsigargin (TG) und Ionomycin (Iono) zur Bestimmung des passiven Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER. **A)** HeLa-CES2-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelten Glasplättchen (25 mm) ausgesät und entweder mit Kontroll, *BIP* oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen nachtransfiziert und weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C (dunkel) mit 4 μM Fluo-5N AM (1 mM Stocklösung in Pluronic F-127) in HBSS beladenen und anschließend für weitere 30 min bei RT (dunkel) in HBSS inkubiert. Das Deckglas wurde anschließend in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen, in diesem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. 1 min nach Beginn der Messung wurde 1 μM TG appliziert und weitere 9 min gemessen. Danach wurde 5 μM Iono verabreicht und die Messung für 3 min fortgesetzt. Die y-Achse stellt die Mittelwerte der relativen Fluoreszenzabnahme ($\Delta F/F_0$) inklusive Standardfehler dar, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurden. (F = Fluoreszenzintensität) **B)** Statistische Analyse der Änderung der ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Thapsigargin und Ionomycin der in (A) dargestellten Experimente. Zum Vergleich der Datensätze wurde der Wert $\tau_{1/2}$ angegeben (Zeitpunkt nach TG-Zugabe bei 50 % Fluoreszenzabnahme). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte $< 0,001$ wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 10-25 einzelne Zellen analysiert; $n_{\text{Kontroll siRNA}} = 7$; $n_{\text{BIP siRNA}} = 8$; $n_{\text{BIP-UTR siRNA}} = 8$. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.3.4.4. Parallele Reduktion von BiP und Sec61 α

VI.3.4.4.1. BiP und Sec61 α können mittels siRNA simultan reduziert werden

In Analogie zu den unter Punkt VI.2.4.1 gezeigten Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der Sec61 α -Depletion auf den stimulierenden Effekt der CaM-Inhibition, wurde überprüft, ob der ebenfalls steigende Effekt der 48-stündigen BiP-Reduktion auf den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER auf eine Modulation der Sec61-Permeabilität zurückzuführen ist. Zwar wurde ein derartiger Mechanismus anhand von *in vitro* Untersuchungen postuliert (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002), allerdings fehlt bislang ein Nachweis dieses Zusammenhangs auf zellulärer Ebene. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen in Anlehnung an die Sec61 α - und BiP-Depletionsexperimente unter Punkt VI.2.1.1 und VI.3.1.1 mit beiden siRNAs gegen die jeweilige UTR-Region der *BIP*- sowie der *SEC61A1*-mRNA für 48 h behandelt, da für diesen Zeitpunkt in beiden Fällen eine effiziente Proteinreduktion (Abbildung 31, A, C; Abbildung 44), jedoch keine Auswirkungen auf den zellulären Gesamtgehalt an freiem Ca^{2+} zu beobachten waren (Abbildung 40, D; Abbildung 53). Hierfür wurden HeLa-Zellen entweder mit 55 nM Kontroll siRNA, einer Kombination aus Kontroll (20 nM) und *BIP*-UTR siRNA (35 nM), aus *SEC61A1*-UTR (20 nM) und *BIP*-UTR siRNA (35 nM) oder aus *SEC61A1*-UTR (20 nM) und *BIP*-UTR siRNA (35 nM) transfiziert und die Proteinlevel mittels Western-Blot (V.2.1.4) analysiert. Sowohl die alleinige Reduktion von BiP oder Sec61 α als auch die simultane Behandlung mit beiden siRNAs resultierte jeweils in einer erwarteten Abnahme der zu depletierenden Proteine auf 25-30 % im Vergleich zu Kontroll siRNA-transfizierten Zellen (Abbildung 55, A, B).

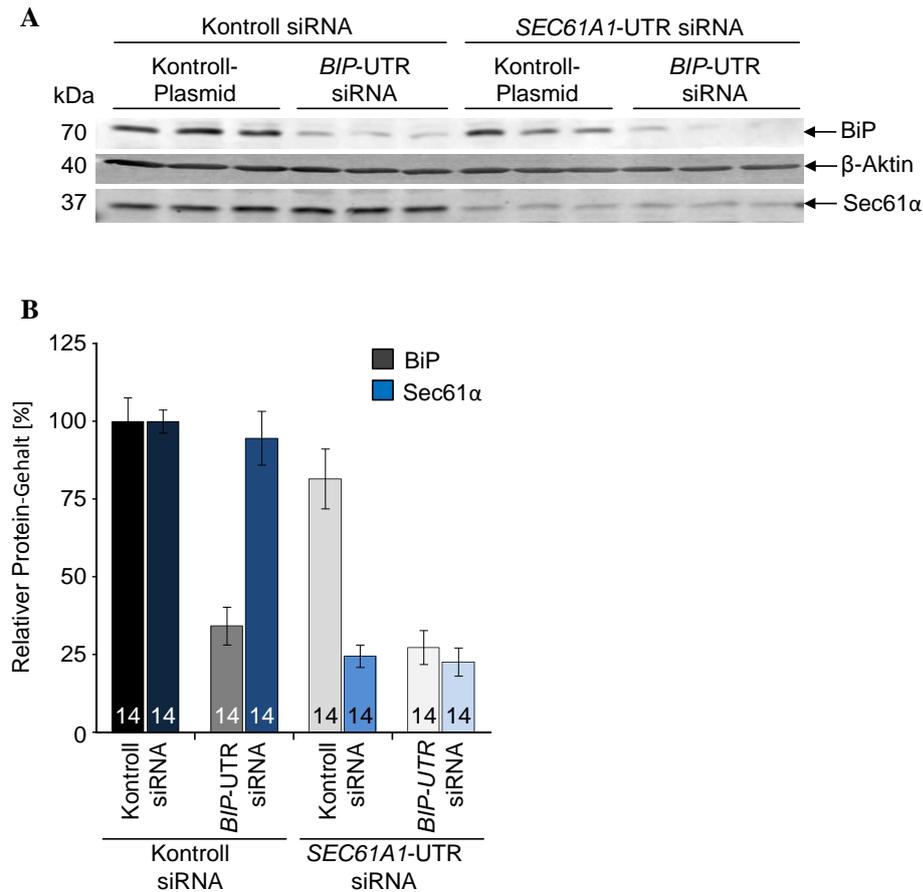


Abbildung 55: Western-Blot zur Untersuchung der simultanen Depletion von BiP und Sec61α für 48 h. **A)** 6×10^5 HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (mit 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 55 nM Kontroll siRNA oder einer Kombinationen aus Kontroll und *BIP*-UTR siRNA, Kontroll und *SEC61A1*-UTR siRNA sowie *BIP*-UTR und *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert (35 nM *BIP*-UTR siRNA oder 20 nM *SEC61A1*-UTR siRNA) (IV.2.4.6.1). Die Zellen wurden nach 24 h entsprechend ein zweites Mal transfiziert. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wurden die Zellen geerntet, gezählt (V.2.4.3) und lysiert. Die Ansätze wurden mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 56 °C erhitzt und mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend erfolgte eine Auftrennung mittels SDS-PAGE (V.2.1.1; 12,5 %iges PA-Gel) und der Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (V.2.1.4) sowie eine Analyse der Proteine mittels Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7). Die Detektion erfolgte mit einem Kaninchen-anti-BiP-Antikörper (1:500, in 3 % Magermilch) bzw. einem Kaninchen-anti-Sec61α-Antikörper (1:200, in 3 % Magermilch) sowie jeweils mit einem sekundären Cy5-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA). Die Ladekontrolle β-Aktin wurde mit einem Maus-anti-β-Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) detektiert. Die Visualisierung erfolgte mittels Typhoon TrioTM Scanner. Pro Gelspur wurde jeweils eine Zellzahl von 3×10^5 aufgetragen (M = Marker; kDa = Kilo-Dalton). **B)** Statistische Auswertung der in (A) dargestellten BiP-/Sec61α-Doppeldepletionssansätze. Die jeweiligen Antikörpersignale wurden durch das in der gleichen Spur bestimmte β-Aktin-Signal zur Normierung dividiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich auf den Mittelwert der Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht aufgrund der Mehrfachbestimmung einzelner Western-Blot-Proben der Anzahl technischer Replikate, welche jeweils 9 biologischen Replikaten entstammen. Zum Vergleich der Datensätze wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant definiert (n.s.).

VI.3.4.4.2. Die zusätzliche Depletion von Sec61 α inhibiert den durch BiP-Reduktion stimulierten Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER

Nachdem schon gezeigt wurde, dass die parallele Transfektion mit siRNA gegen *BIP* und *SEC61A1* eine effiziente Reduktion beider Proteine ermöglicht, wurden die Zellen auf eine Änderung des passiven Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER hin untersucht. Die manipulierten Zellen wurden nach dem gleichen Versuchsaufbau wie zuvor (VI.3.4.1) 1 min nach Inkubation in Ca²⁺-freiem Puffer mit 1 μ M Thapsigargin behandelt und die Messung für 11,5 min fortgesetzt. HeLa-Zellen, die für 48 h mit *BIP*-UTR siRNA sowie zusätzlich mit Kontroll siRNA transfiziert wurden wiesen hinsichtlich der Steigerung des Ca²⁺-Leckstroms keinen Unterschied zu den ausschließlich *BIP*-UTR siRNA-transfizierten Zellen auf (Abbildung 52, B, C; Abbildung 56, A, B). Erfolgte hingegen eine zusätzliche Reduktion von Sec61 α hatte dies einen starken inhibitorischen Einfluss auf den Phänotyp nach BiP-Depletion (Abbildung 56, A, B). Diesen Ergebnissen zufolge reduziert BiP den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER *in vivo* auf Ebene des Sec61-Komplexes.

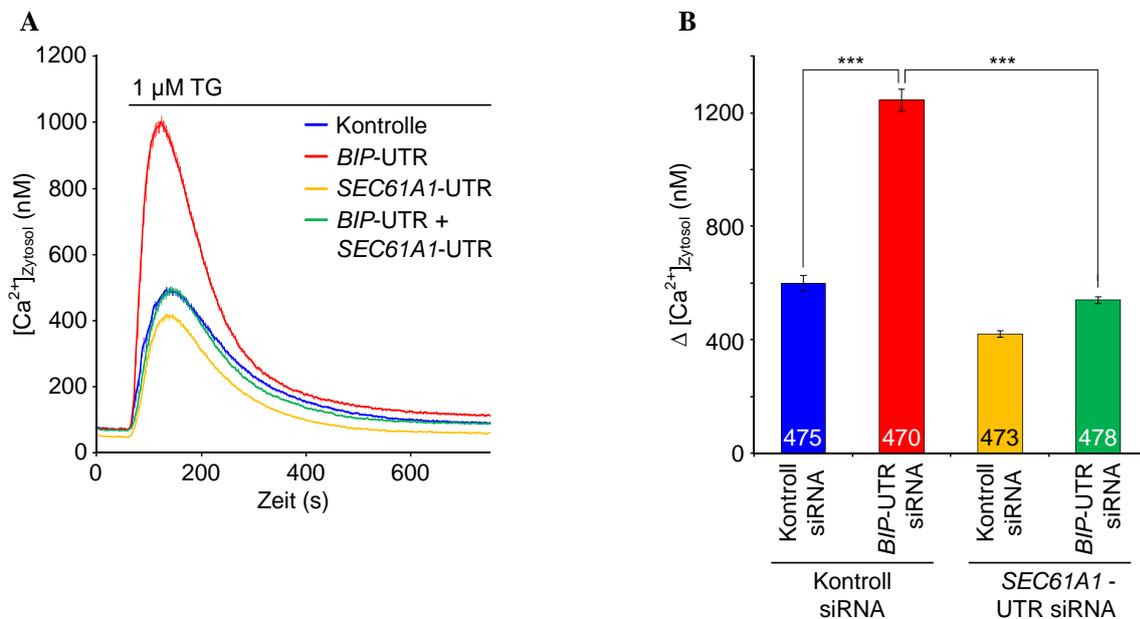


Abbildung 56: Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung in HeLa-Zellen nach simultaner Depletion von BiP und Sec61 α (48 h) sowie Zugabe von Thapsigargin zur Untersuchung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER. **A)** HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale auf einem Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckglas (25 mm) ausgesät und entweder mit 55 nM Kontroll siRNA oder einer der Kombinationen aus Kontroll und *BIP*-UTR siRNA, Kontroll und *SEC61A1*-UTR siRNA sowie *BIP*-UTR und *SEC61A1*-UTR siRNA transfiziert (35 nM *BIP*-UTR siRNA oder 20 nM *SEC61A1*-UTR siRNA) (IV.2.4.6.1). Die Zellen wurden nach 24 h entsprechend ein zweites Mal transfiziert und nach insgesamt 48 h Kultivierung mit 3,5 μ M Fura-2 AM in DMEM beladen. Das Deckglas wurde in die Messkammer eingespannt, zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen, in selbigem inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. Nach 1 min Messdauer wurde 1 μ M Thapsigargin (TG) hinzugegeben und für weitere 11,5 min gemessen. Das Diagramm zeigt die zytosolische Ca²⁺-Konzentration, welche gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler der Messungen dar. **B)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG der in (A) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. Um die jeweiligen Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. Es wurden jeweils 9 unabhängige Messung durchgeführt und stets 50-55 einzelne Zellen analysiert. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.3.4.5. Der erhöhte Ca^{2+} -Efflux aus dem ER nach endogener BiP-Depletion wird durch cDNA-Expression von *BIP*, jedoch weder durch *BIP*-Mutanten mit defekter Interaktionsdomäne für ERj-Proteine noch durch *KAR2* kompensiert

Um die vorangegangenen Schlussfolgerungen zu bestätigen und die Spezifität der siRNA-Behandlung zu verifizieren wurde weitergehend versucht den BiP-Depletionsphänotyp durch Expression der *BIP*-cDNA zu retten. Wie unter Punkt gezeigt, wird mit Hilfe des *BIP*-Plasmids in Gegenwart der *BIP*-UTR siRNA wieder eine mehr als ausreichende Proteinkonzentration hergestellt (Abbildung 47, A, B). Zudem ist diese BiP-Regeneration in der Lage die Inhibition der Zellproliferation sowie die Aktivierung der UPR nach 96 h BiP-Depletion aufzuheben (Abbildung 49, Abbildung 50). Entsprechende HeLa-Zellen, d.h. 48 h nach Transfektion mit Kontroll oder *BIP*-UTR siRNA sowie nach 40 h Behandlung mit Kontroll-, *BIP*-, *BIP*-R197E/H- oder *KAR2*-Plasmid wurden daher analog zu den vorherigen Ca^{2+} -„imaging“-Experimenten (VI.3.4) in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. 1 min nach Messbeginn wurde 1 μM Thapsigargin appliziert und die zytosolische Ca^{2+} -Änderung über 9 min beobachtet. Die zusätzliche Transfektion der HeLa-Zellen mit Kontroll-Plasmid hatte keinen Einfluss auf die durch BiP-Depletion bewirkte Steigerung des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER (Änderung von ca. 400 nM in Kontroll-Zellen auf ca. 750 nM in *BIP*-UTR siRNA-behandelten Zellen). Erfolgte jedoch parallel zur *BIP*-UTR siRNA-Behandlung eine Transfektion mit dem *BIP*-Plasmid, wurde der durch endogene BiP-Reduktion hervorgerufene Phänotyp wieder gerettet und somit das molekulare Ziel der *BIP*-UTR siRNA bestätigt. Die Thapsigargin-vermittelte Reaktion lag dabei im Bereich der Kontroll-Zellen und zeigte keine weitere Erniedrigung (Abbildung 57, A, B), was aufgrund der hemmenden Wirkung von BiP auf die Sec61-Permeabilität zu erwarten gewesen wäre, da der Rekonstitutionslevel des BiP-Proteins bei ca. 230 % lag (Abbildung 47, A, B). Die ca. 2,5-fache Überexpression der *BIP*-cDNA in Anwesenheit der Kontroll siRNA bewirkte demnach auch keine signifikante Veränderung des Ca^{2+} -Effluxes gegenüber der Kontrolle (Abbildung 57, A, B).

In vitro Daten mit rauen Hundepankreas-mikrosomen zufolge kann das Kar2-Protein aus der Hefe nicht die Funktion von BiP beim Schließen des Sec61-Komplexes übernehmen. Stattdessen weist es sogar einen dominant-negativen Effekt auf, da es die Permeabilität sogar in Anwesenheit von BiP erhöht (Alder *et al.*, 2005). Wurde die *KAR2*-cDNA nach Transfektion von *BIP*-UTR siRNA in HeLa-Zellen exprimiert, so wurde mit diesen Ergebnissen übereinstimmend keine Rettung des BiP-Depletionsphänotyps beobachtet. Wie im Ansatz mit paralleler Kontroll-Plasmid-Transfektion wiesen die Zellen einen gesteigerten Ca^{2+} -Ausstrom nach Thapsigargin-Zugabe auf (ca. 750 nM; Abbildung 57, A, B). Im Gegensatz zur Literatur wurde jedoch kein dominant-negativer Effekt des Kar2-Proteins nach Expression in Kontroll siRNA-behandelten Zellen beobachtet, da sich die Thapsigargin-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung ins Zytosol nicht von jener in Kontroll-Zellen unterschied (Abbildung 57, A, B). Offensichtlich ist der hemmende Effekt auf den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER BiP-spezifisch.

Um die Funktion von BiP bei der Modulation der Sec61-Permeabilität weiter zu charakterisieren, wurden die zwei etablierten BiP-Mutanten BiP-R197E und BiP-R197H für analoge Rettungsversuche eingesetzt. Beide Varianten werden als unfähig beschrieben mit der J-Domäne von Hsp40-Cochaperonen zu interagieren sowie eine verminderte Substratfreisetzungskapazität aufzuweisen. Die BiP-R197H-Mutante war darüber hinaus nicht in der Lage die Aufgabe des wildtypischen Proteins beim Verschließen der Translokationspore gegenüber Ionen zu kompensieren (Alder *et al.*, 2005; Awad *et al.*, 2008). Zur Untersuchung der Relevanz einer Interaktion mit einem ERj-Protein und der Transition von der hoch- zur niedrigaffinen Substratbindungskonformation wurde in Analogie zu Punkt VI.3.4.5 eine Expression der cDNA jeweils einer der beiden Mutanten in Gegenwart von *BIP*-UTR siRNA durchgeführt. Obwohl die Western-Blot-Analyse entsprechender Ansätze eine vergleichbar hohe Komplementationeffizienz der *BIP*-R197E bzw. -H-Expression zeigte (200-250 %) wie im Fall des Wildtyp-Vektors waren beide Proteine nach endogener BiP-Depletion nicht in der Lage die normale Stärke des Ca²⁺-Leckstroms wiederherzustellen. Stattdessen zeigten beide Varianten einen ähnlichen Effekt, wie im Fall einer ausschließlichen BiP-Reduktion (Abbildung 57, A, B). Diese Daten indizieren somit, dass es sich bei dem Effekt von BiP auf die Ca²⁺-Permeabilität des Sec61-Translokons um eine Chaperon-typische Substratinteraktion handelt und zudem die Mithilfe eines Hsp40-Cochaperons erforderlich ist.

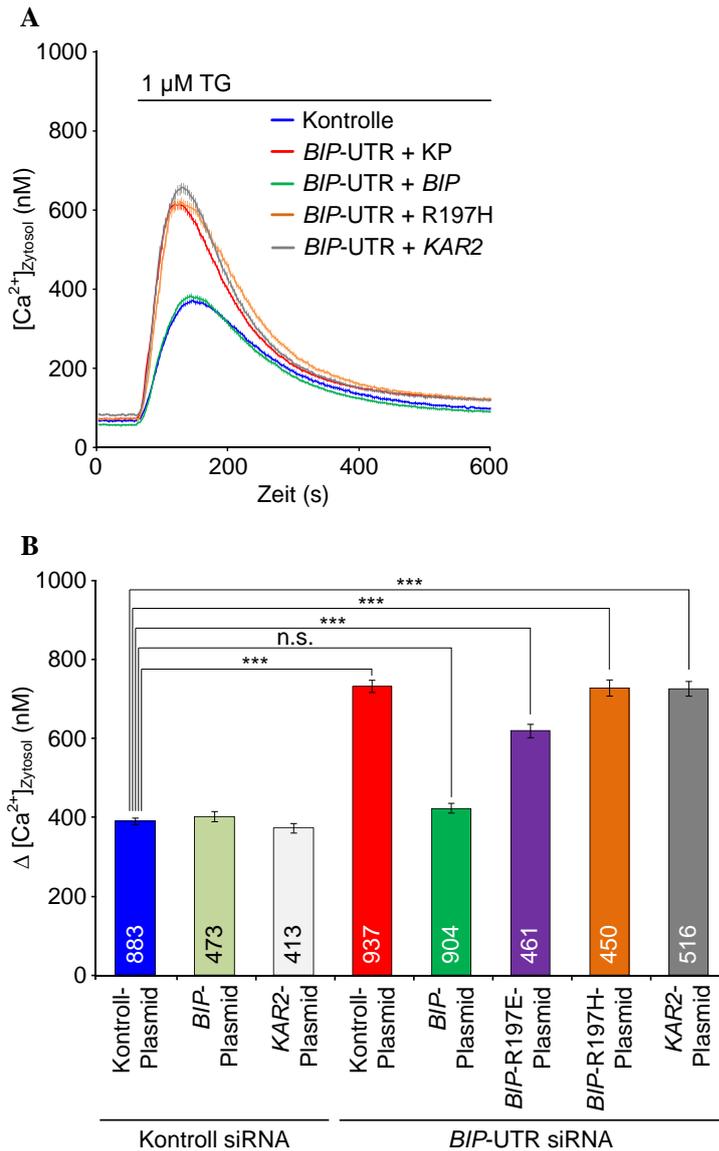


Abbildung 57: Messung der zytosolischen Ca²⁺-Änderung in HeLa-Zellen nach Depletion von BiP (48 h) und Rettung mittels *BIP*-, *BIP*-R197E-, *BIP*-R197H- bzw. *KAR2*-Plasmidexpression (40 h) sowie Behandlung mit Thapsigargin zur Untersuchung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER. **A)** HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) vorbehandelten Deckgläsern (25 mm) ausgesät und entweder mit 35 nM Kontroll oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert. Nach 8 h Kultivierung wurden die Zellen mit Kontroll-, *BIP*-, *BIP*-R197E-, *BIP*-R197H- oder *KAR2*-Plasmid transfiziert (V.2.4.6.2) und 24 h nach der siRNA-Transfektion entsprechend nachtransfiziert. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wurden die Zellen mit 3,5 µM Fura-2 AM in DMEM beladen (45 min, im Dunkeln), das Deckglas in die Messkammer eingespannt und zweimal mit Ca²⁺-freiem Puffer gewaschen. Nach Inkubation in diesem wurde die Kammer in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt und 1 min nach Beginn der Messung 1 µM Thapsigargin (TG) hinzugegeben sowie die Messung für 9 min fortgesetzt. Das Diagramm stellt die gemessene zytosolische Ca²⁺-Konzentration dar, welche gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Kurven zeigen den Mittelwert sowie den Standardfehler der Messungen (Kontrolle = Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid; *BIP*-UTR = *BIP*-UTR siRNA; KP = Kontroll-Plasmid; *BIP* = *BIP*-Plasmid; R197H = *BIP*-R197H-Plasmid; *KAR2* = *KAR2*-Plasmid). **B)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von TG aller durchgeführten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Um die Experimente untereinander zu vergleichen wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert, P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant (n.s.) deklariert. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert; n_{Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid} = 17; n_{Kontroll siRNA + *BIP*-Plasmid} = 9; n_{Kontroll siRNA + *KAR2*-Plasmid} = 8; n_{*BIP*-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid} = 18; n_{*BIP*-UTR siRNA + *BIP*-Plasmid} = 18; n_{*BIP*-UTR siRNA + *BIP*-R197E-Plasmid} = 9; n_{*BIP*-UTR siRNA + *BIP*-R197H-Plasmid} = 9; n_{*BIP*-UTR siRNA + *KAR2*-Plasmid} = 10. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.3.5. Überprüfung der zellulären Konzentration an freiem Ca^{2+} von HeLa-Zellen nach diversen Genexpressionsmanipulationen für 48 h

Als Kontrolle für alle zuvor beschriebenen Experimente zur Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase des ER nach diversen Expressionsmanipulationen wurde die Menge an freiem zellulärem Ca^{2+} dieser Zellen überprüft. Zwar wurde gezeigt, dass nach 48 h *BIP* siRNA-Behandlung keine Veränderung des Ca^{2+} -Haushaltes zu beobachten war, jedoch kann damit nicht ausgeschlossen werden, dass eine verstärkte Synthese von BiP für 48 h (ca. 200-300 %; Abbildung 47, A-C) möglicherweise eine derartige Veränderung zur Folge hat. Das BiP-Protein könnte als niedrigaffin Ca^{2+} -bindendes Protein des ER-Lumens (ca. 10 Ca^{2+} -Ionen pro BiP-Molekül) durchaus in der Lage sein nach einer Überexpression eine große Menge an ER-luminalem Ca^{2+} zu binden (Coe, 2009). Eine Veränderung der zellulären Ca^{2+} -Ladung wurde sogar in Studien nach Überexpression von BiP in HeLa-Zellen gezeigt (Lievremont *et al.*, 1997). Weiterhin könnte ebenso die simultane Reduktion von BiP und *Sec61 α* zu einer veränderten Ca^{2+} -Ladung führen. Daher wurden alle verwendeten Zelltypen unter VI.3.1.3.2 und VI.3.4.4.1 mittels Ca^{2+} -„imaging“ hinsichtlich ihrer Konzentration an freiem zellulärem Ca^{2+} analysiert. Die HeLa-Zellen wurden wie unter Punkt VI.3.4.3 mit Fura-2 AM beladen, in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und nach 1 min Messung mit 5 μM Ionomycin behandelt. Danach wurde für weitere 6,5 min gemessen. Alle Werte wurden als relative Ratio 340/380-Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle der Versuchsgruppe zusammen in einem Diagramm (als Mittelwert mit Standardfehler) angegeben (Kontrollen nicht gezeigt). Dabei zeigten alle Transfektionsansätze mit leichten Abweichungen von ca. 10 % eine zelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+} im Bereich der jeweiligen Kontrolle und somit keine Auswirkungen auf die genannten Bedingungen (Abbildung 58).

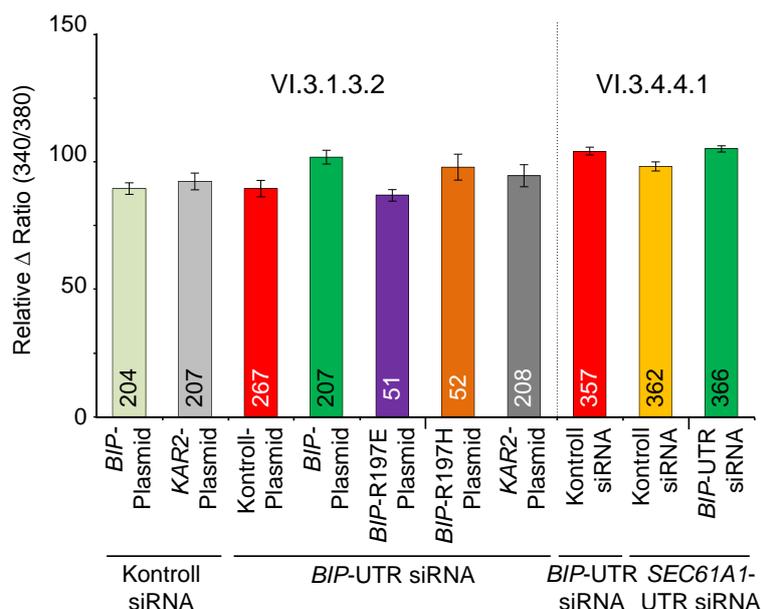


Abbildung 58: Messung der Ratio-Änderung (340/380) nach Zugabe von Ionomycin zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen BiP-Manipulationen für 48 h auf die zelluläre Gesamtmenge an freiem Ca^{2+} . HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelten Deckgläsern (25 mm) ausgesät und wie unter VI.3.1.3.2 bzw. VI.3.4.4.1 mit Kontroll oder *BIP*-UTR siRNA behandelt und nach weiteren 8 h mit *BIP*, *BIP*-R197E/H oder *KAR2*-Plasmid transfiziert. 24 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen ein zweites Mal mit siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen, das Deckglas in die Messkammer eingespannt und zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. Nach 1 min Messdauer wurde 5 μM Ionomycin appliziert und für weitere 6,5 min gemessen. Das Diagramm zeigt die statistische Auswertung der Ratio-Änderung (340/380) angegeben als relativer Wert im Vergleich zum jeweiligen Kontroll-Ansatz (Die beiden Versuchsgruppen aus VI.3.1.3.2 und VI.3.4.4.1 sind durch gepunktete Linien voneinander getrennt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Innerhalb einer Messung (n) wurden stets 50-55 einzelne Zellen analysiert; $n_{\text{Kontroll siRNA + Kontroll-Plasmid}} = 5$; $n_{\text{Kontroll siRNA + BIP-Plasmid}} = 4$; $n_{\text{Kontroll siRNA + KAR2-Plasmid}} = 4$; $n_{\text{BIP-UTR siRNA + Kontroll-Plasmid}} = 5$; $n_{\text{BIP-UTR siRNA + BIP-Plasmid}} = 4$; $n_{\text{BIP-UTR siRNA + BIP-R197E-Plasmid}} = 1$; $n_{\text{BIP-UTR siRNA + BIP-R197H-Plasmid}} = 1$; $n_{\text{BIP-UTR siRNA + KAR2-Plasmid}} = 4$; $n_{\text{Kontroll siRNA}} = 7$; $n_{\text{Kontroll siRNA + BIP-UTR siRNA}} = 7$; $n_{\text{SEC61A1-UTR siRNA + Kontroll siRNA}} = 7$; $n_{\text{SEC61A1-UTR siRNA + BIP-UTR siRNA}} = 7$. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben.

VI.3.6. Untersuchung weiterer abundanter Ca^{2+} -bindender ER-Chaperone

Zwar wurde der Effekt der BiP-Reduktion auf den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstrom in Säugetierzellen verifiziert und auch weiter charakterisiert, jedoch blieb die Frage offen, ob dieser Einfluss spezifisch für das BiP-Protein ist oder ob es sich hierbei um eine generelle Reaktion eines abundanten ER-luminalen, Ca^{2+} -bindenden Chaperons handelt. Weitere typische Vertreter solcher Proteine neben BiP sind die Protein-Disulfid-Isomerase Pdi (Edman *et al.*, 1985; Ferrari und Soling, 1999), das Hsp90-Chaperon Grp94 (Argon und Simen, 1999; Melnick *et al.*, 1992; Schmidt und Perlmutter, 2005) sowie das Lektin-Chaperon Calretikulin (Helenius *et al.*, 1997; High *et al.*, 2000).

VI.3.6.1. Pdi, Grp94 und Calretikulin können innerhalb von 48 h mittels siRNA mit vergleichbarer Effizienz depletiert werden wie das BiP-Protein

Mit Hilfe validierter siRNAs gegen die jeweilige mRNA von *PDI*, *GRP94* oder Calretikulin (*CALR*) sollte in gleicherweise wie für die BiP-Depletionsexperimente (VI.3.1.1) eine Reduktion der entsprechenden Proteine erreicht werden. Um die experimentellen Bedingungen so ähnlich wie möglich zu halten wurden die HeLa-Zellen ebenfalls für 48 h mit 35 nM Kontroll siRNA oder einer der genannten siRNAs transfiziert (V.2.4.6.1) und die Proben anschließend einer Western-Blot-Analyse (V.2.1.4) unterzogen, um den jeweiligen Proteingehalt nach Depletion zu überprüfen.

Alle drei Chaperone wiesen nach 48 h siRNA-Behandlung eine Reduktion auf 30-40 % des jeweiligen Proteins im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 59, A, B). Damit lag die Depletionseffizienz im vergleichbaren Bereich wie für die *BIP* siRNA-Behandlung (Abbildung 44, A, B). Im Fall der *GRP94* siRNA-Transfektion wurde eine leichte, sekundäre Reduktion des Pdi-Proteins beobachtet (ca. 75-80 % Restprotein; Abbildung 59, A, B).

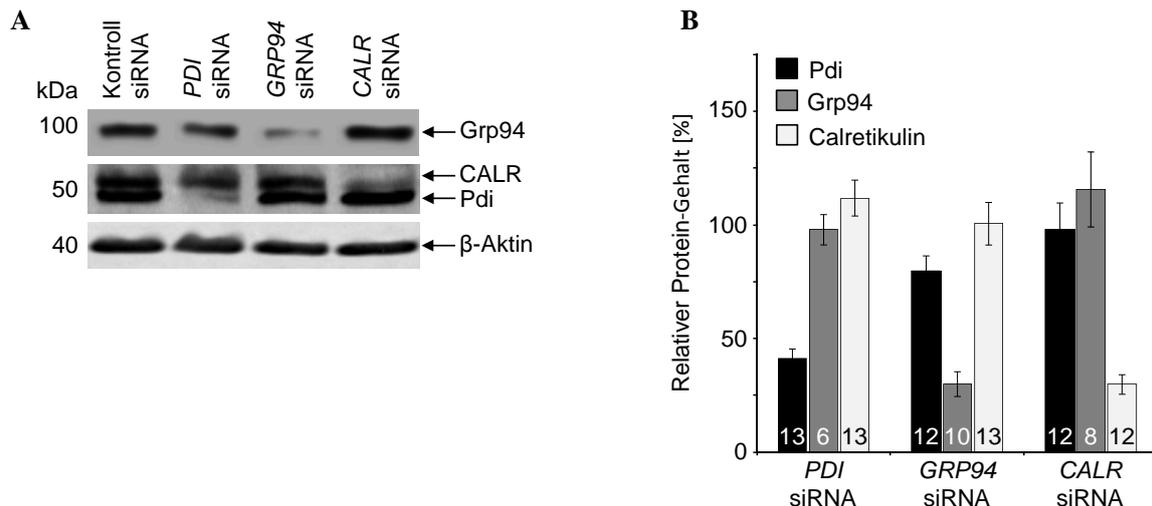


Abbildung 59: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der siRNA-vermittelten Depletion verschiedener ER-Chaperone für 48 h. **A**) Jeweils 6×10^5 HeLa-Zellen wurden in einer 6 cm Zellkulturschale (auf einem 25 mm Deckglas) ausgesät und entweder mit 35 nM Kontroll, *PDI*, *GRP94* oder *CALR* siRNA transfiziert (V.2.4.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen nachtransfiziert und weitere 24 h inkubiert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, gezählt (V.2.4.3), lysiert und in Lämmli-Probenpuffer für 10 min bei 56 °C erhitzt sowie mit „Glasbeads“ geschüttelt (20 min). Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt (12,5 %iges PA-Gel), auf eine PVDF-Membran transferiert (V.2.1.4) und mit Hilfe einer Immundetektion (V.2.1.5) und Densitometrie (V.2.1.7) analysiert. Zum immunologischen Nachweis wurden ein Kaninchen-anti-Pdi-Antikörper, ein Kaninchen-anti-Grp94-Antikörper sowie ein Kaninchen-anti-Calretikulin-Antikörper (je 1:500, in 3 % Magermilch) sowie ein sekundärer Cy5-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) verwendet. Als Ladekontrolle diente das Zytoskelettprotein β -Aktin, für dessen Detektion ein monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5.000, in 3 % Magermilch) und ein sekundärer Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000, in 3 % BSA) eingesetzt wurde. Die Visualisierung erfolgte jeweils mittels Typhoon Trio™ Scanner. Die Proteinmenge pro Gelspur entspricht jeweils einer eingesetzten Zellzahl von 3×10^5 . **B**) Statistische Auswertung der in (A) dargestellten Depletionsansätze diverser ER-Chaperone für 48 h. Es wurden die Quantifizierungen der Western-Blot-Spuren aller für diese Arbeit relevanten Experimente einbezogen. Die Signale wurden jeweils durch das in der gleichen Spur bestimmte β -Aktin-Signal zur Normierung dividiert. Der dargestellte Restproteingehalt (%) bezieht sich immer auf den Mittelwert der Kontroll siRNA (nicht gezeigt). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die Anzahl analysierter Banden ist am unteren Ende der Balken angegeben und entspricht der Anzahl technischer Replikate (biologische Replikate: jeweils 6).

VI.3.6.2. Die Expressionsreduktion weiterer abundanter ER-Chaperone führt nicht zur Steigerung des Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER

Um einen potentiellen Einfluss der Reduktion der ER-Chaperone Pdi, Grp94 oder Calretikulin auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER zu untersuchen wurden die jeweils depletierten HeLa-Zellen unter Punkt VI.3.6.1 mit Fura-2 AM beladen (V.2.6.1) und in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ca^{2+} -„imaging“ untersucht, indem 1 min nach Messbeginn 1 μM Thapsigargin appliziert und die zytosolische Ca^{2+} -Änderung für weitere 9 min beobachtet wurde.

Im Gegensatz zur *BIP* siRNA-Behandlung zeigten die Zellen nach Transfektion mit *PDI*, *GRP94* oder *CALR* siRNA keine Erhöhung des durch Thapsigargin demaskierten passiven Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER. Im Fall der *GRP94* sowie der *PDI* siRNA wurde sogar im Umkehrschluss eine geringe aber signifikante Abnahme des Ca^{2+} -Effluxes beobachtet (Abbildung 60, A, B). Wurde in einem analogen Aufbau die Gesamtkonzentration an freiem Ca^{2+} durch Zugabe von 5 μM Ionomycin kontrolliert,

VI. Ergebnisse

zeigte sich ebenfalls im Fall der *GRP94* siRNA-Behandlung eine deutliche Abnahme der Menge an freisetzbarem Ca^{2+} (Abbildung 60, C, D). Dies kann auf eine verringerte Ca^{2+} -Speicherkapazität des ER durch des Verlust des Ca^{2+} -bindenden Proteins zurückzuführen sein (Coe, 2009).

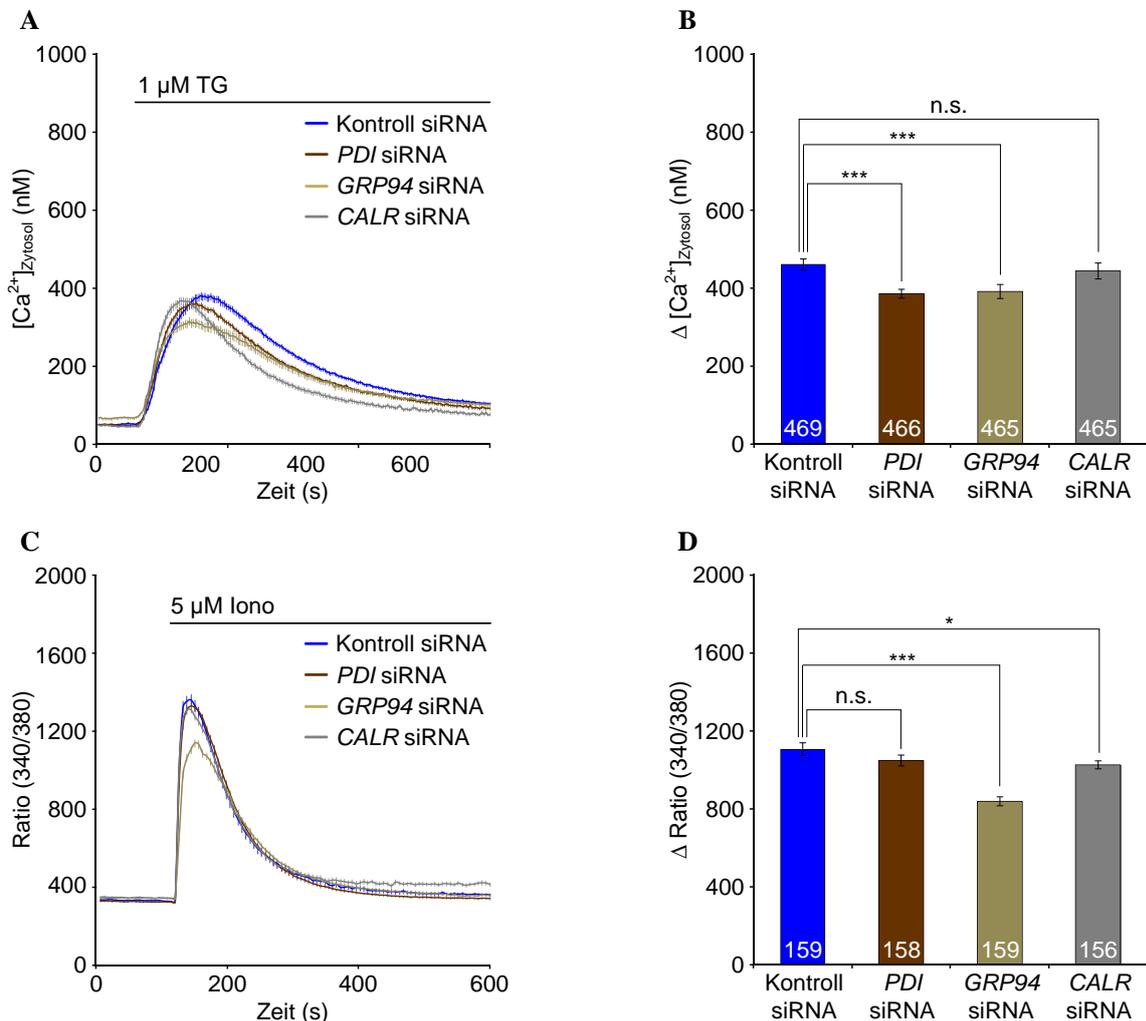


Abbildung 60: Messung zytosolischer Ca^{2+} -Änderungen in HeLa-Zellen nach Depletion verschiedener ER-luminaler Chaperone (48 h). **A)** Untersuchung des Ca^{2+} -Leckstromes aus dem ER nach Depletion von Pdi, Grp94 und Calretikulin. HeLa-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) behandelten Deckgläsern (25 mm) ausgesät und entweder mit Kontroll, *PDI*, *GRP94* oder *CALR* siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen nachtransfiziert und weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden diese mit 3,5 μM Fura-2 AM in DMEM beladen, das Deckglas in die Messkammer eingespannt und zweimal mit Ca^{2+} -freiem Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in Ca^{2+} -freiem Puffer inkubiert und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingesetzt. Nach 1 min wurde 1 μM Thapsigargin (TG) appliziert und für weitere 9 min gemessen. Das Diagramm zeigt die gemessene zytosolische Ca^{2+} -Konzentration, welche gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Kurven stellen den Mittelwert sowie den Standardfehler der Messungen dar (*CALR* = Calretikulin). **B)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von TG der in (A) dargestellten Experimente. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Experimente wurde ein ungepaarter t-Test (V.2.7) durchgeführt. P-Werte < 0,05 oder < 0,001 wurden als signifikant definiert und durch 1 Stern (*) bzw. 3 Sterne (***) markiert, P-Werte > 0,001 wurden als nicht signifikant (n.s.) deklariert. Es wurden je 9 unabhängige Messung durchgeführt und stets 50-55 einzelne Zellen analysiert. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angegeben. **C)** Untersuchung der zellulären Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration Pdi-, Grp94- und Calretikulin-depletierter HeLa-Zellen. Die Zellen wurden analog zu (A) vorbereitet und nach 1 min 5 μM Ionomycin (Iono) verabreicht sowie für weitere 6,5 min gemessen. **D)** Statistische Analyse der Änderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Iono der in (C) dargestellten Experimente. Angegeben wurden Mittelwerte und Standardfehler. Zum Vergleich der Experimente wurde wie unter (B) ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Es wurden jeweils 3 unabhängige Messung durchgeführt und stets 50-55 einzelne Zellen analysiert. Die Gesamtzahl untersuchter Zellen ist am unteren Ende der Balken angezeigt.

VI.4. BiP-Sec61 α -Interaktionsstudien

Es existieren bereits einige Daten, die eine Interaktion von BiP mit dem Sec61-Komplex vermuten lassen. BiP wird zum einen durch eine Interaktion mit den ER-Membran-assoziierten Hsp40-Cochaperonen Sec63 sowie ERj1 zum Translokon rekrutiert. Da Sec63 wiederum in einem Multiproteinkomplex zusammen mit Sec61 α vorliegt und ERj1 mit translatierenden Ribosomen assoziiert, kann zumindest von einer indirekten Bindung zwischen BiP zu Sec61 α ausgegangen werden (Brodsky und Scheckman, 1993; Dudek *et al.*, 2005; Tyedmers *et al.*, 2000). Sowohl Fluoreszenzquenching-Experimente mit rauen Mikrosomen (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998) sowie Einzelkanalmessungen mit Sec61-Proteoliposomen (Wirth *et al.*, 2003), welche beide einen inhibierenden Einfluss von BiP auf die Ionenpermeabilität des Sec61-Kanals zeigen, als auch die zuvor gezeigten Ergebnisse der Ca²⁺-„imaging“-Experimente nach BiP-Depletion (VI.3.4), lassen sogar eine direkte Interaktion schließen. Neuere Untersuchungen von Zellen mit einer Substitution von Sec61 α durch eine Sec61 α -Y344H-Mutante zeigen eine UPR-Aktivierung (Lloyd *et al.*, 2010; Wheeler und Gekakis, 2012) sowie einen erhöhten Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER. Da diese Effekte eine Phänokopie der Auswirkungen nach BiP-Depletion darstellen und der besagte Aminosäureaustausch in einer evolutionär konservierten, für BiP potentiell zugänglichen ER-luminalen Schleifenregion von Sec61 α lokalisiert ist, deuten diese Daten ebenfalls auf eine Interaktion hin. Martin Jung zeigte diesbezüglich mittels Peptidspot-Analysen sowie Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie, dass BiP an ein synthetisches Peptid bindet, welches dem Bereich um den Aminosäurerest Y344 in der besagten ER-luminalen Schleife 7 entspricht, und dass diese Interaktion sowohl ATP-abhängig ist als auch stark durch den Austausch von Y344 zu Histidin beeinträchtigt wird (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Bislang wurde jedoch keine direkte Bindung in einem Zelllysate oder in intakten Zellen nachgewiesen. Mit Hilfe der beschriebenen UV-induzierten *in vivo* Quervernetzung (V.2.1.11) oder den Co-Präzipitationstechniken (V.2.1.9, V.2.1.10) wurde versucht die postulierte Interaktion von BiP mit Sec61 α zu detektieren.

Um eine Bindung mittels UV-induzierter *in vivo* Quervernetzung nachzuweisen wurden HeLa-Zellen für 24 h kultiviert und entweder mit *BIP*-His- oder zusätzlich *SEC61A1*-Plasmid transfiziert (V.2.4.6.2). Nach weiteren 24 h wurde das Kulturmedium durch LM-2 (+ pLeu und pMet) ersetzt und weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden abgelöst, in 1 ml PBS aufgenommen und mit UV-Licht bestrahlt (V.2.1.11). Anschließend wurden die Zellen mittels Western-Blot (V.2.1.4) analysiert. Sowohl nach Detektion von Sec61 α als auch BiP-His wiesen die Western-Blot-Spuren der bestrahlten Doppeltransfektionsansätze zusätzliche, höhermolekulare Banden auf, wobei in beiden Fällen ein Addukt auf Höhe von ca. 120 kDa zu erkennen war. Ausgehend von den molekularen Massen der beiden Proteine (Sec61 α = 37 kDa im PA-Gel bzw. 53 kDa theoretisch; BiP = 70 kDa im PA-Gel bzw. 78 kDa theoretisch) entspricht diese Bande möglicherweise einer Sec61 α -BiP-His-Interaktion (Abbildung 61, A). In einem zweiten Ansatz sollte diese Interaktion durch Co-Präzipitation mittels Ni²⁺-NTA-Agarose verifiziert werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen in gleicher Weise wie zuvor mit

BIP-His-Plasmid transfiziert (V.2.4.6.2) oder ohne weitere Behandlung kultiviert (48 h Expression) und das zentrifugierte Zelllysats nach Ernte sowie Lyse der Zellen über Nacht (4 °C) mit Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Ni²⁺-Matrix gewaschen und gebundenes Protein eluiert (V.2.1.9). Aliquots des jeweiligen Zelllysats, des Überstandes sowie des Eluates wurden mittels Western-Blot-Analyse (V.2.1.4; V.2.1.5) auf die Anwesenheit von BiP-His bzw. Sec61 α untersucht. Im Kontroll-Ansatz (unbehandelte Zellen) wurde wie erwartet kein BiP-His nachgewiesen und Sec61 α dementsprechend auch nur im Zelllysats sowie im Überstand wiedergefunden. Wurde jedoch BiP-His synthetisiert, welches der Bindung von His-Fusionsproteinen an Ni²⁺-beladene Oberflächen entsprechend auch in großen Mengen im Eluat zu finden war, so wurde auch eine deutliche Menge Sec61 α co-präzipitiert (Abbildung 61, B). Diesen Ergebnissen zufolge interagiert BiP mit der α -Untereinheit des Sec61-Komplexes.

Letztlich sollte eine direkte Interaktion der Proteine auf zellulärer Ebene mittels nachfolgender Massenspektrometrie-Analyse bestätigt werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen wie bereits beschrieben kultiviert und entweder mit Kontroll- oder *BIP*-Plasmid transfiziert (V.2.4.6.2) oder ohne weitere Behandlung inkubiert (insgesamt 48 h Expression). Ein Teil der transfizierten Zellen wurde nach 24 h mit LM-2 (mit photo-Aminosäuren) weiterkultiviert und nach 24 h mit UV-Licht bestrahlt (V.2.1.11). Danach wurden die Zellen geerntet, lysiert und über Nacht bei 4 °C mit ATP-C⁸-Agarose inkubiert. Die Proteine sowie dessen Quervernetzungsprodukte wurden mittels Elutionspuffer (Eluat 1) und Hochsalz-Elutionspuffer (Eluat 2) von der ATP-C⁸-Agarose eluiert (V.2.1.10) und die Proben nach SDS-PAGE (V.2.1.1) mit kolloidalem Coomassie (V.2.1.3) gefärbt. Aufgrund der geringen Sensitivität gegenüber einer Antikörperdetektion wurden nach UV-induzierter Quervernetzung neben BiP in den Elutionsfraktionen nur zwei höhermolekulare Banden (oberhalb von 170 kDa) detektiert (Abbildung 61, C). Diese waren bereits im Quervernetzungsansatz nach Co-Expression von *BIP*-His- und *SEC61A1* (Abbildung 61, A) am deutlichsten zu erkennen, jedoch nur mittels anti-His-Antikörper und nicht mit anti-Sec61 α -Antikörper detektierbar. Dennoch wurden diese Banden ausgeschnitten und in einer Massenspektrometrie-Analyse untersucht (Durchgeführt durch die Arbeitsgruppe von Prof. Claudia Fecher-Trost). Hierbei wurde in beiden Fällen zwar das BiP-Protein identifiziert, allerdings weder das Sec61 α -Protein noch weitere Translokon-assoziierte Proteine. Um das zuvor detektierte Addukt auf Höhe von 120 kDa massenspektrometrisch analysieren zu können (welches mit höherer Wahrscheinlichkeit zusätzlich Sec61 α enthält), müsste in einem vergleichbaren Experiment wie in Abbildung 61, C eine weitaus höhere Zellzahl eingesetzt werden, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurde.

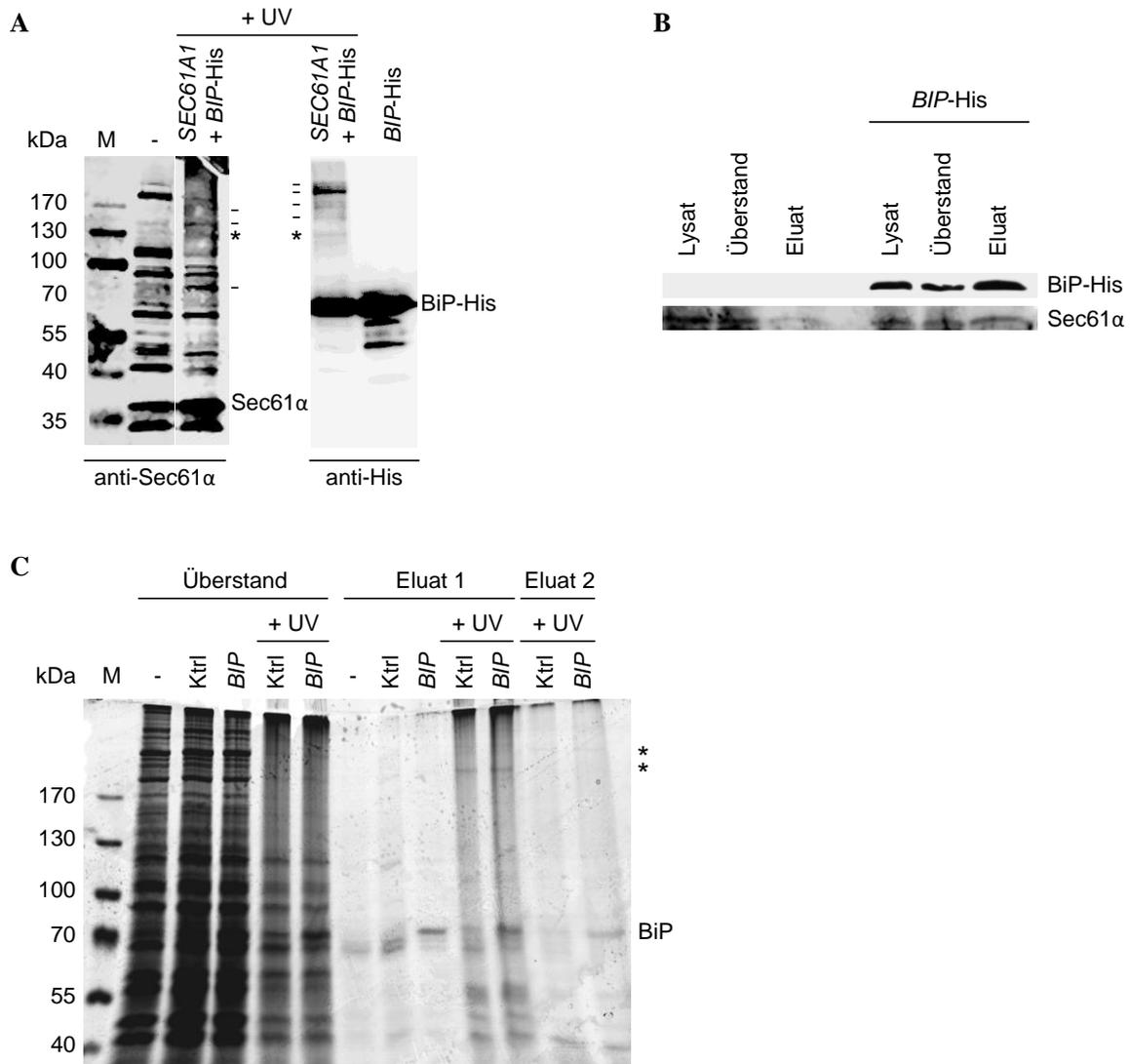


Abbildung 61: Interaktion zwischen Sec61 α und BiP. **A)** UV-induzierte *in vivo* Quervernetzung von Proteinen (V.2.1.11). HeLa-Zellen wurden 24 h kultiviert und, wenn angegeben, entweder mit *SEC61A1*-, *BIP*-His-Plasmid oder einer Kombination beider Vektoren transfiziert (V.2.4.6.2). Nach weiteren 24 h wurde das Kulturmedium (DMEM) entfernt, mit PBS gewaschen und LM-2 (+ pLeu/pMet) hinzugegeben. Die Zellen wurden weitere 24 h inkubiert, anschließend abgelöst und in 1 ml PBS aufgenommen (3,5 cm Schale). Die Zellsuspension wurde auf einem Rotationsschüttler mit einer 100 Watt Hochdruck-UV/Vis-Quecksilberlampe (UVICO Longlife; Rapp OptoElectronic; Abstand: 4,5 cm) für 15 min bestrahlt (V.2.1.11), die Zellen geerntet, gezählt (V.2.4.3) und lysiert (* = Quervernetzung von Interesse; - = weitere Quervernetzung). **B)** Co-Präzipitation von BiP-His und Sec61 α mittels Ni²⁺-NTA-Agarose. HeLa-Zellen wurden 24 h kultiviert und, wenn angegeben, mit *BIP*-His-Plasmid transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen geerntet, gezählt, lysiert und das gereinigte Zelllysate über Nacht (4 °C) mit Ni²⁺-NTA-Agarose inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Proteine 5 min bei RT eluiert. Ein Aliquot jedes Teilschrittes wurde aufbewahrt (Zelllysate \cong 5*10⁵ Zellen; Überstand \cong 5*10⁵ Zellen; Präzipitat \cong 1*10⁷ Zellen). Alle Proben in (A) und (B) wurden in Lämmli-Probenpuffer erhitzt (10 min; 56 °C). Die Ansätze wurden anschließend mittels Western-Blot (V.2.1.4) und Immundetektion (V.2.1.5) mit Kaninchen-anti-Sec61 α - (1:200), bzw. -anti-BiP-Antikörper (1:500) in Kombination mit POD-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1.000) oder direkt mittels Anti-Penta-His-HRP-Antikörper analysiert sowie mittels des Lumi Imager F1 dokumentiert. Es wurden nur Bereiche von Interesse angezeigt (*SEC61A1* = *SEC61A1*-Plasmid; *BIP*-His = *BIP*-His-Plasmid). **C)** UV-induzierte *in vivo* Quervernetzung in Kombination mit einer BiP-Präzipitation mittels ATP-Agarose (V.2.1.10). HeLa-Zellen wurden wie unter (A) kultiviert und, wenn angegeben, mit Kontroll- (Ktrl) oder *BIP*-Plasmid (*BIP*) transfiziert sowie, falls angezeigt, mit UV-Licht bestrahlt (V.2.1.11). Die Zellen wurden lysiert und über Nacht (4 °C) mit ATP-Agarose inkubiert und BiP sowie dessen Quervernetzungsprodukte in zwei Schritten (Elutionspuffer und Hochsalz-Elutionspuffer) von der ATP-Agarose eluiert (V.2.1.10; Überstand \cong 2,5*10⁵ Zellen; Präzipitat \cong 2*10⁶ Zellen). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (V.2.1.1) aufgetrennt (10 %iges PA-Gel) und für eine Massenspektrometrie-Analyse mit kolloidalem Coomassie (V.2.1.3) gefärbt (M = Marker; kDa = Kilodalton).

VII. Diskussion

Die im Laufe der Evolution zunehmende Komplexität von Zellen spiegelt sich besonders im Vergleich von Prokaryoten und Eukaryoten wieder. Die erhöhte intrazelluläre Organisation durch membranumschlossene Kompartimente mit spezifischen Funktionen wie dem Nukleus, den Mitochondrien, dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ermöglicht es der Zelle verschiedenartige Prozesse, wie die Genregulation, den Energiehaushalt oder die Proteinfaltung aufgrund definierter Milieus effizient und simultan zu bewerkstelligen (Mazzarello *et al.*, 2003; Mazzarello *et al.*, 2009; Voeltz, 2002; Wolpert, 1995; Zorov *et al.*, 1997). Dieser Aufbau erfährt eine weitere Entwicklung von Protozoen zu Metazoen, welche sich durch den Zusammenschluss hochspezialisierter Zellen zu einem komplexen Zellverbund auszeichnen, der durch einen stetigen Informationsaustausch charakterisiert ist. Neben der Ausbildung einer extrazellulären Matrix und dem Besitz einer Vielzahl von Plasmamembranrezeptoren zur Transduktion extrazellulärer Signale sind Zellen höherer Eukaryoten auch durch eine komplexe intrazelluläre Signalweiterleitung gekennzeichnet. Hierbei dient Ca^{2+} als hocheffizienter, sekundärer Botenstoff, welcher im ER-Lumen gespeichert wird und von dort aus kontrolliert freigesetzt werden kann (Clapham, 2007; Stewart *et al.*, 2004; Tisi *et al.*, 2004). Gleichzeitig fungiert das ER als Biosyntheseort für sekretorische und eine Reihe von Membranproteinen. Nahezu alle Vorläuferproteine nutzen als Eintrittsort in den Sekretionsweg die ER-Proteintranslokase mit dem heterotrimeren Sec61-Komplex als Kernkomponente (Zimmermann *et al.*, 2011). Studien zufolge werden dem Sec61-Komplex Eigenschaften eines unspezifischen Ionenkanals zugeschrieben, was plausibel ist, da die Translokationspore einen hydrophilen Innenraum mit einem Durchmesser von bis zu 6 nm aufweist (Simon und Blobel, 1991; Wirth *et al.*, 2003). Aufgrund des hohen Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten zwischen ER und Zytosol muss daher die Permeabilität des Translokons streng kontrolliert werden. Auch wenn eine naszierende Polypeptidkette während der Passage durch den Kanal vermutlich eine gewisse Permeabilitätsbarriere bietet (Crowley *et al.*, 1994), so scheint der Komplex sowohl in der frühen Phase der Translokation als auch nach der Termination transient Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol entlassen zu können (Alder *et al.*, 2005; Flourakis *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007). Gerade in sekretorischen Zellen führt diese Konstellation jedoch zu einer Diskrepanz, da durch die hohe Translokationsrate ein verstärkter Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER begünstigt wird. Ein derartiger Leckstrom bedeutet nicht nur eine hohe Energieverschwendung für die Zelle, da zur Vermeidung einer toxischen Phosphatpräzipitation innerhalb des Zytosols ein Rücktransport von Ca^{2+} ins ER oder aus der Zelle heraus über Ca^{2+} -ATPasen (SERCA, PMCA) erfolgen muss. Ein unkontrollierter passiver Ca^{2+} -Efflux vermag ferner unspezifisch die intrazelluläre Signaltransduktion zu aktivieren, indem innerhalb von Ca^{2+} -Nanodomänen um die Sec61-Porenöffnungen IP_3 - bzw. Ryanodinrezeptoren als Folge der sogenannten „calcium-induced calcium release“ (CICR) öffnen und weiteres Ca^{2+} aus dem ER freisetzen und dadurch ganze Signalkaskaden in Gang setzen (Berridge *et al.*, 2000; Clapham,

2007; Foskett *et al.*, 2007; Niggli, 1999). Die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase hat somit höchste Priorität, nicht zuletzt, weil eine Reduktion von ER-luminalem Ca^{2+} ebenso weitreichende Folgen hat und u.a. zur Aktivierung des SOCE, dem Verlust der Faltungskompetenz (UPR-Aktivierung) sowie einer Unfähigkeit der Retention vieler ER-luminaler Proteine führt (Gallego-Sandín *et al.*, 2011; Hogan *et al.*, 2010; Michalak *et al.*, 2002; Sambrook, 1990; Wada *et al.*, 1991). Sowohl das zytosolische Ca^{2+} -CaM als auch das ER-luminale Chaperon BiP wurden anhand von *in vitro* Untersuchungen als potentielle Kandidaten für die Regulation des Sec61-Komplexes postuliert (Alder *et al.*, 2005; Erdmann *et al.*, 2011; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion beider Proteine auf zellulärer Ebene verifiziert und genauer charakterisiert.

VII.1. Charakterisierung der Funktionen von Calmodulin

Calmodulin (CaM) ist ein ubiquitäres Ca^{2+} -Sensorprotein im Zytosol eukaryotischer Zellen und spielt nicht nur eine Rolle bei der Regulation von Ca^{2+} -Kanälen, sondern wurde auch im Zusammenhang mit dem Proteintransport ins ER beschrieben. Dabei vermag es in letzterem Fall einerseits die Signalpeptidase-gespaltenen Signalsequenzfragmente von Präprolaktin und vermutlich jene weiterer präsekretorischer Proteine zu binden und hat einen direkten Einfluss auf den posttranslationalen ER-Import von Polypeptiden, indem es in Form eines molekularen Chaperons kleine, SRP-unabhängige Vorläuferproteine in einer translokationskompetenten Konformation stabilisiert (Cheung, 1980; Dick *et al.*, 2008; Martoglio *et al.*, 1997; Shao und Hegde, 2011c; Zuhlke *et al.*, 1999). Die Untersuchung der Funktionen von CaM beim Signalsequenz- sowie „tail-anchor“-abhängigen *in vitro* Import von Vorstufenproteinen ins ER bzw. in die ER-Membran sowie der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase des ER erfolgte über unterschiedliche Ansätze, wobei der Schwerpunkt auf der Verwendung diverser CaM-Antagonisten lag. Neben den pharmakologischen Ansätzen, wurde zur funktionalen Analyse zudem die cDNA von CAM-GFP überexprimiert (Scheschonka *et al.*, 2008) sowie die Genexpression von *SEC61A1* durch siRNA- und Plasmidtransfektion manipuliert. Zur Überprüfung derartiger behandelter Zellen wurden ferner Viabilitätsanalysen durchgeführt.

VII.1.1. Diverse CaM-Antagonisten inhibieren den cotranslationalen *in vitro* Proteinimport ins ER

Basierend auf *in vitro* Translokationsexperimenten der Arbeitsgruppe Zimmermann ist Ca^{2+} in hohen Konzentrationen (ca. 600 μM) in der Lage den Import von SRP-abhängigen Vorstufenproteinen über den Sec61-Komplex ins ER zu inhibieren, indem es vermutlich die strukturelle Dynamik des Sec61-Komplexes einschränkt. Ca^{2+} -CaM hingegen bewirkt keine Hemmung, sondern hebt vielmehr durch Pufferung von Ca^{2+} diese Transportinhibition wieder auf (Erdmann *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2011).

VII. Diskussion

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten CaM-Antagonisten Ophiobolin A, Trifluoperazin (TFP), Calmidazolium (= R24571), Phenoxybenzamin und CaMKII sind alle in der Literatur als etablierte CaM-Inhibitoren beschrieben, besitzen jedoch unterschiedliche Inhibitionsmechanismen. Während Ophiobolin A beispielsweise kovalent an Lysinreste in der hydrophoben Substratinteraktionsdomäne von CaM bindet (Lys-75 und Lys-148) assoziiert das Phenothiazin TFP nicht-kovalent, indem sich vier bis sieben TFP-Moleküle an definierte Regionen von CaM anlagern. Zur CaM-Inaktivierung erfordert die Bindung beider Antagonisten dabei bevorzugt die Ca^{2+} -gebundene, gestreckte Konformation von CaM, wodurch beide demnach in ähnlicher Weise mit der CaM-Substrat-Interaktion interferieren (Feldkamp *et al.*, 2010; Jan und Tseng, 2000; Kong Au und Chow Leung, 1998; Meador *et al.*, 1993; Ning und Sanchez, 1996; Vandonselaar *et al.*, 1994). Wie Ophiobolin A interagiert auch Phenoxybenzamin kovalent mit CaM während Calmidazolium zwar keine Atombindung eingeht, jedoch mit hoher Affinität ($K_d = 2\text{-}3\text{ nM}$) assoziiert (Johnson und Wittenauer, 1983).

Die spezifische Inhibition von CaM sollte somit erwartungsgemäß keinen negativen Einfluss auf den Signalpeptid-abhängigen Transport ins ER ausüben. Eine Transporthemmung könnte allenfalls durch restliches Ca^{2+} im Retikulozytenlysat erfolgen. Allerdings ist die physiologische Konzentration im Zytosol mit 100 nM *per se* schon weit unter dem inhibitorischen Wert von $600\text{ }\mu\text{M}$ (Clapham, 2007; Erdmann *et al.*, 2011). Zudem wurde das verwendete Retikulozytenlysat (V.1.2) durch eine Ca^{2+} -abhängige Nuklease behandelt und diese anschließend mit 2 mM (Endkonzentration: $400\text{ }\mu\text{M}$) des Ca^{2+} -Chelators EGTA inaktiviert (Pelham und Jackson, 1976). Wie an den Ergebnissen unter VI.1.1.1 zu sehen ist, wurde jedoch der cotranslationale *in vitro* ER-Import der drei Modellsubstrate Präprolaktin (ppl), Präpro- α -Faktor (pp α F) sowie Präprocecropin A (ppcecA) konzentrationsabhängig durch Ophiobolin A, Phenoxybenzamin sowie Calmidazolium inhibiert (jeweils ab ca. $50\text{ }\mu\text{M}$), während TFP und CaMKII der anfänglichen Erwartung zufolge keine Auswirkungen zeigten (Abbildung 21, A-C). Demnach wirken die drei CaM-Antagonisten offensichtlich CaM-unabhängig auf das „targeting“ oder den ER-Import über den Sec61-Komplex. Da Calmidazolium und Phenoxybenzamin nicht nur die Prozessierung von ppl₈₆ zu ppl₅₆ inhibierten, sondern auch in gleichem Maße die Quervernetzung zu Sec61 α reduzierten (Abbildung 23, Tabelle 14), wird offensichtlich die naszierende Polypeptidkette des RNC nicht in den Sec61-Komplex inseriert. Der posttranslationale *in vitro* Import von ppcecA hingegen wurde durch die drei genannten CaM-Antagonisten lediglich marginal, d.h. bei der höchsten, getesteten Konzentration von je $200\text{ }\mu\text{M}$ inhibiert (Abbildung 24). Demnach könnte der Effekt auf den Transport das „targeting“ des RNC betreffen. Mögliche Ziele wären hierbei Bestandteile des cotranslationalen Transportweges wie der SRP, der SRP-Rezeptor, die M-„site“ des Ribosoms oder Bereiche der zytosolischen Schleifenregionen 6 und 8 des Sec61-Komplexes, d.h. die Kontaktstellen für das Ribosom (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008). Die ebenfalls leichte Hemmung des posttranslationalen Importes spricht dabei jedoch am ehesten für eine direkte Bindung an den Sec61-Komplex, bei der zwar bevorzugt die Interaktion mit dem Ribosom

gestört wird, allerdings auch zu einem gewissen Grad die Öffnung des Kanals („gating“) bzw. die Interaktion mit dem Signalpeptid von Vorläufern behindert wird. Generell ist eine unspezifische Wirkung der xenobiotischen CaM-Antagonisten nicht unerwartet, da u.a. für Calmidazolium in der Literatur bereits eine Reihe derartiger Effekte beschrieben wurden. So bewirkt dieser Inhibitor vor allem oberhalb einer Konzentration von 10 μM CaM-unabhängig den Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} -Levels in MDCK-Zellen („Madin Darby Canine Kidney“) und hemmt ferner die Adenylatzyklase, die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase sowie CRAC-Kanäle in der Plasmamembran (Coelho-Sampaio *et al.*, 1991; Harper und Daly, 2000; Haunso *et al.*, 2003; Jan und Tseng, 2000).

Ophiobolin A und Phenoxybenzamin zeigten in den *in vitro* Translokationsexperimenten zudem die Eigenschaft, die Membran von Mikrosomen (RM) zu permeabilisieren, da das prozessierte Protein sowohl beim cotranslationalen Transport (Abbildung 21, B) wie auch bei einer 15-minütigen Nachbehandlung, ähnlich einer Detergenz-Behandlung, seine Proteaseresistenz verliert (Abbildung 22). Dieser permeabilisierende Effekt ist offensichtlich derart stark ausgeprägt, dass der Vorläufer im Fall von pp α F während der Translationsreaktion ins ER gelangen kann, was die enorm gesteigerte Prozessierungseffizienz von 30 % auf ca. 80 % erklären würde. Das gleichzeitige Fehlen der N-Glykosylierung wiederum ist vermutlich die Konsequenz der fehlenden Membranintegrität, wodurch jegliches Ca^{2+} aus dem ER-Lumen verloren geht und damit die Faltungskapazität der ER-Chaperone reduziert wird (High *et al.*, 2000; Kleizen und Braakman, 2004). Durch die Fehlfaltung wird wahrscheinlich das N-Glykosylierungsmotiv nicht mehr exponiert, weswegen diese Modifikation ausbleibt. Ophiobolin A ist in Experimenten mit Zellen sehr gut etabliert und weist auch hierbei in ähnlichen Konzentration keine negativen Auswirkungen auf biologische Membranen auf, was sowohl aus den Ca^{2+} -„imaging“-Experimenten innerhalb dieser Arbeit als auch aus einer Reihe von Studien anderer Labors hervorgeht (Chigri *et al.*, 2005; Kong Au und Chow Leung, 1998; Leung *et al.*, 1985; Spehr *et al.*, 2009; Tipton *et al.*, 1977). Somit handelt es sich bei den beobachteten Effekten im *in vitro* System möglicherweise um eine unspezifische Wirkung. Im Vergleich zu reinem Zytosol weist das Retikulozytenlysat ein wesentlich oxidativeres Milieu auf, denn zum einen enthalten Retikulozyten Lipooxygenase, welche Phospholipide angreifen kann und vermutlich beim Abbau von Mitochondrien während der Retikulozytenreifung involviert ist. Zum anderen enthält das Lysat ER-Rückstände, welche durch die hohe Konzentration an oxidiertem Gluthation (GSSG) und dem relativ niedrigen pH-Wert (pH 7,1) ebenfalls zu diesem Milieu beitragen können (Chakravarthi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 1998; Rapoport *et al.*, 1979; Schewe *et al.*, 1975). Unter diesen Bedingungen könnten die Eigenschaften der beiden CaM-Antagonisten derart beeinflusst werden, dass diese die Permeabilisierung biologischer Membranen bewirken können. Insbesondere Ophiobolin A ähnelt strukturell dem Cholesterol und könnte sich daher unter geeigneten Bedingungen in biologische Membranen einlagern (Colbeau *et al.*, 1971). Eine direkte CaM-unabhängige Aktivierung der Lipooxygenase wär ebenfalls vorstellbar.

Weiterhin wurde beobachtet, dass der kompetitive CaM-Antagonist CaMKII eine Inhibition der Proteinsynthese bewirkt, was möglicherweise auf eine Interaktion mit dem Ribosom oder mit Initiationsfaktoren zurückzuführen ist, weswegen sich dieser CaM-Antagonist nicht für die cotranslationalen Transportexperimente eignet.

VII.1.2. CaM-Inhibition begünstigt den posttranslationalen *in vitro* Import Signalsequenz-abhängiger Proteine ins ER

Während die Xenobiotika im Gegensatz zum cotranslationalen Transport keine oder nur eine geringe Inhibition auf den posttranslationalen Import ins ER aufweisen, zeigte der CaM-Antagonist CaMKII im posttranslationalen Modus sogar eine stimulierende Wirkung (ab 50 μM) auf ca. 200 % Prozessierung im Vergleich zur Pufferkontrolle (Abbildung 24, Tabelle 14). Da es sich hierbei um ein Peptid, korrespondierend zur CaM-Interaktionsdomäne der Ca^{2+} /CaM-abhängigen-Kinase II handelt, einem ubiquitären, zytosolischen Protein, ist in diesem Fall grundsätzlich von einer spezifischen CaM-Inhibition auszugehen. Auch wenn die Affinität von CaM zu CaMKII bei gesättigten Ca^{2+} -Konzentrationen (10 mM) rund 30-fach stärker ist ($K_d \approx 10 \text{ nM}$) als bei basalen Ca^{2+} -Konzentrationen von etwa 100 nM, ist im *in vitro* System (mit EGTA) eine CaM-Inhibition theoretisch möglich (Evans und Shea, 2009). Die vier anderen CaM-Antagonisten benötigen zur Entfaltung ihrer inhibitorischen Wirkung eine vollständig Ca^{2+} -aktivierte Konformation des CaM-Moleküls (Kong Au und Chow Leung, 1998; Lukas *et al.*, 1985; Sobieszek, 1989; Vandonselaar *et al.*, 1994), was letztlich die ausschließliche Wirkung von CaMKII erklären würde. Zudem ist auch eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung von Calmodulin (Apo-CaM) denkbar (Rhoads und Friedberg, 1997) und auch eine Restaktivität von endogenem CaM im Retikulozytenlysate trotz der Zugabe von EGTA nicht vollständig ausgeschlossen. Neuste Untersuchungen haben gezeigt, dass CaM im Säugersystem unter physiologischen Bedingungen (basale Ca^{2+} -Konzentration) an die hydrophobe Signalsequenz von posttranslational transportierten Substraten wie ppcecA bindet und diese in Form eines zytosolischen Chaperons in einer translokationskompetenten Konformation stabilisieren kann, wodurch es wesentlich zu deren ER-Import beiträgt. Durch CaM-Depletion des Lysates über eine Affinitätsäule mit einem immobilisierten CaM-Bindepeptid wird ferner eine vollständige Inhibition des ppcecA-Transportes erreicht, eine Tatsache, welche eine gewisse CaM-Aktivität des hier verwendeten EGTA-behandelten Retikulozytenlysates voraussetzt. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Freisetzung des Vorläufers von CaM den zeitlich begrenzenden Faktor der Translokationsreaktion darstellt und diese Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM EGTA zusammen mit den RM nach der Translation den ER-Import sogar beschleunigt (Shao und Hegde, 2011c). Ein vergleichbarer Effekt kann demnach auch durch die Zugabe von CaMKII angenommen werden, da dieser Inhibitor ebenfalls posttranslational mit den RM hinzugegeben wurde und eine CaM-Inhibition in Form einer kompetitiven Bindung zur stimulierten ppcecA-Freisetzung und damit zur gesteigerten Transport-

effizienz führen würde. Ob dieser Effekt prinzipiell auch für die restlichen Antagonisten beobachtet und der zuvor beschriebene Einfluss von CaMKII eventuell noch gesteigert werden kann, könnte in analogen Ansätzen getestet werden, in welchen nach der Translation, zusammen mit RM und den jeweiligen CaM-Antagonisten Ca^{2+} in einer physiologischen Konzentration hinzugegeben wird.

VII.1.3. CaM reguliert Ca^{2+} -abhängig die Insertion von „tail-anchored“-Proteinen in die ER-Membran

Wie bereits gezeigt wurde, übt die Zugabe von Ca^{2+} -CaM keinen Einfluss auf den cotranslationalen Proteintransport ins ER aus (Erdmann *et al.*, 2011), jedoch wurde eine Auswirkung von CaM auf den posttranslationalen Import ins ER beobachtet (Abbildung 24). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob CaM möglicherweise auch die Membraninsertion von „tail-anchored“-Proteinen (TA-MP) beeinflusst. Um eine aktive Konformation von CaM zu gewährleisten und aufgrund der posttranslationalen Insertion der TA-MP (Borgese und Fasana, 2011; Hegde und Keenan, 2011), erfolgte die Zugabe von CaM stets in Anwesenheit von $600 \mu\text{M}$ Ca^{2+} (theoretisch ca. $200 \mu\text{M}$ aufgrund des enthaltenen EGTA). Weiterhin wurde bereits innerhalb der Arbeitsgruppe Zimmermann gezeigt, dass Ca^{2+} alleine, auch in hohen Konzentrationen (ca. $700 \mu\text{M}$), keinen Einfluss auf die TA-MP-Insertion hat (Haßdenteufel *et al.*, 2011). Als Modells substrat wurde wie unter VI.1.1.3 beschrieben Cytochrom b5 (Cyt b5) verwendet, welches zwar fakultativ mit Hilfe zytosolischer Hsc70-Proteine zur ER-Membran dirigiert wird, jedoch im Gegensatz zu einem TA-MP wie Synaptobrevin 2 oder Sec61 β keinen Membran-ständigen Rezeptor benötigt. Zudem ist das „targeting“ der beiden letzteren über den TRC40- bzw. SRP-Weg obligatorisch (Abell *et al.*, 2004; Abell *et al.*, 2007; Rabu *et al.*, 2008; Vilardi *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Membraninsertion von Cyt b5 durch Ca^{2+} -CaM inhibiert wird. Dabei erfolgte bereits ab einer CaM-Konzentration von ca. $10 \mu\text{M}$ eine vollständige Inhibition (Abbildung 25), was auch etwa der physiologischen CaM-Konzentration in Säugetierzellen (HEK293-Zellen: $8,8 \pm 2,2 \mu\text{M}$) entspricht (Black *et al.*, 2004). Zudem wurde in analogen Ansätzen jeweils einer der fünf CaM-Antagonisten hinzugegeben, welche alle Ca^{2+} -abhängig mit einer Substratbindung von CaM interferieren. Jedoch wurde nur im Fall von TFP und CaMKII die Ca^{2+} -CaM-vermittelte Inhibition der TA-Membraninsertion verhindert (Abbildung 25). Da alle Inhibitoren in der Literatur jedoch vielfach beschrieben wurden und auf zellulärer Ebene sowie in Lösung in der Lage sind CaM zu inhibieren, muss auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Sec61-abhängigen *in vitro* Transports unter VI.1.1.1 davon ausgegangen werden, dass zumindest Effekte wie die Membranpermeabilisierung sowie auch die fehlende Fähigkeit CaM unter den genannten Bedingungen zu inhibieren auf das *in vitro* Translationssystem mit Retikulozytenlysate zurückzuführen sind. Auch sollte in diesem Zusammenhang nochmals bemerkt werden, dass unter den genannten Bedingungen eben genau die drei CaM-Antagonisten eine Transporthemmung Signalsequenz-abhängiger Substrate zeigten, die auch ihre CaM-Inhibitionsfähigkeit in den Untersuchungen

zur TA-MP-Insertion verloren haben. Die Tatsache, dass jedoch die TA-Insertionshemmung durch Zugabe der zwei völlig unterschiedlichen CaM-Antagonisten TFP (synthetisch) und dem Pseudopeptid CaMKII (Evans und Shea, 2009; Vandonselaar *et al.*, 1994) wieder aufgehoben werden kann spricht wiederum für die Spezifität der Insertionsinhibition durch Ca^{2+} -CaM. Diese ist nicht nur selbst konzentrationsabhängig, sondern wird auch durch TFP konzentrationsabhängig wieder aufgehoben. Ferner kann die Glykosylierung und damit die Membraninsertion sogar um bis zu 300 % gesteigert werden (Abbildung 25). Diese Tatsache liefert einen weiteren Hinweis, der für eine Restaktivität des endogenen CaM spricht, über die schon unter VII.1.2 spekuliert wurde. Darüber hinaus ist eine Ca^{2+} -unabhängige Interaktion durch Apo-CaM kein unbekanntes Phänomen (Rhoads und Friedberg, 1997). Da Cyt b5 ohne weitere zytosolische Faktoren in die ER-Membran inseriert (Anderson *et al.*, 1983; Haßdenteufel *et al.*, 2011; Stefanovic und Hegde, 2007) deuten die Ergebnisse auf eine direkte Interaktion von Ca^{2+} -CaM mit der hydrophoben Signalankersequenz von Cyt b5 hin, eine Tatsache, die nicht völlig unerwartet ist, wurde doch gezeigt, dass Ca^{2+} -CaM generell an amphiphile Helices (Fisher *et al.*, 1994) sowie an die hydrophobe, N-terminale Signalsequenz Sec61-abhängiger Vorstufenproteine bindet (Martoglio *et al.*, 1997; Shao und Hegde, 2011c). Der Mechanismus der TA-Insertionsinhibition durch Ca^{2+} -CaM wurde zudem in der Arbeitsgruppe Zimmermann mit vier weiteren TA-Membranproteinen, Synaptobrevin 2, Sec61 β , PTP1B und Ubc6 durch Sarah Haßdenteufel verifiziert und ferner eine direkte Interaktion zwischen Synaptobrevin 2 und CaM mittels Quervernetzungsexperimenten nachgewiesen (Haßdenteufel, 2011; Haßdenteufel *et al.*, 2011). CaM kann somit bei hohen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen die TA-MP-Insertion stoppen, was möglicherweise für Proteine von Bedeutung ist, die an der Vesikelfusion (Di Giovanni *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2002) oder der Apoptose (Hoyer-Hansen *et al.*, 2007) beteiligt sind. Eine weitere Möglichkeit wäre die Abschirmung der hydrophoben Signalankersequenz vor unspezifischen Interaktionen sowie der Aggregation im Zytosol und letztlich dem „targeting“ zur ER-Membran, ähnlich der Funktion von SRP, TRC40 oder Hsc70 bei der TA-MP-Insertion oder dem posttranslationalen ER-Import Sec61-abhängiger Substrate (Borgese und Fasana, 2011; Johnson *et al.*, 2012; Zimmermann *et al.*, 2011). Ein vergleichbarer Mechanismus wurde kürzlich für den posttranslationalen Transport von ppcca über den Sec61-Komplex beschrieben. Diese Untersuchungen zeigen ferner, dass eine Chaperonfunktion durch CaM nur unter physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. 100 nM) möglich ist, während erhöhte Konzentrationen über 100 μM ebenfalls zur Inhibition führen, mit dem Unterschied, dass hierbei die Interaktion zwischen CaM und dem Polypeptidsubstrat offensichtlich beeinträchtigt wird (Clapham, 2007; Shao und Hegde, 2011c). Um zu testen, ob es bei den TA-MP dennoch um einen ähnlichen Mechanismus handelt, müssten die oben genannten Experimente erneut unter physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen durchgeführt werden.

VII.1.4. Das Sec61 α -IQ-Motiv ist nicht essentiell für den Proteintransport und die Zellvitalität

Als Grundlage für die Untersuchungen der Ca²⁺-Homöostase sowie des *in vitro* Proteintransportes in das ER semi-permeabilisierter Zellen (SPZ) wurde ein in der Arbeitsgruppe Zimmermann etabliertes siRNA-Transfektionsprotokoll zur Depletion des Sec61 α -Proteins verwendet und darauf basierend die Komplementation der HeLa-Zellen mit Sec61 α bzw. Sec61 α -R24A/K29A (Sec61 α -IQ-Mutante) durchgeführt (Lang *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2011). Wie durch Sven Lang gezeigt wurde, führt die Sec61 α -Langzeitdepletion (120 h) mit zwei verschiedenen siRNAs bereits nach 96 h, dem Zeitpunkt der maximalen Proteinreduktion (ca. 10 % Restprotein), zu einer beginnenden Reduktion der Viabilität von HeLa-Zellen und resultiert letztlich in einem letalen Phänotyp, was somit bestätigt, dass das Sec61 α -Säugertierhomolog ein essentielles Protein in humanen Zellen darstellt (Lang, 2012). Ziel war es nun diese Ergebnisse als Basis für die funktionalen Analysen erfolgreich zu reproduzieren und zu untersuchen, ob eine Rettung der Zellen mittels *SEC61A1*- bzw. *SEC61A1*-R24A/K29A-Expression möglich ist. Sowohl hinsichtlich der Proliferation als auch der zellulären Integrität (VI.2.2.1) bestätigte sich der degenerative Einfluss der Sec61 α -Depletion auf die Zellen, welche nach 96 h bereits einen Rückgang der Zellzahl auf ca. 75 % im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen, allerdings noch eine durchaus hohe Viabilität zeigten (> 90 %). Somit eignet sich dieser Zeitpunkt sehr gut für eine Analyse der Proteinfunktion, während länger andauernde siRNA-Behandlungen zum Zelltod führen (Lang, 2012). Die ER-Morphologie (VI.2.2.3) wies nach 96 h *SEC61A1* siRNA-Behandlung entsprechend auch keine lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderung auf, was von ebenso großer Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse der Untersuchungen ist. Eine Veränderung der Struktur oder auch des Volumens des ER würde hierbei auf gravierende Umverteilungen ER-residenter Proteine hindeuten, Nebeneffekte die sich sowohl auf den Ca²⁺-Haushalt als auch den Proteintransport über die ER-Membran auswirken können (Puhka *et al.*, 2007; Shibata *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2006). Eine wichtige Fragestellung war nun, ob durch Plasmid-Expression der *SEC61A1*-cDNA eine funktionale Komplementation der Sec61 α -depletierten HeLa-Zellen möglich ist. Durch Sven Lang wurde bereits gezeigt, dass mittels *SEC61A1*-Expression nach 96 h Sec61 α -Depletion eine partielle Rettung des *in vitro* Proteintransportes ins ER von SPZ erreicht und auch der Level sekundär reduzierter Proteine wie Sec61 β , Sec61 γ oder ERj1 wieder rekonstituiert wird (Lang, 2012). Dennoch hängt die Zellviabilität von einer Vielzahl von Faktoren ab, weswegen Sekundäreffekte nicht ausgeschlossen sind. Wie unter VI.2.2.2 gezeigt, wurden daher Langzeituntersuchungen der Zellproliferation und der Plasmamembranintegrität diverser Rettungsansätze bis zu 144 h nach siRNA-Behandlung durchgeführt. Der Proteinlevel lag nach Sec61 α -Depletion bis zum Zeitpunkt 120 h bei ca. 20 % und stieg anschließend wieder an (40 %). Auch im Fall der Rettung mittels *SEC61A1*- sowie *SEC61A1*-R24A/K29A-Plasmid befand sich der Sec61 α -Gehalt nach 96 h bei ca. 80 %, reduzierte sich jedoch ab 120 h auf ca. 60 % (Abbildung 33). Beide Effekte sind auf die jeweils

transiente Transfektionsprozedur zurückzuführen. Die teilweise Wiederherstellung des Proteinlevels in den *SEC61A1*-UTR siRNA behandelten Zellen rührt zudem auch daher, dass die Transfektion mittels Lipofektion stets unvollständig ist (ca. 80 %), wie auch anhand der GFP-Fluoreszenz nach Plasmidtransfektion in Abbildung 12 (V.2.4.6) zu sehen ist. Daher handelt es sich vermutlich bei einem Teil der Zellen um eine Subpopulation untransfizierter Zellen, die durch den Besitz von Sec61 α -Protein einen Wachstumsvorteil besitzen. Für Langzeituntersuchung wäre eine stabile Transfektion der HeLa-Zellen geeigneter, da so aufgrund des Selektionsdrucks praktisch alle Zellen ein Plasmid enthalten.

Während die Sec61 α -depletierten Zellen ab dem Zeitpunkt 96 h stetig an Viabilität verloren und deren Proliferation stagnierte, bewegten sich beide Parameter im Fall der Zellen, die eines der *SEC61A1*-Plasmide exprimierten, im Bereich der Kontrollzellen. Damit können zwei wichtige Erkenntnisse festgehalten werden. i) Der letale Phänotyp der Sec61 α -Depletion kann durch *SEC61A1*-Expression kompensiert werden, was nochmals die Spezifität der siRNA unterstreicht. ii) Darüber hinaus repräsentiert die Sec61 α -IQ-Mutante eine Sec61 α -Kopie, welche unter Standardbedingungen gleichermaßen synthetisiert sowie in die ER-Membran intrigiert wird und alle Eigenschaften aufweist, um ebenso ein Überleben der humanen Zelllinie unter Standardbedingungen zu gewährleisten. Eine derart essentielle Eigenschaft stellt auch der Proteintransport ins ER dar (Park und Rapoport, 2012). Daher war es auch nicht verwunderlich, dass die Translokationseffizienz des Modells substrates ppl nicht nur in den *SEC61A1*-, sondern insbesondere auch in den *SEC61A1*-R24A/K29A-tranfizierten Zellen nach endogener Sec61 α -Depletion (96 h) wieder entsprechend dem partiell wiederhergestellten Sec61 α -Proteinlevel (70-90 %) auf 80 % der Kontrollzellen rekonstituiert wurde (Abbildung 37, A, B). Wie bereits von Martin Jung nachgewiesen wurde, bindet CaM *in vitro* Ca²⁺-abhängig das N-terminal lokalisierte, zytosolische IQ-Motiv von Sec61 α , was durch die beiden Punktmutationen R24A und K29A jeweils spezifisch inhibiert wird (Erdmann *et al.*, 2011). Demnach kann auch davon ausgegangen werden, dass auf zellulärer Ebene keine Interaktion zwischen CaM und Sec61 α -R24A/K29A erfolgt. Den Untersuchungen dieser Arbeit zufolge wird durch den Aminosäureaustausch an den beiden Positionen folglich nicht die Dynamik des Sec61-Komplexes sowie dessen grundsätzliche Fähigkeit Ribosomen und Signalsequenzen zu binden beeinträchtigt. Allerdings wurde in einem analogen Rettungsexperiment durch Sven Lang demonstriert, dass ein mit der Diabetes-assoziierten Sec61 α -Y344H-Mutante rekonstituierter Translokationskomplex auch in der Lage ist ppl effizient zu transportieren, aber einen Transportdefekt für Substrate wie ppcecA oder ERj3 aufweist (Schäuble *et al.*, 2012). Daher müssten auch im Fall der Sec61 α -IQ-Mutante weitere Vorläufer getestet werden, welche weniger effiziente Signalsequenzen wie ppl besitzen und somit in ihrer Fähigkeit den Translokationskanal zu öffnen potentiell beeinflusst werden (Kim *et al.*, 2002; Schäuble *et al.*, 2012). Da ein Fehlen von CaM im Retikulozytenlysat den posttranslationalen *in vitro* Transport von ppcecA, nicht jedoch den cotranslationalen *in vitro* Transport des Prionproteins (Pr1), über den Sec61-Komplex inhibiert, könnte das Sec61-IQ-Motiv als potentieller ER-Membranrezeptor für zytosolische CaM-

Substrat-Komplexe dienen (Shao und Hegde, 2011c). Eine Untersuchung des posttranslationalen Transportes würde daher auch weiteren Aufschluss über den besagten Mechanismus liefern. Zumindest die posttranslationale Insertion des „tail-anchored“-Membranproteins Syb2 (Abbildung 37, B) in die ER-Membran ist nicht durch das Fehlen des IQ-Motivs betroffen. Auch wenn diese Tatsache einen derartigen Mechanismus nicht gänzlich ausschließt, spricht dies zumindest für eine Redundanz der zytosolischen „targeting“-Systeme bezüglich des posttranslationalen ER-Imports.

VII.1.5. CaM reguliert den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER nach Termination der Proteinsynthese

Eine der wichtigsten Zielsetzungen dieser Arbeit war die Aufklärung der potentiellen Rolle von CaM bei der Regulation der Ionenpermeabilität des humanen Sec61-Komplexes auf zellulärer Ebene. Das ER fungiert nicht nur als Eintrittsort für neu synthetisierte Polypeptide in den Sekretionsweg und organisiert deren Faltung und Sortierung, sondern stellt auch einen dynamischen Ca^{2+} -Speicher für die intrazelluläre Signalweiterleitung dar (Ashby und Tepikin, 2001; Berridge, 2002; Braakman und Bulleid, 2011; Zimmermann *et al.*, 2011). Während dem Transport von Proteinen über den Sec61-Komplex muss daher die Permeabilität für Ca^{2+} und andere kleine Ionen streng kontrolliert werden. Diese Permeabilitätsbarriere wird zwar vermutlich bei vollständiger Insertion und Passage einer Polypeptidkette weitestgehend gewährleistet (Crowley *et al.*, 1994), allerdings ist der Kanal in der frühen Phase der Translokation (Hamman *et al.*, 1998) sowie nach Termination des Translokationsprozesses permeabel für kleine Moleküle und Ionen (Roy und Wonderlin, 2003). Während der Sec61-Komplex von Hefen und Säugetieren unter derartigen Bedingung Eigenschaften eines Ionenkanals aufweist scheint der homologe bakterielle SecYEG keine Konduktivität zu besitzen (Erdmann *et al.*, 2010; Harsman *et al.*, 2011c; Lang *et al.*, 2011; Saparov *et al.*, 2007; Simon und Blobel, 1991; Wirth *et al.*, 2003). Eine Reihe von Studien zeigen anhand von Ca^{2+} -Messungen in lebenden Säugetierzellen und der Verwendung von Proteinsyntheseinhibitoren, dass die Proteintranslokase nach dem Transport, unabhängig von der Bindung eines Ribosoms, transient die Passage von Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol gestattet (Flourakis *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007; Van Coppenolle *et al.*, 2004), obwohl zumindest anhand von *in vitro* Experimenten das Hsp70-Chaperon BiP als ER-luminaler „Pfortner“ der Translokase postuliert wird (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998). Dass allerdings auf zytosolischer Seite die alleinige Bindung des Ribosoms nicht genügt, ist in Anbetracht zweier Aspekte plausibel. i) Auch wenn in Säugetierzellen der cotranslationale Proteintransport vorherrscht (Blobel und Dobberstein, 1975b; Görlich *et al.*, 1992) müsste zumindest unter posttranslationalen Bedingungen ein divergenter Mechanismus genutzt werden. ii) Anhand aktueller Kryo-EM-Strukturen (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008) wird deutlich, dass zwischen der Porenöffnung des Sec61-Komplexes und dem assoziierten Ribosom ein Spalt mit ausreichender Größe verbleibt, der die Diffusion von kleinen

Molekülen und Ionen gewährt (Abbildung 62, A). Unter physiologischen Bedingungen könnten daher auch insbesondere bei hohen Translokationsraten großen Mengen Ca^{2+} ins Zytosol freigesetzt werden. Insbesondere im Bereich der Porenöffnung von Ca^{2+} -Kanälen, bilden sich sogenannte Ca^{2+} -Nanodomänen, welche hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. 10 μM) erreichen und so zur Öffnung benachbarter IP_3 - oder Ryanodin-Rezeptoren („ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release“; CICR) führen können (Berridge, 2006; Berridge *et al.*, 2000; Clapham, 2007). Dieser ca. 100 Å umfassende Bereich reicht jedoch auch aus, um mehr als zehn CaM-Moleküle zu beherbergen und deren Aktivierung zu bewirken (Naraghi und Neher, 1997). Untersuchungen der Leitfähigkeit von rekonstituierten Proteoliposomen und rauen Hundepankreas-mikrosomen mittels Einzelkanalmessungen zeigen, dass die Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes bereits durch Zugabe von 500 nM CaM (+ 13 mM Ca^{2+}) inhibiert wird (Erdmann *et al.*, 2011). Sec61 α weist ferner ein zytosolisch zugängliches IQ-Motiv auf, welches Ca^{2+} -CaM mit hoher Affinität (K_d im nM-Bereich) bindet (Erdmann *et al.*, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Messung zytosolischer wie auch ER-luminaler Ca^{2+} -Änderungen gezeigt, dass der Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER sowohl durch CaM-Antagonismus (Ophiobolin A und TFP) gesteigert (VI.1.2.1; VI.2.4.1; VI.2.4.3), als auch durch CAM-GFP-Expression unterdrückt (VI.1.2.3) werden kann. Die durch die CaM-Inhibition unmittelbar hervorgerufene Efflux-Erhöhung war dabei derart stark ausgeprägt, dass eine vollständige Kompensation durch die SERCA offensichtlich nicht möglich war, was als Reduktion der ER-luminalen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet wurde (VI.1.2.2; VI.1.2.4; VI.2.4.2). Ferner wurde der Effekt der CaM-Inhibition durch siRNA-vermittelte Depletion von Sec61 α gehemmt und somit gezeigt, dass der limitierende Einfluss von CaM auf den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER tatsächlich auf Ebene des Sec61-Komplexes erfolgt (VI.2.4.1; VI.2.4.2; VI.2.4.3). Bei dem nach 96 h Sec61 α -Depletion beobachteten Rückgang der zellulären Gesamtkonzentration an freiem Ca^{2+} (Abbildung 39) handelt es sich vermutlich um einen sekundären Effekt, der keinen direkten Einfluss auf den passiven Ca^{2+} -Ausstrom hat, da auch nach 48 h siRNA-Behandlung bereits eine signifikante Reduktion des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms gezeigt wurde (Abbildung 40, B, C). Ferner muss es sich bei dieser Ca^{2+} -Reduktion nicht zwangsläufig um eine Abnahme von ER-luminalem Ca^{2+} handeln. Da das ER unter anderem mit Mitochondrien assoziiert ist und diese wiederum Ca^{2+} aus dem ER aufnehmen können (Lebiedzinska *et al.*, 2009), wäre ebenso denkbar, dass nach maximaler Sec61 α -Depletion und der damit verbundenen Abnahme des passiven Ca^{2+} -Ausstroms weniger Ca^{2+} durch die Mitochondrien akkumuliert wird, was letztlich nach Ionomycin-gabe in der Bilanz einen verminderten Ca^{2+} -Gehalt liefert. Durch die Verwendung ratiometrischer, ER-luminaler Ca^{2+} -Indikatoren, wie z.B. Mag-Fura-2, könnte durch präzise Kalkulation der Ca^{2+} -Konzentration im ER-Lumen untersucht werden, ob tatsächlich eine Abnahme des Ca^{2+} -Gehaltes im ER nach Langzeitdepletion von Sec61 α erfolgt.

RNAi-basierte Untersuchungen an *Drosophila* S2-Zellen zeigen ferner auch eine verringerte SOCE-Aktivierung nach Sec61 α -Depletion (Zhang *et al.*, 2006). Dies bekräftigt nochmals die Ergebnisse zur Analyse der Reduktion von Ca^{2+} im ER nach Zugabe der CaM-Antagonisten und ferner der

zusätzlichen *SEC61A1* siRNA-Behandlung (VI.1.2.2). Trotzdem müssen die Daten im Kontext der Thapsigargin- und Ionomycin-Experimente gesehen werden, da CaM sowohl PMCA als auch CRAC-Kanäle zu aktivieren vermag und die beobachteten Effekte somit unspezifisch sein könnten (Moreau *et al.*, 2005; Tidow *et al.*, 2012). Wie anhand der vorangegangenen Untersuchungen zu erwartet war, wurde durch Expression der *SEC61A1*-cDNA der Phänotyp der Sec61 α -Depletion wieder aufgehoben, wodurch die Spezifität siRNA-Behandlung bestätigt wurde. Basierend auf den Peptidspot-Analysen wurden zwei Punktmutationen (R24A und K29A) in die *SEC61A1*-cDNA eingeführt, welche innerhalb des zytosolischen IQ-Motivs lokalisiert sind und *in vitro* essentiell für die Ca²⁺-abhängige Bindung von CaM sind (Erdmann *et al.*, 2011). Die zelluläre Expression der *SEC61A1*-IQ-Mutante war trotz einer dem Wildtyp vergleichbaren Proteinkonzentration nicht in der Lage den Wildtyp-Phänotyp (Erhöhter Ca²⁺-Leckstrom nach CaM-Inhibition) wiederherzustellen. Vielmehr wiesen die Zellen, die mit dieser Sec61 α -Variante komplementiert wurden, unabhängig von der Behandlung mit CaM-Antagonisten, einen generell erhöhten Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER auf (VI.2.4.3). Diese Beobachtung bestätigt indirekt die Interaktion von CaM mit dem Sec61-Komplex auf zellulärer Ebene, da durch die defekte, *in vitro* verifizierte CaM-Bindungsstelle, der gleiche Effekt auf den passiven Ca²⁺-Ausstrom zu sehen war, der bereits durch CaM-Inhibition hervorgerufen wurde. Somit handelt es sich bei Sec61 α -R24A/K29A offensichtlich um eine ansonsten funktionale Sec61 α -Kopie, welche nicht mehr durch CaM reguliert werden kann und daher eine konstant erhöhte Ca²⁺-Permeabilität aufweist. Diese Tatsache wird ferner durch folgende Aspekte bekräftigt: i) Auch in Kontroll siRNA-behandelten Zellen bewirkt die *SEC61A1*-R24A/K29A-Expression im Gegensatz zum Wildtyp (in beiden Fällen ca. 150 % Proteingehalt) einen *per se* erhöhten Ca²⁺-Efflux, jedoch mit einer gleichzeitigen Sensitivität gegenüber CaM-Antagonisten, was für eine Koexistenz beider Sec61 α -Varianten in diesen Zellen spricht. ii) Sec61 α -R24A/K29A-komplementierte Zellen sind unter Standardbedingungen völlig vital und weisen zumindest beim ER-Import von ppl eine vollständige Translokationskompetenz auf. iii) Da diese funktionale Sec61 α -Kopie auch keinen verstärkten ER-Import bewirkt, ähnlich einer prl-Mutante („protein localization“), welche eine reduzierte Genauigkeit der Signalpeptiderkennung aufweisen, indem sie die geschlossene Konformation des Translokationskanals destabilisieren (Trueman *et al.*, 2011), scheint auch das „gating“ des Sec61-Komplex vom geschlossenen in den offenen Zustand nicht beeinflusst zu sein. Diese Hypothese müsste jedoch zusätzlich mit weiteren Modells substraten verifiziert werden, da sich Modulationen der Proteintranslokase oftmals substratspezifisch auswirken können (Lang *et al.*, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Auch wenn der Proteinimport generell nicht beeinflusst ist, weisen *SEC61A1*-R24A/K29A-komplementierte Zellen möglicherweise einen erhöhten Energiebedarf auf, um passiv entweichendes Ca²⁺ über die SERCA zurück ins ER zu pumpen. Daher könnte zum einen der ATP-Verbrauch der Zellen überprüft werden, indem [³²P]-markiertes ATP ins Kulturmedium zugesetzt wird und anschließend die Radioaktivität der Zellen quantifiziert wird. Ferner kann eine vergleichende Western-

VII. Diskussion

Blot-Analyse durchgeführt werden, um eine potentielle Regulation des SERCA-Gehaltes zu überprüfen.

Letztlich stellt sich die Frage, wieso in Zellen mit erhöhtem Sec61 α -Level (Kontroll siRNA + *SEC61A1*-Plasmid) kein verstärkter Ca²⁺-Leckstrom zu beobachten ist. Eine simple Erklärung liefert hierbei die Tatsache, dass neben der Sec61 α -Untereinheit zumindest die Sec61 γ essentiell ist und auch die Sec61 β entscheidend zur Transporteffizienz beiträgt (Park und Rapoport, 2012). Auch wurde eine Ionenkonduktivität nur für den heterotrimeren Sec61-Komplex gezeigt (Erdmann *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 1989; Wirth *et al.*, 2003). Demnach bildet die porenbildende Sec61 α -Untereinheit vermutlich auch nur in Assoziation mit der α - und γ -Untereinheit einen Ca²⁺-permeablen Komplex. Eine plausible Erklärung liegt in der Anzahl aktiver Translokasen, die auch bei erhöhter Konzentration von Sec61-Komplexen mit individueller Funktionalität nicht alle angesteuert werden, da entweder die Proteinsyntheserate (~ 6 AS-Reste/Sekunde) oder Komponenten der „targeting“-Maschinerie, wie beispielsweise der SRP, begrenzend sind. Zumindest in Hefen liegt das Verhältnis von SRP zu Ribosomen bei ca. einem SRP pro 40 Ribosomen und *in vivo* Untersuchungen der „targeting“-Kinetiken in COS-1-Zellen zeigen, dass ca. 10 s benötigt werden, um ein SRP-abhängiges Substrat an die ER-Membran zu dirigieren (Goder *et al.*, 2000; Raue *et al.*, 2007; Shao und Hegde, 2011c). Weitere Hinweise für die Spezifität des Mechanismus der Sec61-Regulation durch CaM liefern zudem Bindungsstudien, die belegen, dass weder das zum IQ-Peptid korrespondierende N-terminale Peptid des Hefe-Orthologs Sec61p noch des bakteriellen SecY in der Lage sind CaM zu binden. Das IQ-Motiv selbst ist jedoch in allen höheren Eukaryoten konserviert. Diese Tatsache ist ferner plausibel, da Prokaryoten keine Ca²⁺-Signalweiterleitung vergleichbar zu Säugetierzellen besitzen und auch in Hefen trotz dem grundsätzlichen Vorhandensein einer Ca²⁺-Homöostase, diese Reaktionen wesentlich langsamer ablaufen und die Vakuole anstelle des ER als Hauptspeicher für Ca²⁺ dient. Zudem besitzt das ER in Hefen neben der relativ niedrigen Ca²⁺-Konzentration (< 10 μ M) weder IP₃- oder Ryanodin-Rezeptoren noch ATPasen der SERCA-Familie. Daher ist trotz der Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes in Hefe vermutlich der Ca²⁺-Leckstrom derart gering, dass er keiner zusätzlichen Regulation durch CaM bedarf (Cui *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2011; Harsman *et al.*, 2011c).

Der Mechanismus der Ca²⁺-Leckstrom-Regulation durch CaM in Säugetierzellen könnte demnach wie folgt aussehen: Während der Passage einer (naszierenden) Polypeptidkette durch den Sec61-Komplex ist der Kanal weitgehend impermeabel für Ionen und kleine Moleküle. ii) Nach Freisetzung der Polypeptidkette ins ER-Lumen oder die ER-Membran ist der Sec61-Kanal noch geöffnet und demnach transient permeabel für Ca²⁺. Diese ausströmenden Ionen aktivieren CaM-Moleküle in der sich um die Porenöffnung bildenden Ca²⁺-Nanodomäne und rekrutieren diese zum Sec61 α -IQ-Motiv. iii) Durch die Interaktion wird die Schließung des Kanals induziert, der Ca²⁺-Leckstrom minimiert und somit die Permeabilitätsbarriere gewahrt. Der Struktur des Sec61-Komplexes zufolge wird der „pore plug“ durch die Helix 2a von Sec61 α gebildet, welche wiederum mit den TMD 1 und 2 verbunden ist. Da die

Öffnung des Kanals durch das Interkalieren der Signalsequenz zwischen TMD 2b und 7 erfolgt und dadurch der „pore plug“ aus dem Zentrum der Pore gerückt wird, wäre aufgrund der unmittelbaren Verbindung ein entgegengesetzter Einfluss der Ca^{2+} -CaM-Bindung an das IQ-Peptid oberhalb der TMD 1 auf diesen Mechanismus denkbar. Aufgrund der Aktivität von SERCA wird schließlich zytosolisches Ca^{2+} im Bereich des Sec61-Komplexes wieder ins ER zurückgepumpt und damit vermutlich indirekt die Dissoziation von CaM induziert, welches daraufhin wieder in einen neuen Zyklus übergehen kann. Studien zeigen diesbezüglich eine Kollagensynthese-abhängige Interaktion von SERCA2b mit TRAM2, wobei letzteres eine 53 %-ige Sequenzhomologie zum Translokations-assoziierten TRAM aufweist und ebenfalls als Komponente der Proteintranslokase postuliert wird. Somit scheint SERCA in translokationsaktiven Regionen angereichert zu sein (Stefanovic *et al.*, 2004), was eine unmittelbare Entfernung von Ca^{2+} aus den genannten Nanodomänen plausibel erscheinen lässt. Grundsätzlich ähnelt der Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen CaM-Bindung an Sec61 α der negativen Rückkopplung bei der sogenannten Ca^{2+} -abhängigen Inaktivierung („ Ca^{2+} -dependent inactivation“; CDI), einem verbreitetem Phänomen bei diversen Ionenkanälen (Dick *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Zuhlke *et al.*, 1999). Da CaM auch in der Lage ist, die durch die SPPase (Signalpeptidpeptidase) gespaltenen N-terminalen Signalpeptide von Vorläuferproteinen zu binden, wäre auch eine zusätzliche Regulation der Dissoziation von Ca^{2+} -CaM vom IQ-Motiv über einen derartigen Mechanismus im Rahmen einer Translokation denkbar (Martoglio und Dobberstein, 1998). Durch die Arbeitsgruppe von Prof. Volkhard Helms (Bioinformatik, Universität des Saarlandes) wurde auf Basis der Kryo-EM-Struktur des Sec61-Komplexes mit gebundenem Ribosom (Becker *et al.*, 2009) und der Kristallstruktur des Ca^{2+} -gebundenen Calmodulin eine *in silico* Interaktionsanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Ca^{2+} -CaM nahezu perfekt in die Lücke zwischen Ribosom und Sec61-Komplex passt, was nicht nur einen weiteren Beleg für die Plausibilität dieses Mechanismus liefert, sondern ferner auch zeigt, dass CaM und Ribosomen simultan an den Sec61-Komplex binden können (Abbildung 62, A, B). Letzteres geht auch mit der Tatsache konform, dass Ca^{2+} -CaM nicht mit dem cotranslationalen Import von Proteinen ins ER interferiert (Erdmann *et al.*, 2011).

Um der Frage nachzugehen, welche Ursache der initiale, sukzessive Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Behandlung mit CaM-Antagonisten hat, können aufgrund der vielfältigen Funktionen von CaM nur Spekulationen angestellt werden. Ein naheliegender Schluss wäre jedoch eine indirekte Hemmung der PMCA, welche im Gegensatz zu Ca^{2+} -Austauschern (NC(K)X) eine hohe Ca^{2+} -Affinität besitzt und dazu beiträgt den Ca^{2+} -Ruhelevel im Zytosol aufrechtzuerhalten. Da die PMCA durch Ca^{2+} -CaM aktiviert wird, die Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit jedoch auch zeigen, dass die SERCA den erhöhten Ca^{2+} -Efflux nach CaM-Inhibition nicht kompensieren kann, wäre eine langsame Akkumulation von Ca^{2+} im Zytosol plausibel (Blaustein *et al.*, 2002; Clapham, 2007; Monesterolo *et al.*, 2008).

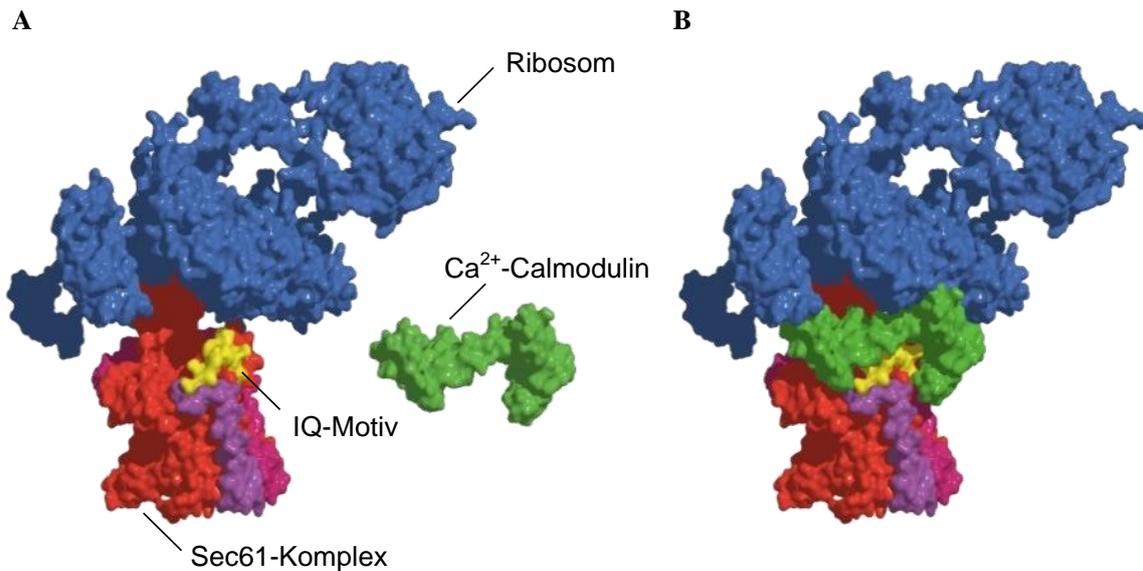


Abbildung 62: Molekulares Modell des Sec61-Ribosom-Komplexes **A**) ohne und **B**) mit gebundenem Ca²⁺-Calmodulin (nach Erdmann *et al.*, 2011). Die Kryo-Elektronenmikroskopiestruktur des Sec61-Komplexes (Sec61 α = rot; Sec61 β = lila; Sec61 γ = rosa) aus Säugetierzellen mit assoziiertem Ribosom (Becker *et al.*, 2009) wurde verwendet, um die potentielle Interaktion von Ca²⁺-Calmodulin (Kristallstruktur; grün) mit dem Sec61 α -IQ-Motiv (gelb) mit Hilfe einer „docking“-Analyse zu überprüfen. Hierbei wurde zuerst die Interaktion mit Ca²⁺-Calmodulin in Abwesenheit des Ribosoms überprüft. Die 50 energetisch günstigsten Interaktionsmodi wurden ausgewählt und die Strukturen verworfen, die mit der ER-Membran oder dem Ribosom kollidieren. Die übrigen Strukturen waren sehr ähnlich und zeigten alle eine Interaktion des C-terminalen CaM-Bereichs mit dem IQ-Motiv. Durch Vorhersage der Position der ER-Membran wurde zudem gezeigt, dass das IQ-Motiv zytosolisch zugänglich ist. Außerdem wird durch die CaM-Bindung die Lücke zwischen Ribosom und Sec61-Komplex ausgefüllt ohne die Translokationspore zu blockieren, was somit eine CaM-Bindung bei simultaner Translokation theoretisch ermöglicht.

Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Sec62-Depletion ebenfalls zur Steigerung des passiven Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER führt und einen generell erhöhten, zytosolischen Ca²⁺-Level hervorruft (Greiner *et al.*, 2011b; Lang, 2012). Sec62-Reduktion inhibiert ferner die Migrationsfähigkeit diverser Karzinomzellen und erhöht generell die Sensitivität gegenüber ER-Stress durch Thapsigargin (Greiner *et al.*, 2011a). Die besagten Effekte werden durch die Behandlung mit den beiden CaM-Antagonisten Ophiobolin A und TFP imitiert (Markus Greiner, persönliche Mitteilung). Da Sec62 als Translokations-assoziierte Komponente auch den Proteintransport ins ER beeinflusst (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012; Tyedmers *et al.*, 2000) könnte es ebenfalls die Permeabilität des Sec61-Komplexes beeinflussen, indem entweder durch direkte Interaktion mit dem Translokon oder durch Beteiligung an der Rekrutierung von CaM zum IQ-Motiv dessen Öffnungswahrscheinlichkeit moduliert. Ein weiterer Hinweis für eine Ca²⁺-abhängige Regulation stellen die zwei putativen, im N-Terminus identifizierten EF-Handmotive dar, welche nicht nur die Resistenz gegenüber Thapsigargin, sondern vielmehr vermutlich die Ca²⁺-modulierbare Interaktion von Sec62 mit Sec61 α beeinflussen (Markus Greiner und Martin Jung, persönliche Mitteilung).

VII.2. Exotoxin A inhibiert die Öffnung des Sec61 α -Komplexes

Exotoxin A (ExoA) ist ein bakterielles Toxin aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches über Endozytose in Säugetierzellen aufgenommen wird und retrograd mit Hilfe eines C-terminalen KDEL-Motivs ins ER gelangt. Von dort aus wird es schließlich ins Zytosol exportiert, wo es den eukaryotischen Elongationsfactor 2 (EF2) durch eine ADP-Ribosylierung inhibiert (Jackson *et al.*, 1999; Pavlovskis *et al.*, 1978). Ähnlich wie eine Reihe weiterer Exotoxine, (z.B. Ricin oder Cholera toxin) ist auch ExoA in der Lage, als ERAD-Substrat maskiert, den Sec61-Komplex als Exportkanal zu nutzen, jedoch weitgehend einer proteasomalen Degradation im Zytosol zu entgehen (Koopmann *et al.*, 2000; Lord *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1999). ExoA ist nicht nur zusammen mit Sec61 α präzipitierbar, sondern auch in der Lage mit dem Export antigener Peptide und sogar als nicht-toxische Form („non-toxic“ ExoA) mit dem eigenen Export (des aktiven ExoA) zu interferieren (Challa *et al.*, 2007; Giodini *et al.*, 2009; Koopmann *et al.*, 2000). Ferner vermag es auch die Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes zu modulieren, indem es von zwei Hauptöffnungszuständen denjenigen mit hoher Konduktivität inhibiert (Wirth *et al.*, 2003). Innerhalb dieser Arbeit wurde ein inhibierender Einfluss der ExoA-Behandlung auf den Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER beobachtet (Abbildung 43, A, B). Die ExoA-Konzentration von 5 μ g/ml entspricht dabei etwa der von Wirth *et al.* verwendeten Konzentration (30 nM) (Wirth *et al.*, 2003), allerdings wurde die Toxin-Lösung aufgrund der Verwendung intakter Zellen, im Gegensatz zu den Versuchen mit Proteoliposomen (mit rekonstituiertem Sec61-Komplex), zur Erhöhung der biologischen Aktivität, vor der Applikation auf 37 °C erwärmt. Zudem wurden die Zellen vor der Demaskierung des Ca²⁺-Leckstroms zunächst 10 min mit dem Toxin inkubiert, um eine Internalisierung und den Transport durch den Sekretionsweges bis zum ER zu ermöglichen. Übereinstimmend mit den bisherigen Daten und entsprechend der Annahme, dass ExoA unter zellulären Bedingungen an den Sec61-Komplex bindet und dessen dynamisches Gleichgewicht zum geschlossenen Zustand verschiebt, zeigte auch die Messung der Gesamtkonzentration an freiem zellulärem Ca²⁺ mittels Ionomycin keinen Ca²⁺-Verlust, sondern vielmehr eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung gegenüber der Pufferkontrolle (Abbildung 43, C, D). Da die Zellen im Ca²⁺-freien Puffer (0,5 mM EGTA) kein weiteres Ca²⁺ akkumulieren können, spricht dieser Unterschied für einen (schnelleren) Verlust von ER-luminalem Ca²⁺ in den Kontrollzellen durch den generellen Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER, welcher in HeLa-Zellen mit einer Flussrate von 100–200 μ M/min nicht unerheblich ist. Zwar wird ein Großteil des Ca²⁺ durch die Aktivität der SERCA wieder ins ER-Lumen zurückbefördert, jedoch bewirkt die PMCA auch eine Freisetzung von Ca²⁺ in den extrazellulären Raum, welches dort durch die hohe EGTA-Konzentration chelatiert wird. Da der Sec61-Komplex in HeLa-Zellen zu etwa 60 % zum Ca²⁺-Leckstrom beiträgt, wäre eine Reduktion des Ca²⁺-Ausstroms in ExoA behandelten Zellen aufgrund einer Modulation des Kanals denkbar (Camello *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2011; Strehler und Treiman, 2004).

Die Daten bestätigen daher die postulierte Bindung von ExoA an den Sec61-Komplex, welcher infolgedessen nicht mehr vollständig öffnen kann und eine geringere Permeabilität für Ca²⁺ aufweist.

Innerhalb der Arbeitsgruppe Zimmermann wurde anhand von Sec61 α -Peptidspot-Analysen gezeigt, dass ExoA an die gleiche ER-luminale Region von Sec61 α („loop“ 7) bindet wie das BiP-Protein (Martin Jung, persönliche Mitteilung). Da BiP die Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes *in vitro* reduzieren kann, wäre daher eine vergleichbare, jedoch irreversible Modulation des Translokons durch das ExoA vorstellbar (Alder *et al.*, 2005; Hamman *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen zeigen zudem auch eine spezifische Bindung des ExoA an Peptide korrespondierend zum IQ-Motiv von Sec61 α , welche durch Zugabe von Ca²⁺-CaM kompetierbar ist (Martin Jung, persönliche Mitteilung). Welche physiologische Bedeutung diese Modulation durch ExoA jedoch hat, müsste in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Eine weitere offene Frage betrifft die relativ kurze Behandlungsdauer der HeLa-Zellen mit ExoA. Da das Toxin erst über die Plasmamembran aufgenommen und schließlich über Endosomen, Golgi-Apparat und COPI-Vesikel ins ER gelangen muss, könnte die Zeit nicht ausreichen, um zum Sec61-Komplex zu gelangen. Untersuchungen verschiedener Exotoxine zeigen, dass ExoA zumindest nach 1 h bereits eine 96 % Proteinsynthesehemmung in Maus LM-Fibroblasten hervorruft (Saelinger *et al.*, 1985). Da dieser Effekt bereits stromabwärts und somit zeitlich nach der Sec61-Modulation erfolgt, ist eine Internalisierung innerhalb von 10 min nicht unwahrscheinlich. Um dies zu überprüfen könnte eine fluoreszenzmarkierte ExoA-Variante verwendet werden, mit deren Hilfe die Aufnahme ins ER mikroskopisch nachverfolgt wird bzw. könnte nach Aufnahme von ExoA eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie fixierter Zellen durchgeführt werden. Ferner wäre auch eine Co-Immunopräzipitation von Sec61 α mit radioaktiv-markiertem ExoA nach 10-minütiger Behandlung von HeLa-Zellen, vergleichbar zur Vorgehensweise durch Koopmann *et al.*, denkbar (Koopmann *et al.*, 2000).

VII.3. Charakterisierung der Funktionen von BiP

Von allen ER-luminalen Faltungsenzymen stellt das Hsp70-Chaperon BiP nicht nur eines der abundantesten Proteine des ER dar (Mayer und Bukau, 2005; Weitzmann *et al.*, 2007), sondern weist auch eine Vielzahl wichtiger Funktionen zur Aufrechterhaltung der ER-Homöostase auf. Hierzu zählt die Assoziation mit neusynthetisierten und fehlgefalteten Polypeptiden und damit die Beteiligung an der Qualitätskontrolle von Proteinen (Blount und Merlie, 1991; Bukau *et al.*, 2006; Kassenbrock *et al.*, 1988; Kleizen und Braakman, 2004). Ferner besitzt BiP eine wichtige Rolle beim co- sowie posttranslationalen Proteintransport über die ER-Membran (Klappa *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 2012; Matlack *et al.*, 1999; Nicchitta und Blobel, 1993; Tyedmers *et al.*, 2003). Dabei erfolgt offensichtlich nicht nur eine Interaktion mit dem Importsubstrat, sondern auch direkt mit dem Translokon, da BiP *in vitro* die Ionenpermeabilität der Translokase zu reduzieren vermag (Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998; Wirth *et al.*, 2003). Außerdem dient es als eines der wichtigsten Ca²⁺-bindenden ER-Proteine auch direkt der Pufferung von ER-luminalem Ca²⁺ (Coe, 2009; Lievremont *et al.*, 1997; Michalak *et al.*, 2002). Die Bedeutung für die ER-Homöostase wird nicht

zuletzt auch durch die Tatsache bekräftigt, dass das molekulare Chaperon an der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) beteiligt ist und ein Hauptregulator der UPR ist (Beggah *et al.*, 1996; Bertolotti *et al.*, 2000; Chillaron und Haas, 2000; Sitia und Braakman, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die *BIP* siRNA-Behandlung von HeLa-Zellen hinsichtlich ihrer Spezifität mit Hilfe einer Plasmid-gestützten Rettung durch Untersuchung der Zellproliferation und der UPR-Induktion überprüft. Außerdem wurde der Einfluss der *BIP*-Expressionsmodulation auf den Proteintransport ins ER und insbesondere auf die Ca^{2+} -Homöostase des ER analysiert. Zuletzt wurde versucht die potentielle Interaktion zwischen BiP und Sec61 α auf zellulärer Ebene nachzuweisen.

VII.3.1. Die siRNA-vermittelte BiP-Depletion führt zur UPR-Aktivierung und Inhibition der Zellproliferation

Zur Depletion des BiP-Proteins wurden HeLa-Zellen basierend auf einem etablierten RNAi-Protokoll mit zwei verschiedenen siRNAs gegen die *BIP*-mRNA transfiziert (Cappel, 2011; Schäuble *et al.*, 2012). Wie unter Punkt VI.3.1 dargestellt, gelang es den zellulären BiP-Gehalt nach 48 h bereits durchschnittlich auf ca. 30 % und nach 72 h auf ca. 25 % im Vergleich zur Kontrolle zu reduzieren. Die Reduktion befand sich dabei im Rahmen der erwarteten Effizienz (Cappel, 2011). Die Zellen zeigten ab 96 h eine rückläufige BiP-Depletionseffizienz, eine Beobachtung die ebenfalls bereits in früheren Arbeiten gemacht wurde (Cappel, 2011; Suzuki *et al.*, 2007) und auch in ähnlicher Weise im Rahmen der Sec61 α -Depletion festgestellt wurde. Allerdings erfolgte im Fall der *SEC61A1* siRNA-Behandlung erst nach 144 h Inkubation wieder ein Anstieg des Sec61 α -Levels (Abbildung 33, C). Die Zunahme des BiP-Gehaltes nach bereits 96 h ist demnach offenbar nicht ausschließlich auf die transiente siRNA-Transfektion zurückzuführen. Vielmehr wird vermutlich die *BIP*-Expression infolge der BiP-Depletion induziert, da das Chaperon unter der Kontrolle der UPR steht (Li und Lee, 2006). Diese Vermutung geht auch konform mit Beobachtungen früherer Studien, in denen gezeigt wurde, dass eine *BIP* siRNA-Behandlung bereits nach 48 h eine Aktivierung der UPR bewirkt (Cappel, 2011; Suzuki *et al.*, 2007). Entsprechend wurde auch im Rahmen dieser Arbeit eine Synthesesteigerung der drei UPR-regulierten Chaperone Grp94, Grp170 und ERj3 (Craven *et al.*, 1996; Eletto *et al.*, 2010; Shen und Hendershot, 2005) nachgewiesen (Abbildung 44, C, Abbildung 51, D). Während Suzuki *et al.* jedoch bereits nach 24 h *BIP* siRNA-Transfektion in HeLa S3-Zellen eine Grp94-Synthesesteigerung auf 300-400 % beobachteten, zeigten die HeLa-Zellen innerhalb dieser Arbeit erst nach 48 h einen erhöhten Grp94-Level, der zudem nur bei ca. 175% lag. Diese unterschiedliche Ausprägung und zeitliche Abweichung ist wahrscheinlich auf die gänzlich unterschiedlichen Transfektionsbedingungen beider Studien zurückzuführen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden 2'-O-Methyl-Ribonukleotid modifizierte siRNAs verwendet, welche zudem gegen andere mRNA-Zielsequenzen gerichtet sind (vgl. Tabelle 3). Außerdem wurden höhere siRNA-Konzentrationen (400 nM) sowie ein anderes Transfektionsreagenz eingesetzt (Suzuki *et al.*, 2007).

Dass eine BiP-Reduktion zur UPR-Aktivierung führt macht auch in molekularbiologischer Hinsicht Sinn, da BiP als Regulator der UPR im Ruhezustand an die drei Membran-ständigen UPR-Mediatoren Ire1, PERK und ATF6 bindet, diese reprimiert und infolge erhöhter Proteinfehlfaltung von diesen dissoziiert (Bertolotti *et al.*, 2000; Oikawa *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2002a). Eine Rekrutierung zu fehlgefalteten Proteinen kommt im Rahmen der UPR-Aktivierung demnach einer BiP-Reduktion gleich. Zur Untersuchung der ER-Stress-Induktion wurden typische Marker aus zwei verschiedenen UPR-Wegen auf transkriptionaler Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Hierzu gehört die mRNA des proapoptotischen Proteins CHOP, deren Expression infolge der Aktivierung des PERK-Weges über den phosphorylierten eIF2 α und den Transkriptionsfaktor ATF4 induziert wird, und des Weiteren die gespleißte mRNA des Transkriptionsfaktors Xbp1 (*XBPI-sp1*), die nach Aktivierung von Ire1 durch Spaltung von *XBPI* generiert wird (Malhi und Kaufman, 2010; Schröder und Kaufman, 2005). Beide Transkripte wurden nach BiP-Reduktion im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen um 400-600% erhöht vorgefunden (Abbildung 50), eine Beobachtung, die auch in ähnlicher Weise in früheren Studien sowohl nach siRNA-Behandlung als auch spezifischer Spaltung von BiP mittels Subtilase-Zytotoxin gemacht wurde (Suzuki *et al.*, 2007; Wolfson *et al.*, 2008). Ein weiteres Phänomen einer starken sowie persistierenden UPR-Aktivierung ist die Inhibition der Zellproliferation und schließlich die Induktion der Apoptose (Kim *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006; Oyadomari und Mori, 2004). Wie unter Punkt VI.3.2.1 dargestellt zeigten die *BIP* siRNA-transfizierten Zellen trotz der relativ früh einsetzenden UPR erst eine Wachstumshemmung nach 72 h, welche nach 96 h bei ca. 50 % der Kontrollzellen lag. Eine vergleichbare Inhibition der Zellproliferation wurde auch in anderen Studien nachgewiesen, wobei in diesen Untersuchungen zudem nach 24-48 h erste Anzeichen einer Apoptose detektierbar waren (Cappel, 2011; Morinaga *et al.*, 2008; Morinaga *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007). Zwar wurde die Spezifität der BiP-Depletion durch Verwendung verschiedener siRNAs und durch Subtilase-Behandlung bereits in verschiedenen Studien validiert, allerdings wurde bislang keine erfolgreiche Komplementation der siRNA-vermittelten BiP-Reduktion durch Expression der *BIP*-cDNA beschrieben. Das Rettungsexperiment bildet nicht nur den „Goldstandard“ der Kontrolle von siRNA-Behandlungen, sondern ermöglicht nach erfolgreicher Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps ferner die Expression beliebiger Mutanten und homologer Varianten, um deren Funktionalität zu überprüfen. Wie zuvor beschrieben zeigten HeLa-Zellen nach 96 h *BIP* siRNA-Behandlung nicht nur eine deutliche Steigerung des *CHOP*- bzw. *XBP-SPI*-Gehalts, sondern auch eine ca. 50 %-ige Reduktion der Zellzahl. Diese Phänotypen wurden durch die zusätzliche Plasmidexpression der *BIP*-cDNA wieder entsprechend dem Proteinlevel nahezu vollständig gerettet, wodurch nochmals die Spezifität der siRNA-Behandlung wie auch die Anwendbarkeit der Plasmid-Komplementationsprozedur bestätigt wurde. Dass insbesondere im Fall von *XBP-SPI* trotzdem noch eine leichte Erhöhung (ca. 200 %) gegenüber der Kontrolle detektierbar war, liegt vermutlich an der hohen Sensitivität der *XBP-SPI*-Induktion, welches im Gegensatz zu *CHOP* bereits als ungespleißte Form vorliegt und unmittelbar durch Ire1 gespalten wird (Calfon *et al.*, 2002). Wie bereits erwähnt

liegt die Effizienz der Plasmid-Expression nur bei maximal 80-90 %. Daher erfolgt auch keine Rettung aller BiP-depletierten Zellen, auch wenn die Zellzahl dies impliziert. Vielmehr verbleibt vermutlich ein Anteil ausschließlich siRNA-transfizierter Zellen von etwa 5-10 %, was die restliche UPR-Aktivierung erklären würde.

Kar2 war nach heterologer Expression der cDNA in HeLa-Zellen, trotz der zuvor bestätigten, physiologischen Konzentration im Vergleich zu endogenem BiP (VI.3.1.3), nicht in der Lage die Phänotypen infolge der BiP-Depletion zu retten. Sowohl die reduzierte Proliferation als auch die UPR-Induktion waren beide in ihrer Ausprägung nicht von jenen BiP-depletierter HeLa-Zellen zu unterscheiden (VI.3.2). Da Kar2 als Hefeortholog eine hohe Homologie zu BiP (67 %) besitzt (Rose *et al.*, 1989) und auch in vielerlei Hinsicht funktionale Gemeinsamkeiten zu BiP aufweist, wie die Bedeutung für die Zellviabilität (Normington *et al.*, 1989), die Funktion als ER-luminales Hsp70-Chaperon (Machamer *et al.*, 1990) sowie die Rolle beim Proteinimport ins ER (Boisramé *et al.*, 1998; Matlack *et al.*, 1999), wäre eine Komplementation des BiP-Verlustes durch Kar2 nicht unerwartet gewesen. Diese Vermutung wird zudem durch die Tatsache bekräftigt, dass BiP im Umkehrschluss in der Lage ist, eine temperatursensitive, letale Kar2-Mutante in *S. cerevisiae* zu komplementieren (Normington *et al.*, 1989). Eine plausible Erklärung für diese Unfähigkeit zur Rettung wäre, dass Kar2 ein geringeres Spektrum an Substraten zu binden vermag als BiP. Da die Substratspezifität durch die Assoziation mit Hsp40-Cochaperonen bestimmt wird (Marcinowski *et al.*, 2011), in Hefen jedoch bislang nur vier ERj-Proteine (Sec63p, Scj1p, Jem1p und Erj5p) identifiziert wurden und nicht wie in Säugetierzellen sieben ERj-Proteine (Zimmermann, 2009), könnte diese mangelnde Substratinteraktion einer inkorrekten J-Domänen-Interaktion mit diversen Säuger-spezifischen ERj-Proteinen zugrundeliegen. Generell scheinen J-Domänen zwischen Hsp40-Cochaperonen ersetzbar zu sein, sofern diese mit funktional verwandten bzw. homologen Hsp70-Chaperonen interagieren (Nicoll *et al.*, 2007). Ferner wurde sogar gezeigt, dass beispielsweise DnaJ aus *E. coli* die ATPase-Aktivität von Hsc70 aus Säugetierzellen stimulieren kann (Minami *et al.*, 1996). Jedoch sind Hsp40-Cochaperone hinsichtlich der Assoziation mit bestimmten Hsp70-Chaperonen nicht uneingeschränkt gegeneinander austauschbar (Brodsky *et al.*, 1993). Bei der Interaktion mit bestimmten Hsp40-Cochaperonen spielen spezifische Bereiche innerhalb der NBD von Hsp70-Chaperonen eine entscheidende Rolle (Vembar *et al.*, 2010). Demnach fehlt Kar2 möglicherweise die Fähigkeit insbesondere funktional mit diversen ERj-Proteinen der Säugetierzelle zu interagieren, welche keine entsprechenden Orthologe in der Hefe besitzen. Somit kann Kar2 diverse Funktionen in HeLa-Zellen nicht korrekt auszuführen, was die fehlende Aufhebung des Wachstumsdefekts und der UPR-Induktion erklären könnte. Nicht zuletzt konnte in Untersuchungen zur Ionenpermeabilität des Translokons gezeigt werden, dass BiP, jedoch nicht Kar2, die Permeabilität der Translokationspore zu reduzieren vermag und hierfür die Interaktion mit einem bislang nicht bekannten ERj-Protein von Bedeutung ist. Kar2 zeigte zudem bei gleichzeitiger Zugabe mit BiP einen dominant-negativen Effekt (Alder *et al.*, 2005). Auf den Aspekt

der Sec61-Regulation durch BiP wird jedoch in einem späteren Teil (VII.1.5) detaillierter eingegangen.

Neben Kar2 waren auch die beiden BiP-Mutanten R197E und R197H nicht in der Lage den Phänotyp infolge der endogenen BiP-Depletion zu retten, sondern zeigten darüber hinaus sogar eine Verstärkung der UPR-Induktion sowie der Zellproliferationshemmung (Abbildung 49, B; Abbildung 50). Ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum wurde auch bereits nach 48 h beobachtet, einem Zeitpunkt, bei dem die effiziente BiP-Depletion alleine noch keine Reduktion der Zellproliferation bewirkte (Abbildung 49, C), was somit den dominant-negativen Effekt zusätzlich bestätigt. Die beiden etablierten BiP-Mutanten weisen einen Austausch des positiv geladenen Argininrests 197 zu einem neutralen (His) bzw. negativ-geladenen (Glu) Aminosäurerest auf. Beide Varianten sind dadurch nicht mehr in der Lage mit der J-Domäne von Hsp40-Cochaperonen zu interagieren (Awad *et al.*, 2008), was letztlich vermutlich einen ähnlichen Effekt auf die spezifische Interaktion mit Substraten zur Folge hat, wie bereits zuvor für Kar2 postuliert wurde. Diese Tatsache alleine erklärt jedoch nicht den dominant-negativen Effekt. Hsp40-Cochaperone stimulieren generell die ATPase-Aktivität von Hsp70-Chaperonen und stabilisieren damit die Substratinteraktion von BiP. Durch die Erniedrigung der positiven Ladung in an Position 197 innerhalb der NBD wird die Interaktion mit der SBD destabilisiert und die intrinsische ATPase-Aktivität von BiP erhöht, was somit eine irreversible Stimulation durch ein Hsp40-Cochaperon initiiert. Dadurch sind beide Mutanten nahezu unfähig gebundene Substrate wieder freizusetzen (Awad *et al.*, 2008). Unter zellulären Bedingungen hat diese Konstellation gravierende Auswirkungen, da durch das Unvermögen einer Substratfreisetzung BiP-Substrat-Komplexe im ER akkumulieren und damit sogar den ER-Stress fördern. Die Abhängigkeit von der Ladung des Aminosäurerestes erklärt auch den stärkeren Effekt der BiP-R197E-Mutante, da durch das negativ geladene Glutamat, im Vergleich zum neutralen Histidin, eine noch größere Abstoßung der beiden Domänen voneinander bewirkt wird.

Beide BiP-Mutanten waren ferner unfähig den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER zu reduzieren (VI.3.4.5). Durch den verstärkten Ca^{2+} -Ausstrom ins Zytosol oder in die Mitochondrien kann zudem eine Apoptose induziert werden. Dies erfolgt entweder direkt durch Aktivierung von Caspase-12 über die Ca^{2+} -abhängige Calpainprotease im Zytosol, welche wiederum die Caspase-9/Caspase-3-Kaskade aktiviert, oder infolge einer Ca^{2+} -Überladung von Mitochondrien, wodurch proapoptische Faktoren wie Cytochrom c ins Zytosol freigesetzt werden (Rasheva und Domingos, 2009; Rizzuto *et al.*, 2009).

VII.3.2. Reduktion von BiP durch siRNA führt zur UPR-vermittelten Steigerung des ER-Importes

In diversen *in vitro* Studien wurde BiP/Kar2 bereits als entscheidende Komponente beim co- wie auch posttranslationalen Proteinimport in das ER von Hefe- und Säugetierzellen beschrieben (Brodsky *et al.*, 1995; Matlack *et al.*, 1999; Tyedmers *et al.*, 2003; Vogel *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2001). BiP spielt dabei nicht nur eine Rolle bei der Komplettierung der Translokation, einem Schritt der die Interaktion über die J-Domäne des Translokon-assoziierten, membrangebundenen Hsp40-Cochaperons Sec63 erfordert (Lyman und Schekman, 1995), sondern fördert ferner den vektoriellen Transport ins ER, indem es direkt an importierte Substrate bindet, diese in Form einer molekularen Ratsche am Zurückrutschen ins Zytosol hindert und sie durch sukzessive Assoziation und Dissoziation vollständig ins ER-Lumen befördert (Rapoport *et al.*, 1999; Tyedmers *et al.*, 2003). Auf Ebene semi-permeabilisierter HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass eine vollständige enzymatische Spaltung von BiP durch die Subtilase einen substratspezifischen Defekt auf den Sec61-abhängigen *in vitro* Import ins ER ausübt. Zudem bewirkt das Toxin auch *in vivo* eine Inhibition der Sekretion von Immunglobulinen, während es den Export bestimmter Interleukine oder von Albumin unter gleichen Bedingungen nicht beeinträchtigt (Hu *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2012). Das etablierte Modells substrat Präprolaktin (ppl) zeigt dabei infolge der BiP-Depletion keine Abnahme der Translokationseffizienz wohingegen der Import des Vorläufers von ERj3 gänzlich inhibiert wird (Lang *et al.*, 2012). Eine spezifische Mutation eines hochkonservierten Tyrosinrestes zu Histidin (Y344H) in der ER-luminalen Schleife 7 von Sec61 α , welche Diabetes mellitus infolge von ER-Stress und Apoptose in β -Zellen des Pankreas in Mäusen hervorruft, bewirkt beim *in vitro* Transport ins ER von HeLa-Zellen einen phänotypisch gleichen, substratspezifischen Importdefekt wie im Fall der genannten BiP-Depletion. Ferner bindet BiP ATP-abhängig an ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz korrespondierend zur Sequenz der besagten ER-luminalen Schleife, welche den Tyrosinrest 344 einschließt. Diese Interaktion erfolgt jedoch nur noch mit signifikant erniedrigter Affinität, wenn dieser Rest zu Histidin mutiert wird (Lang, 2012; Lang *et al.*, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Demnach interagiert BiP vermutlich in Säugetierzellen direkt mit Sec61 α und moduliert den Sec61-Komplex, indem es Bindungsenergie für Substrate liefert, deren Signalpeptid nicht in der Lage ist die Translokationspore eigenständig zu öffnen. Hierfür spricht auch eine Studie, die zeigt, dass die ER-Importeffizienz von Substraten mit ineffizienter Signalsequenz wie dem Prionprotein (PrP), nicht jedoch von ppl, durch 30-minütigen ER-Stress mittels DTT reduziert wird und diese Signalsequenzabhängigkeit direkt mit der Verfügbarkeit von ER-luminalen BiP zusammenhängt. Da BiP unmittelbar nach DTT-Behandlung an fehlgefaltete Proteine bindet, nimmt die Fraktion löslicher BiP-Moleküle signifikant ab und ist demnach nicht mehr für den Import BiP-abhängiger Substrate verfügbar (Kang *et al.*, 2006). Diese Substratspezifität scheint somit in der Signalsequenz verankert zu sein, welche trotz der hohen Diversität basierend auf Sequenzanalysen einen hohen evolutionären Konservierungsgrad aufweisen. Ppl stellt dabei eines der

wenigen Vorläuferproteine dar, die sehr effizient importiert werden und weitgehend unabhängig von akzessorischen Proteinen wie TRAM oder dem TRAP-Komplex sind (Fons *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002; Voigt *et al.*, 1996). Hierbei zeichnet sich die Tendenz ab, dass effiziente Signalpeptide generell länger als ca. 25 AS sind und eine höhere Anzahl positiv geladener Aminosäurereste aufweisen (Fons *et al.*, 2003; Voigt *et al.*, 1996; Johanna Dudek, persönliche Mitteilung). Da insbesondere PrP unter ER-Stress anfällig für eine Aggregation ist, dient dieser substratspezifische, als „pre-emptive quality control“ (pQC) bezeichnete Mechanismus, als Schutz vor einer Überlastung des ER (Kang 2006).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde anstelle eines Translokationsdefektes ein statistisch signifikanter Anstieg des ERj3-Importes ins ER semi-permeabilisierter HeLa-Zellen auf ca. 170 % infolge einer siRNA-vermittelten BiP-Depletion für 48 h (ca. 25 % Restprotein) beobachtet. Der Import von ppl und Syb2 hingegen war nur marginal bzw. gar nicht betroffen (Abbildung 51, A-C). Die unvollständige ERj3-Glykosylierung unter diesen Bedingungen könnte entweder durch mangelnde Faltungskapazität des ER aufgrund der BiP-Reduktion bedingt sein oder lediglich die im Vergleich zur gesteigerten Importrate langsamer ablaufende Aktivität der Oligosaccharyltransferase widerspiegeln. Grundsätzlich ist es jedoch wichtig nochmals darauf hinzuweisen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche UPR-Aktivierung beobachtet wurde (Abbildung 44, C, Abbildung 51, D). Da ERj3 stark abhängig von BiP, Sec63 als auch Sec62 ist und auch dem oben genannten Trend entsprechend ein kurzes, hydrophobes und demnach ineffizientes Signalpeptid besitzt, wäre den bisherigen Daten zufolge eine Inhibition der Translokation zu erwarten gewesen. Da jedoch immer noch 25 % Restprotein vorhanden sind, könnte diese Menge ausreichen, um ERj3 noch effizient zu importieren. Diese Tatsache erklärt allerdings nicht die gesteigerte Importeffizienz. ERj3 stellt neben seiner BiP-Abhängigkeit jedoch auch ein UPR-reguliertes Hsp40-Cochaperon des ER dar (Shen *et al.*, 2002b), was unter den gegebenen Umständen einen Sonderfall bildet, wodurch möglicherweise die BiP-Abhängigkeit umgangen werden kann. Wie in Abbildung 51, D dargestellt wiesen dieselben HeLa-Zellen, die für den *in vitro* Transport verwendet wurden nach 48 h BiP-Reduktion auch eine endogene ERj3-Synthesesteigerung von ca. 300 % auf. Da die Translokationsreaktion im Retikulozytenlysate erfolgt, welches nicht von der UPR-Reaktion betroffen ist, spielen lösliche, zytosolische Proteine somit wahrscheinlich keine Rolle. Ferner ist nach 48 h *BIP* siRNA-Behandlung weder der zelluläre Sec61 α - (Abbildung 55) der Sec63- (Lang, 2012) noch der Sec62-Gehalt (Markus Greiner, persönliche Mitteilung) verändert und nimmt somit zumindest stöchiometrisch keinen Einfluss auf die Translokation. Wie unter Punkt Abbildung 44, C gezeigt wurde ist allerdings die Grp170-Synthese auf ca. 175 % erhöht. Nach Dierks *et al.* 1996 wird Grp170 neben BiP eine Rolle beim ER-Import zugeschrieben (Dierks *et al.*, 1996) und könnte somit alleine oder zusammen mit dem übrigen BiP-Protein den Import stimulieren. Ein derart geringer BiP-Gehalt könnte ferner ausreichend sein, da dieses aufgrund der artifiziell induzierten UPR nicht an fehlgefaltete Proteine bindet. Neben den genannten Proteinen könnten zudem potentiell eine Reihe weiterer Translokations-assoziiierter Proteine,

wie z.B. TRAM, der TRAP-Komplex oder ERj1, unter UPR-Bedingungen einen positiven Einfluss auf den ERj3-Import und andere UPR-regulierten Proteine nehmen. Da ERj3 neuesten Untersuchungen zufolge auch trotz seiner Größe SRP-unabhängig importiert werden kann könnte die Information für den bevorzugten Import gegenüber dem eigentlich sehr effizienten ppl demnach entweder allein in der Signalsequenz oder zusätzlich in der reifen Region verankert sein. Aufgrund der evolutionär hohen Konservierung von Signalsequenzen sowie deren spezifischer Regulierbarkeit, wär es auch nicht verwunderlich, wenn diese Sequenzen noch mehr Information tragen als bisher gedacht (Kim *et al.*, 2002; Stefan Schorr, persönliche Mitteilung). Um festzustellen, ob nach UPR-Induktion möglicherweise auch eine Entkopplung der BiP-Abhängigkeit erfolgt, könnte nach 48 h *BIP* siRNA-Transfektion eine 2-stündige Subtilase-Behandlung durchgeführt werden, um den BiP-Gehalt vollständig zu reduzieren und entsprechende Zellen in einem analogen Transportexperiment untersucht werden.

VII.3.3. BiP fungiert als ER-luminaler Regulator des Sec61-Komplexes

Wie bereits erläutert repräsentiert der Sec61-Komplex einen der wichtigsten Ca^{2+} -Leckkanäle, insbesondere in sekretorischen Zellen wie HeLa-, HSG- („human salivary gland“), LNCaP („lymph node carcinoma of the prostate“) oder Pankreas-Zellen, welche eine hohe Translokationsrate von Proteinen ins ER aufweisen (Flourakis *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2007; Van Coppenolle *et al.*, 2004). Diese Permeabilität für Ca^{2+} wurde nicht nur elektro-physiologisch bestätigt, sondern es wurde auch gezeigt, dass CaM Ca^{2+} -abhängig an das IQ-Motiv im zytosolischen N-Terminus von Sec61 α bindet und dadurch die Ionenpermeabilität des Sec61-Komplexes reduziert (Erdmann *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Mechanismus auf zellulärer Ebene verifiziert und weiter charakterisiert (VI.1.2; VI.2.4). Dabei spielt die Regulation durch CaM aufgrund der Ca^{2+} -Abhängigkeit vermutlich nur nach Termination der Translokation eine Rolle, da in diesem Fall Ca^{2+} transient über Sec61 α austreten kann, wie anhand Freisetzung der naszierender Polypeptidketten mit Puromycin demonstriert wurde (Amer *et al.*, 2009; Flourakis *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002). Es wurden ferner Untersuchungen zur Ionenpermeabilität der Translokase durchgeführt, welche auf der Verwendung rauer Mikrosomen mit arretierten Translokationsintermediaten unterschiedlicher Länge basieren und deren Zugänglichkeit im Translokationskanal mit Hilfe eines Fluorophors innerhalb der Polypeptidkette bestimmt wurde. Da dessen Fluoreszenzintensität durch Ionen stark reduziert wird („fluorescence quenching“), konnte anhand dieser Messungen gezeigt werden, dass das ER-luminale BiP die Translokase vor der Insertion der Polypeptidkette sowie in der frühen Phase der Translokation (~ 70 AS-Reste) von der luminalen Seite aus gegenüber Ionen zu schließen vermag (Alder *et al.*, 2005; Hamman *et al.*, 1998). Ferner wurde auch mittels Einzelkanalmessung eine Inhibition der Ionenkonduktivität des in Liposomen rekonstituierten Sec61-Komplexes durch BiP-Zugabe beobachtet (Wirth *et al.*, 2003).

Wie schon im Rahmen der Untersuchungen von CaM stellte sich auch hier die Frage, ob der Mechanismus der Sec61-Regulation durch BiP auf zellulärer Ebene gezeigt und weiter charakterisiert werden kann. Der BiP-Proteinlevel in HeLa-Zellen wurde mittels siRNA-Transfektion reduziert und anschließend der Ca²⁺-Leckstrom sowie der zelluläre Ca²⁺-Gehalt per Ca²⁺-„imaging“ untersucht. Bereits nach 24 h siRNA-Behandlung (ca. 60 % Restprotein) war ein signifikant erhöhter Ca²⁺-Ausstrom zu beobachten, welcher entsprechend einem BiP-Level von 30 % nach 48 h nochmals deutlich gesteigert war (Abbildung 52). Ferner wurde dieser verstärkte Ca²⁺-Leckstrom auch direkt durch Messung von ER-luminalem Ca²⁺ nachgewiesen (Abbildung 54).

Simultane siRNA-vermittelte Reduktion von Sec61 α bewirkte hingegen eine deutliche Inhibition des BiP-Depletionsphänotyps (Abbildung 56). Demnach fungiert BiP tatsächlich als Regulator des Sec61-Komplexes auf zellulärer Ebene. Wie in Abbildung 15 gezeigt ist, wird durch Induktion von ER-Stress durch DTT oder Tunicamycin ein vergleichbarer Effekt hervorgerufen. Sven Lang konnte diesbezüglich nachweisen, dass dieser durch ER-Stress erhöhte Ca²⁺-Ausstrom ebenfalls auf Ebene des Sec61-Komplexes erfolgt und somit vermutlich die Folge einer endogen reduzierten Verfügbarkeit an BiP ist, welches durch Rekrutierung zu fehlgefalteten Proteinen vom Sec61-Komplex diffundiert (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Dass es sich hierbei tatsächlich um eine direkte Interaktion handelt wurde basierend auf der bereits unter VII.3.2 beschriebenen Studie der Diabetes-assoziierten Sec61 α -Y3444H-Mutante (Lloyd *et al.*, 2010) postuliert, welche in HeLa-Zellen nicht nur zu ER-Stress führt, sondern auch einen generell erhöhten Ca²⁺-Leckstrom bewirkt, der ferner gegenüber einer Behandlung mit ER-Stressoren insensitiv ist. Anhand der durch Martin Jung durchgeführten Peptidspot-Analyse bindet BiP an die korrespondierende Sequenz der Minihelix innerhalb von Schleife 7, wobei die Affinität dieser Interaktion stark von dem Tyrosin-Rest 344 des hochkonservierten Dityrosinrestes innerhalb dieser Region abhängt. Demnach stellt die ER-luminale Schleife 7 von Sec61 α eine potentielle Interaktions- und Regulationsdomäne zur Modulation des Sec61-Komplexes dar (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012). Dass der ER-luminale Bereich zwischen TMD 7 und 8 eine wichtige Rolle beim „gating“ des Sec61-Komplexes spielt, wurde ebenfalls in Transportstudien in Hefe gezeigt, in denen ein Importdefekt infolge einer Insertionsmutation beschrieben wurde, die eine eingeschränkte Dynamik des Sec61-Komplexes bewirkt (Trueman *et al.*, 2011). Dennoch spielt diese ER-luminale Schleife in Hefen möglicherweise nur eine Rolle beim Öffnen, jedoch nicht beim Schließen des Translokationskanals. Diese Hypothese wird durch zwei Aspekte gestützt: i) Zum einen scheint der Mechanismus BiP-spezifisch und damit Säugetier-spezifisch zu sein, da eine adäquate Konzentration an Kar2 den Effekt des BiP-Verlustes auf den Ca²⁺-Leckstrom nicht zu kompensieren vermag (Abbildung 57). *In vitro* Untersuchungen zeigen sogar einen dominant-negativen Effekt durch Kar2 (Alder *et al.*, 2005). ii) Zum anderen dient das ER in Hefen nicht als Hauptspeicher für zelluläres Ca²⁺ und weist ferner auch keine Regulation durch Ca²⁺-CaM wie in Säugetierzellen auf (Harsman *et al.*, 2011c).

Die Spezifität könnte dabei, wie schon unter Punkt VII.3.1 spekuliert, auf eine Unfähigkeit von Kar2 zurückzuführen sein, mit einem Säugetier-ERj-Protein funktional zu interagieren, welches die Funktion bei der Regulation der Schließung des Sec61-Komplexes definiert. Dass die Interaktion mit einem ERj-Protein im Rahmen dieses Mechanismus *per se* von Bedeutung ist zeigen auch die Experimente mit den beiden Mutanten *BIP-R197E* und *-R197H*, welche trotz gleicher Expression im Vergleich zur *BIP*-Wildtyp-cDNA, nicht in der Lage waren den Phänotyp infolge der endogenen BiP-Depletion (erhöhter Ca^{2+} -Ausstrom) zu retten (Abbildung 57). Da beide Mutanten nicht mehr mit der J-Domäne von Hsp40-Cochaperonen interagieren können und auch ein reduziertes Substratinteraktionsvermögen aufweisen (Awad *et al.*, 2008), können diese Varianten vermutlich auch nicht mehr zum Sec61-Komplex rekrutiert werden geschweige denn mit diesem interagieren. In weiteren Untersuchungen muss zukünftig geklärt werden, welches der ERj-Proteine beim „gating“ des Sec61-Komplexes beteiligt ist. Anhand der von Sven Lang durchgeführten Untersuchungen scheint ERj1 keine Rolle zu spielen, da zumindest eine Depletion dieses Proteins zu keiner Erhöhung des Ca^{2+} -Leckstroms führt (Lang *et al.*, 2011).

Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen BiP und Sec61 α wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit mittels Quervernetzung sowie Ni^{2+} -„pulldown“ geliefert (Abbildung 61, A, B). Diese Daten gehen ferner mit einer kürzlich von Hammadi *et al.* (2013) publizierten Studie konform, welche ebenfalls einen Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom nach BiP-Depletion oder ER-Stress mittels Tunicamycin nachgewiesen haben. Ferner wurde eine Interaktion zwischen BiP und Sec61 α mittels Co-Immunopräzipitation gezeigt, welche durch den Peptidyltransferaseinhibitor Anisomycin inhibiert wird. Der gleiche Inhibitor hemmt auch den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER (Flourakis *et al.*, 2006; Hammadi *et al.*, 2013; Van Coppenolle *et al.*, 2004). Dass trotz der relativ hohen Konzentrationen von Sec61 α (ca. 2 μM) und BiP (ca. 5 μM) im ER (Weitzmann *et al.*, 2007; Zimmermann, 2009) von Säugetierzellen dennoch auf zellulärer Ebene bzw. im Zelllysat nur verhältnismäßig geringe Quervernetzungprodukte oder Copräzipitate gefunden wurden liegt vermutlich an der Tatsache, dass es sich um eine transiente Interaktion in Form einer BiP-Substrat-Bindung handelt. Dass diese Interaktion eher schwach ist zeigen auch Studien zur Analyse funktionaler Multiproteinkomplexe, die an der Translokation beteiligt sind, mittels nativer Gellektrophorese („blue native PAGE“) und Immundetektion. Dabei konnte BiP, im Gegensatz zu Sec61 α , in keinem höher molekularen Komplex wiedergefunden werden. Demnach scheint die BiP-Sec61-Interaktion bereits unter derartigen Bedingungen sehr instabil zu sein (Wang und Dobberstein, 1999).

Basierend auf den vorliegenden Daten und der Struktur des Sec61-Komplexes (Van den Berg *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2011) könnte ein potentieller regulatorischer Mechanismus wie folgt aussehen. Der bisherigen Vorstellung einer Öffnung des Sec61-Komplexes zufolge interkaliert die hydrophobe Signalsequenz eines (naszierenden) Polypeptids zwischen TMD 2b und 7 von Sec61 α und induziert dadurch die Öffnung des lateralen Tors und die Entfernung des „pore plug“ (Gumbart und

Schulten, 2007). Über die Interaktion mit einem Säugetier-spezifischen, Translokon-assoziierten Hsp40-Cochaperon könnte BiP zum Sec61-Komplex rekrutiert oder zumindest dessen Interaktion mit Sec61 α durch Stimulation der ATPase-Aktivität gefördert werden. Durch die Bindung an die luminaire Schleife 7, welche TMD 7 und 8 verbindet, wäre ähnlich wie im Fall der Ca²⁺-CaM-Regulation, die molekulare Nähe für eine potentielle Modulation des lateralen Tors gegeben.

Das die Dynamik des Translokons durch Interaktion diverser Proteine beeinflusst werden kann zeigen nicht zuletzt auch Untersuchungen, in denen durch Zugabe spezifischer Antikörper gegen Sec61 α einerseits eine Schließung des Sec61-Komplexes induziert wird (Hamman *et al.*, 1998) und ferner Antikörper gegen die Schleife 8 des homologen bakteriellen SecYEG eine Öffnung des lateralen Tors bewirken (Tsukazaki *et al.*, 2008).

Ob weitere akzessorische Proteine der Translokase einen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase haben muss künftig überprüft werden. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe Zimmermann zeigen eine signifikante Reduktion des Thapsigargin-induzierten Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER nach Depletion des TRAP-Komplexes auf (Stefan Schorr, persönliche Mitteilung). Da der TRAP-Komplex jedoch neben der Substrat-spezifischen Regulation des ER-Importes von Vorläuferproteinen auch über die TRAP α -Untereinheit Ca²⁺ zu binden vermag (Fons *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 1991), bleibt zu klären, inwieweit es sich um eine Rolle beim „gating“ oder lediglich um die Speicherung von Ca²⁺ handelt. Die Eigenschaft Ca²⁺ zu binden, könnte auch der Grund für die Abnahme des Ca²⁺-Leckstroms sowie der Konzentration an freiem zellulärem Ca²⁺ nach Grp94-Depletion sein. Allerdings müsste dann ein derartiger Effekt auch für Calretikulin und Pdi gefordert werden, da auch diese beiden Proteine neben Grp94 zwei der wichtigsten Ca²⁺-bindenden Proteine des ER darstellen. Dass die Depletion keines der Ca²⁺-bindenden Chaperone eine Steigerung des Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER bewirkt (Abbildung 60), spricht ferner auch für Spezifität von BiP, dessen limitierender Einfluss auf den passiven Ca²⁺-Efflux als ebenfalls abundantes Ca²⁺-bindendes ER-Chaperon nicht von der Ca²⁺-Pufferkapazität abhängt (Coe, 2009).

VII.4. Hypothetisches Modell des CaM-BiP-Zusammenspiels

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Mechanismen zur Kontrolle des Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER auf zellulärer Ebene verifiziert und charakterisiert. Da sowohl durch eine Inhibition von CaM als auch die Reduktion von BiP jeweils für sich bereits ein signifikanter Anstieg des Ca²⁺-Efflux zu beobachten war scheinen diese Regulatoren nicht redundant zu sein und entweder in Kooperation zu arbeiten oder nacheinander geschaltet zu agieren. Grundsätzlich bietet die dynamische Struktur des Sec61-Komplexes durch den Aufbau mit lateralem Tor und dem „pore plug“ sowie den im Zytosol bzw. ER-Lumen identifizierten Interaktionsdomänen ein räumlich sowie zeitlich präzise regulierbares System. Wie bereits erläutert interkaliert die hydrophobe Signalsequenz von Vorläuferproteinen zwischen TMD 2b und 7, welche Teil des lateralen Tors, bestehend aus TMD 2/3

VII. Diskussion

sowie TMD 7/8, sind und auch in direkter Verbindung zu der den „pore plug“ bildenden Helix 2a stehen (Gumbart und Schulten, 2007; Zimmermann *et al.*, 2011). Demnach könnte BiP durch Bindung an die ER-luminale Schleife 7, welche TMD 7 und 8 verbindet, die Modulation des lateralen Tors sowie Ca^{2+} -CaM in analoger Weise, durch Interaktion mit dem IQ-Motiv oberhalb von TMD 1, gebildet durch TMD 1 und 2, die Bewegung des „pore plug“ bewirken.

Ferner gehen TMD 7 und 8 auch direkt in die zytosolischen Schleifen 6 bzw. 8 über, welche als Bindungsstellen für das Ribosom identifiziert wurden (Kalies *et al.*, 1994; Raden *et al.*, 2000). Somit wäre auch eine Ribosomen-abhängige, vom Zytosol zum ER-Lumen vermittelte Modulation der Interaktion von BiP mit der Schleife 7 von Sec61 α vorstellbar. Dieser Mechanismus erinnert dabei an die durch Konformationsänderung vermittelte Transition einer Ligandenbindung durch Rezeptoren auf der Plasmamembran. Eine derartiges, kooperatives Zusammenspiel impliziert jedoch unterschiedliche „gating“-Mechanismen für den co- und posttranslationalen Transport, was auch basierend auf den Untersuchungen von Crowley *et al.* 1994 postuliert wurde (Crowley *et al.*, 1994).

Anhand der verfügbaren *in vitro* Daten scheint BiP insbesondere vor und in der frühen Phase der Translokation eine wichtige Rolle zu spielen (Hamman *et al.*, 1998). Ferner agiert CaM nur nachdem Ca^{2+} aus über den Sec61-Komplex austritt und Konzentrationen über 10 μM erreicht, zumindest in Nanodomänen um die Porenöffnung (Clapham, 2007; Naraghi und Neher, 1997). Dieser Vorgang erfolgt offensichtlich nach Termination der Translokation trotz der Anwesenheit von BiP im ER-Lumen (Amer *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2011; Lomax *et al.*, 2002; Van Coppenolle *et al.*, 2004). Demnach scheint BiP zwar als wichtiger Regulator des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER zu fungieren, allerdings ist diese Funktion offensichtlich insbesondere nach Termination der Translokation weniger effizient, weswegen CaM als weitere Absicherung im Zytosol die Schließung der Translokationspore gewährleistet. Ein hypothetisches Model eines kooperativen, seriellen Agierens beider Mechanismen könnte demnach wie folgt aussehen: i) Vor der Translokation wie auch bis zur vollständigen Insertion einer Polypeptidkette bindet BiP an die ER-luminale Schleife 7 von Sec61 α und hält den Kanal von luminaler Seite aus geschlossen. Diese Bindung erfolgt vermutlich in Form einer Substratinteraktion und erfordert die Hilfe eines Hsp40-Cochaperons (Stimulation der ATPase und/oder Rekrutierung zum Translokation). ii) Bei vollständiger Insertion der Polypeptidkette dissoziiert BiP (Hamman *et al.*, 1998). In dieser Konstellation könnte die Polypeptidkette möglicherweise allein oder in Kombination mit dem Ribosom die hydrophile Pore gegenüber Ca^{2+} abdichten (Crowley *et al.*, 1994) iii) Nach der Translokation, d.h. der Freisetzung des Polypeptids aus der Pore, scheint der Sec61-Komplex transient die Passage von Ca^{2+} zu gewähren. In Ca^{2+} -Nanodomänen, die sich um die zytosolische Porenöffnung bilden wird CaM aktiviert und zum IQ-Motiv von Sec61 α rekrutiert iv) Die Interaktion mit dem Motiv induziert die Schließung des Kanals und verhindert einen weiteren Ausstrom von Ca^{2+} . Zwischenzeitlich assoziiert BiP wieder mit dem Sec61-Komplex. Da Ca^{2+} in der Folge wieder aus dem Zytosol entfernt wird dissoziiert CaM daraufhin wahrscheinlich wieder vom IQ-Motiv (Abbildung 63). Ob durch ein Fehlen beider

Regulatoren der Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER sogar noch weiter gesteigert werden kann und demnach tatsächlich ein serielles Agieren erfolgt, könnte durch ein Rettungsexperiment mit einer Sec61-Doppelmutante (Sec61 α -R24A/K29A-Y344H) mit defekter Bindestelle für BiP (Schleife 7) und CaM (IQ-Motiv) oder alternativ auf pharmakologischem Weg durch gleichzeitige Behandlung mit ER-Stressoren und CaM-Antagonisten durchgeführt werden. Da CaM dem Modell zufolge nur infolge einer Ca^{2+} -Freisetzung und demnach aufgrund eines Fehlschlagens der BiP-Regulation agiert, stellt sich jedoch die Frage, warum CaM nicht in der Lage ist nach BiP-Depletion den erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom zu kompensieren. Zwar liegt CaM in der Zelle in einer Konzentration von ca. 10 μM vor (Black *et al.*, 2004), jedoch interagiert CaM mit hunderten von Zielproteinen (Ikura und Ames, 2006), was folglich die tatsächliche Verfügbarkeit für die Bindung an das Sec61 α -IQ-Motiv auf einen Bruchteil der Gesamtkonzentration reduziert. Demnach wäre vorstellbar, dass eine Depletion von BiP und damit eine Fehlregulation aller aktiven Sec61-Komplexe nicht durch die vorhandene Menge an CaM-Molekülen kompensiert werden kann, was auch erklären würde warum es nach einem ebenso unphysiologischen Vorgang wie der simultanen Freisetzung aller naszierenden Polypeptidketten in unterschiedlichen Stadien der Translokation mittels Puromycin zu einem ebenso nicht kompensierbaren Ca^{2+} -Verlust kommt (Amer *et al.*, 2009; Lang *et al.*, 2011). Wie unter Punkt VI.1.2.3 dargestellt vermag die alleinige Überexpression von CAM-GFP den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER sowie dessen Stimulierbarkeit durch Ophiobolin A zu reduzieren. Demnach muss der Hypothese zufolge auch gefordert werden, dass diese Überexpression in ähnlicher Weise auch den gesteigerten Ca^{2+} -Leckstrom nach BiP-Depletion, in Form einer Transrettung inhibieren kann, was ebenfalls eine einfach durchzuführende Untersuchung darstellen würde. Um diese Daten jedoch abzusichern, müsste ferner überprüft werden, ob die Reduktion des passiven Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER durch CAM-GFP-Überexpression tatsächlich einer Interaktion mit dem Sec61-Komplex zugrundeliegt und nicht lediglich eine Pufferung von zytosolischem Ca^{2+} durch die EF-Hände von CaM zugrundeliegt. Daher könnten als Kontrolle Untersuchungen wie die Überprüfung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration mittels Ionomycin oder eine Stimulation von IP₃-Rezeptoren (z.B. durch Carbachol) durchgeführt werden, welche eine Ca^{2+} -Leckstrom-unabhängige Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol bewirken und demnach keine Erniedrigung gegenüber der Kontrolle zeigen sollten.

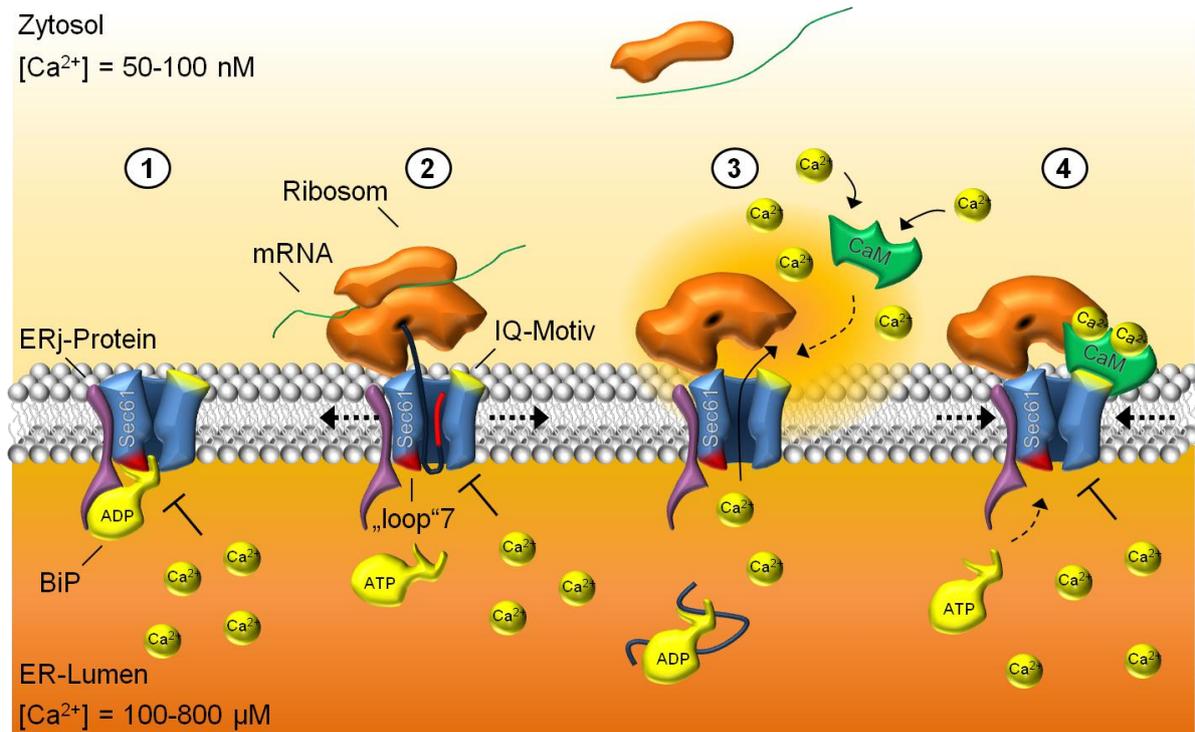


Abbildung 63: Modell der postulierten BiP-CaM-Kooperation. **1)** Vor der Translokation sowie nach Öffnung der Translokationspore, d.h. bis zur vollständigen Insertion einer Polypeptidkette (hier als naszierende Polypeptidkette während der cotranslationalen Translokation) bindet das molekulare Hsp70-Chaperon BiP an die ER-luminale Seite (vermutlich an Schleife 7 = „loop“ 7) des Sec61-Komplexes (Hamman *et al.*, 1998), und hält dessen dynamisches Gleichgewicht im geschlossenen Zustand. Diese Interaktion erfordert die Hilfe eines ER-luminalen Hsp40-Cochaperons (ERj-Protein) und verläuft vermutlich in Form einer typischen BiP-Substrat-Interaktion (ADP-Form $\hat{=}$ hochaffine Substratbindung). **2)** Nachdem das Polypeptid mit einer Länge von ca. 70 Aminosäuren in die Translokationspore hineinragt dissoziiert BiP (Hamman *et al.*, 1998). Vermutlich reicht unter diesen Bedingungen die voll inserierte Polypeptidkette (oder in Kombination mit dem Ribosom als RNC) aus, um die hydrophile Pore gegenüber eines Austritts von Ca²⁺ auf zytosolischer Seite abzdichten (Crowley *et al.*, 1994). **3)** Nach Termination des Translokationsprozesses ist BiP noch in die Qualitätskontrolle und Faltung des neu synthetisierten Proteins involviert, weswegen möglicherweise in einigen Fällen nicht unmittelbar ein BiP-Molekül bereitsteht, um wieder an den Sec61-Komplex zu binden und dessen dynamisches Gleichgewicht in den geschlossenen Zustand zu überführen (im Fall des cotranslationalen Transportes kann dabei die große, Ribosomen-Untereinheit stabil mit dem Sec61-Komplex assoziiert bleiben (Potter und Nicchitta, 2002)). Der noch geöffnete Sec61-Komplex ist unter diesen Bedingungen permeabel für Ca²⁺, welches in Nanodomänen um die zytosolische Porenöffnung akkumuliert und in der Region befindliches CaM aktiviert (Erdmann *et al.*, 2011; Naraghi und Neher, 1997). **4)** Ca²⁺-CaM wird zum N-terminalen IQ-Motiv (CaM-Bindungsmotiv) von Sec61 α rekrutiert, induziert die Schließung des Kanals und reduziert so den Ca²⁺-Verlust. Unterdessen assoziiert BiP vermutlich wieder mit dem inaktiven Sec61-Komplex, um diesen stabil im geschlossenen Zustand zu halten. Da überschüssiges Ca²⁺ um den Sec61-Komplex durch SERCA entfernt wird, dissoziiert CaM daraufhin wieder.

VII.5. Ca²⁺-Leckstrom über den Sec61-Komplex: Physiologische Bedeutung?

Es ist allgemein anerkannt, dass zelluläre Mechanismen im Laufe der Evolution meist optimiert werden und je nach Bedeutung oft redundante Wege bestehen. Daher stellt sich nicht zuletzt die Frage: Hat der Sec61-vermittelte Ca²⁺-Leckstrom eine physiologische Relevanz? Oder handelt es sich um den eher unwahrscheinlicheren Fall eines zufälligen Ca²⁺-Ausstroms und damit um einen evolutionär noch

unausgereiften Mechanismus? Die Tatsache, dass zwei in verschiedenen zellulären Kompartimenten befindliche Proteine auf eine Regulation des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms spezialisiert wurden spricht dabei für erstere Variante. Während die Funktion von CaM möglicherweise nur als Absicherung bzw. Schutzmechanismus dient, um eine Intoxikation durch übermäßige Ca^{2+} -Akkumulation im Zytosol zu vermeiden, könnte der Regulation durch BiP eine tiefgreifender Rolle zuteilwerden. Als Hauptregulator der UPR und somit als ER-Stresssensor könnte über einen BiP-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom der ER-Status an andere Organellen wie das Zytosol oder die Mitochondrien übermittelt werden, welche auf den erhöhten Ca^{2+} -„input“ entsprechend reagieren können. Eine derartige Funktion wäre ferner plausibel, da eine generelle Übertragung von Ca^{2+} zwischen ER und Mitochondrien aufgrund der strukturellen und funktionalen Kopplung beider Organellen zur Kontrolle der zellulären Homöostase, insbesondere während ER-Stress, kein unbekanntes Phänomen darstellt (Berridge *et al.*, 2000; Lebedzinska *et al.*, 2009). Unter anderem wurde gezeigt, dass in HeLa-Zellen infolge von ER-Stress eine trunkierte Isoform von SERCA1 (S1T) exprimiert wird, welche als Ca^{2+} -Leckkanal fungiert, und Ca^{2+} an die Mitochondrien überträgt (Chami *et al.*, 2008). Generell führt auch bereits die reine Depletion von ER-luminalem Ca^{2+} zur Apoptose-Induktion (Hammadi *et al.*, 2013; Skryma *et al.*, 2000). Demnach macht ein BiP-regulierter, Sec61-vermittelter Ca^{2+} -Leckstrom infolge von ER-Stress Sinn, da so bei einer Unfähigkeit der Zelle den normalen Status wiederherzustellen, eine direkte Aktivierung der Apoptose erfolgen kann. Wie gezeigt wurde resultiert die Reduktion von BiP in einem passivem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER über den Sec61-Komplex und letztlich in einer Induktion der UPR und der Apoptose. Dabei spielt es irrelevant, ob diese Reduktion an verfügbarem BiP artifiziell durch siRNA-Behandlung oder schlicht durch Induktion von Fehlfaltung erfolgt (Lang, 2012; Schäuble *et al.*, 2012).

Die Aktivierung der UPR spielt generell eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Erkrankungen, wie Krebs, Diabetes oder neurodegenerativen Störungen (Senderek *et al.*, 2005; Tsai und Weissman, 2010). Auch die beschriebene Sec61 α -Y344H-Mutante wurde ursprünglich im Zusammenhang mit Diabetes mellitus und Hepatosteatose in Mäusen identifiziert (Lloyd *et al.*, 2010). Die Symptome beruhen dabei auf der Entstehung von ER-Stress und Apoptose, welche insbesondere in β -Zellen des Pankreas sehr stark ausgeprägt sind. Wie durch Sven Lang gezeigt wurde, weist diese Sec61 α -Y344H-Mutante nach Komplementation des endogenen Sec61 α einen generell erhöhten Ca^{2+} -Leckstrom sowie einen Substrat-spezifischen Transportdefekt auf. Ferner vermag BiP an Sec61 α zu binden (Abbildung 61, A, B), wobei diese Interaktion auf Ebene von Sec61-Peptidspots, korrespondierend zur Schleife 7, stark vom Tyrosinrest 344 abhängt (Lang, 2012; Lloyd *et al.*, 2010; Schäuble *et al.*, 2012). Da Zellen mit dieser Mutation vermutlich keine fehlgefalteten Proteine im ER akkumulieren und auch ansonsten keine Reduktion an verfügbarem BiP erfahren, was mit einer Dissoziation von den UPR-Rezeptoren Ire1, PERK und ATF6 assoziiert ist, basiert die Induktion der Apoptose vermutlich auf dem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER. Ferner lässt sich der Ca^{2+} -Ausstrom in der Sec61 α -Y344H-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp nicht durch weiteren ER-Stress steigern.

VII. Diskussion

Demnach könnte BiP tatsächlich zusätzlich über den Ca^{2+} -Leckstrom den Stress-Zustand des ER wiedergeben, wodurch bei Bedarf die Apoptose induziert wird. Durch die Fehlfaltung von Proteinen wird BiP rekrutiert, dadurch wird der Sec61-Leckstrom erhöht, was letztlich zur Ca^{2+} -Überlastung der Mitochondrien führt und die Apoptose auslöst. Ferner kann die Apoptose auch über die zytosolisch gelegene Caspase 3/7-Kaskade vermittelt werden, welche durch das Ca^{2+} -sensitive Calpain aktiviert wird.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde ferner nach 72 h BiP-Depletion ein Anstieg des ER-luminalen Ca^{2+} -Gehaltes beobachtet (Abbildung 53), was auch dem Beginn der Reduktion der Zellzahl (vermutlich durch Apoptose) entsprach (Abbildung 49, A). Außerdem wurde bereits nach 48 h eine leichte Steigerung des SERCA2b Gehaltes detektiert (Daten nicht gezeigt). Hierbei könnte es sich ebenfalls, um eine durch die UPR hervorgerufene Reaktion zur Kompensation des Ca^{2+} -Verlustes handeln. Eine derartige Anpassung wäre plausibel, da so der Ca^{2+} -Leckstrom weiter erhöht bleibt bzw. sogar noch gesteigert wird solange kein BiP zur Schließung des Translokons zur Verfügung steht. Dadurch bleibt jedoch auch simultan der ER-luminale Ca^{2+} -Gehalt hoch genug, um die Faltungskapazität der Ca^{2+} -abhängigen Chaperone (deren Expression durch die UPR induziert wurde) zu gewährleisten. Somit kann das Gleichgewicht zwischen Wiederherstellung des Normalzustandes und Apoptose sehr schnell und präzise in Abhängigkeit von der BiP-Konzentration reguliert werden. Das heißt, wenn das ebenfalls Ca^{2+} -abhängige BiP im Verbund mit weiteren Chaperonen den ER-Stress bewältigen kann, können nach und nach wieder BiP-Moleküle mit Sec61-Komplexen assoziieren und angepasst an die Faltungslast des ER somit unmittelbar das Signal für den programmierten Zellen wieder revidieren. Dass die Apoptose tatsächlich sehr stark vom Ca^{2+} -Leckstrom abhängt zeigen auch Experimente, in denen die Apoptose durch Puromycin- bzw.-Thapsigargin-Behandlung induziert wurde, diese jedoch lediglich durch Zugabe von Anisomycin und somit der Unterdrückung des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Ausstroms gerettet werden konnten (Hammadi *et al.*, 2013).

Dass ER Stressoren wie Tunicamycin oder DTT tatsächlich zu einem transienten Verlust an Ca^{2+} aus dem ER führen wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. Hierbei aktivierte eine 10-minütige Vorbehandlung mit DTT den SOCE (Abbildung 16, B). Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in der Arbeit von Hammadi *et al.* (2013) gemacht. Zudem konnte die nach 3-stündiger Vorbehandlung mit DTT oder Tunicamycin induzierte Ca^{2+} -Reduktion ebenfalls durch eine Blockierung von Sec61-Komplex mit Anisomycin unterbunden werden (Hammadi *et al.*, 2013). Zur weiteren Verifizierung dieses Mechanismus könnte in vergleichbaren Co-Präzipitations- oder Quervernetzungsansätzen wie unter Abbildung 61 untersucht werden, ob der Hypothese zufolge die BiP-R197-Mutanten tatsächlich unfähig sind an Sec61 α zu binden und ferner, ob eine Vorbehandlung mit Tunicamycin bzw. DTT ebenfalls zu einer reduzierten Interaktion führt.

VIII. Literatur

Internetquellen: www.eurofindna.com
www.fermentas.de

- 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. *Journal of Cell Science* 120, 1743-1751.
- Abramov, A.Y., and Duchen, M.R. (2003).** Actions of ionomycin, 4-BrA23187 and a novel electrogenic Ca²⁺ ionophore on mitochondria in intact cells. *Cell Calcium* 33, 101-112.
- Agrawal, B.B., and Goldstein, I.J. (1965).** Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochem J* 96, 23contd-25c.
- Alder, N.N., Shen, Y., Brodsky, J.L., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (2005).** The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168, 389-399.
- Amar-Costesec, A., Dublet, B., and Beaufay, H. (1989).** Translocation and proteolytic processing of nascent secretory polypeptide chains: two functions associated with the ribosomal domain of the endoplasmic reticulum. *Biol Cell* 65, 99-108.
- Amer, M.S., Li, J., O'Regan, D.J., Steele, D.S., Porter, K.E., Sivaprasadarao, A., and Beech, D.J. (2009).** Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H910-916.
- Ampofo, E., Welker, S., Jung, M., Müller, L., Greiner, M., Zimmermann, R., and Montenarh, M. (2013).** CK2 phosphorylation of human Sec63 regulates its interaction with Sec62. *Biochim Biophys Acta*.
- 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 USA* 80, 7249-7253.
- Andreasson, C., Rampelt, H., Fiaux, J., Druffel-Augustin, S., and Bukau, B. (2010).** The endoplasmic reticulum Grp170 acts as a nucleotide exchange factor of Hsp70 via a mechanism similar to that of the cytosolic Hsp110. *J Biol Chem* 285, 12445-12453.
- Andrews, A.T. (1986).** Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications (Oxford [Oxfordshire]; New York, Clarendon Press ; Oxford University Press).
- Argon, Y., and Simen, B.B. (1999).** GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol* 10, 495-505.
- Ashby, M.C., and Tepikin, A.V. (2001).** ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12, 11-17.

- Awad, W., Estrada, I., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2008).** BiP mutants that are unable to interact with endoplasmic reticulum DnaJ proteins provide insights into interdomain interactions in BiP. *Proc Natl Acad Sci USA* *105*, 1164-1169.
- Awe, K., Lambert, C., and Prange, R. (2008).** Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS Lett* *582*, 3179-3184.
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., and Cook, W.J. (1985).** Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* *315*, 37-40.
- Baksh, S., and Michalak, M. (1991).** Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem* *266*, 21458-21465.
- Baumann, O., and Walz, B. (2001).** Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. In *International Review of Cytology* (Academic Press), pp. 149-214.
- Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J.P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., *et al.* (2009).** Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science* *326*, 1369-1373.
- 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*, 2132-2126.
- Beggah, A., Mathews, P., Beguin, P., and Geering, K. (1996).** Degradation and endoplasmic reticulum retention of unassembled alpha- and beta-subunits of Na,K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J Biol Chem* *271*, 20895-20902.
- Beilharz, T., Egan, B., Silver, P.A., Hofmann, K., and Lithgow, T. (2003).** Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *278*, 8219-8223.
- 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.
- Bennett, J., and Scott, K.J. (1971).** Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* *43*, 173-182.
- Berbey, C.I., Weiss, N., Legrand, C., and Allard, B. (2009).** Transient Receptor Potential Canonical Type 1 (TRPC1) Operates as a Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak Channel in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 36387-36394.
- Berchtold, M.W., Egli, R., Rhyner, J.A., Hameister, H., and Strehler, E.E. (1993).** Localization of the human bona fide calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3. *Genomics* *16*, 461-465.
- Bergeron, J.J.M., Brenner, M.B., Thomas, D.Y., and Williams, D.B. (1994).** Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci* *19*, 124-128.
- Bernardi, K.M., Forster, M.L., Lencer, W.I., and Tsai, B. (2008).** Derlin-1 facilitates the retrotranslocation of cholera toxin. *Mol Biol Cell* *19*, 877-884.

- Berridge, M.J. (2002).** The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32, 235-249.
- Berridge, M.J. (2006).** Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000).** Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. 2, 326-332.
- 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 homologue and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *Biol Chem* 380, 1175-1182.
- Birnboim, H.C. (1983).** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243-255.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Black, D.J., Tran, Q.K., and Persechini, A. (2004).** Monitoring the total available calmodulin concentration in intact cells over the physiological range in free Ca²⁺. *Cell Calcium* 35, 415-425.
- 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.
- Blaustein, M.P., Juhaszova, M., Golovina, V.A., Church, P.J., and Stanley, E.F. (2002).** Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 976, 356-366.
- 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 to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* 67, 852-862.
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A.M., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1993).** Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem* 268, 12730-12735.
- Blount, P., and Merlie, J.P. (1991).** BiP associates with newly synthesized subunits of the mouse muscle nicotinic receptor. *J Cell Biol* 113, 1125-1132.
- Boisramé, A., Kabani, M., Beckerich, J.M., Hartmann, E., and Gaillardin, C. (1998).** Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 273, 30903-30908.

- Bole, D.G., Hendershot, L.M., and Kearney, J.F. (1986).** Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol* *102*, 1558-1566.
- Bonardi, F., Halza, E., Walko, M., Du Plessis, F.o., Nouwen, N., Feringa, B.L., and Driessen, A.J.M. (2011).** Probing the SecYEG translocation pore size with preproteins conjugated with sizable rigid spherical molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 7775-7780.
- Boorstein, W.R., Ziegelhofer, T., and Craig, E.A. (1993).** Molecular evolution of the Hsp70 multigene family. *J Mol Evol* *38*, 1-17.
- Borgese, N., Brambillasca, S., Righi, M. and Colombo, S. (2009).** **Membrane Insertion of Tail-Anchored Proteins.** In *Protein transport into the endoplasmic reticulum*, R. Zimmermann, ed. (Landes Bioscience), pp. 91-101.
- Borgese, N., Colombo, S., and Pedrazzini, E. (2003b).** The tale of tail-anchored proteins. *The Journal of Cell Biology* *161*, 1013-1019.
- Borgese, N., and Fasana, E. (2011).** Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1808*, 937-946.
- Borgese, N., and Righi, M. (2010).** Remote origins of tail-anchored proteins. *Traffic* *11*, 877-885.
- Braakman, I., and Bulleid, N.J. (2011).** Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry* *80*, 71-99.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Makarow, M., and Borgese, N. (2006).** Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *The Journal of Cell Biology* *175*, 767-777.
- Brambillasca, S., Yabal, M., Soffientini, P., Stefanovic, S., Makarow, M., Hegde, R.S., and Borgese, N. (2005).** Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO J* *24*, 2533-2542.
- Breier, A., and Michalak, M. (1994).** 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid modification of the carboxyl-terminal region (C-domain) of calreticulin. *Mol Cell Biochem* *130*, 19-28.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T.A., Kuhlbrandt, W., and Collinson, I. (2002).** Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* *418*, 662-665.
- Brodsky, J.L., Goekeler, J., and Schekman, R. (1995).** BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* *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 Sec63-BiP complex is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* *123*, 1355-1263.
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goekeler, J.L., Kruse, K.B., and McCracken, A.A. (1999).** The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated

- protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* 274, 3453-3460.
- Brostrom, M.A., and Brostrom, C.O. (2003).** Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* 34, 345-363.
- Buchner, J. (1996).** Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* 10, 10-19.
- Bui, N., and Strub, K. (1999).** New insights into signal recognition and elongation arrest activities of the signal recognition particle. *Biol Chem* 380, 135-145.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E.A. (2000).** Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119-122.
- Bukau, B., and Horwich, A.L. (1998).** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006).** Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.
- Burda, P., and Aebi, M. (1999).** The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochem Biophys Acta* 1426, 239-257.
- Burette, A., and Weinberg, R.J. (2007).** Perisynaptic organization of plasma membrane calcium pumps in cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 500, 1127-1135.
- Bygrave, F.L., and Benedetti, A. (1996).** What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium* 19, 547-551.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002).** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2002).** Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32, 355-361.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004).** Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Cao, T.B., and Saier Jr, M.H. (2003).** The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1609, 115-125.
- Cappel, S. (2011).** Funktionale Charakterisierung der ER-luminalen Proteine BiP, Grp170 und S111 hinsichtlich der Zellvitalität und der Protein-Biogenese. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Carafoli, E., and Brini, M. (2000).** Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 152-161.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001).** Generation, Control, and Processing of Cellular Calcium Signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36, 107-260.

- Carvalho, P., Stanley, A.M., and Rapoport, T.A. (2010).** Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* 143, 579-591.
- Case, R.M., Eisner, D., Gurney, A., Jones, O., Muallem, S., and Verkhratsky, A. (2007).** Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42, 345-350.
- Celio, M.R. (1990).** Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375-475.
- Chakrabarti, A., Chen, A.W., and Varner, J.D. (2011).** A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and Bioengineering*, n/a-n/a.
- Chakravarthi, S., Jessop, C.E., and Bulleid, N.J. (2006).** The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep* 7, 271-275.
- Challa, S., Barrette, R., Rood, D., Zinckgraf, J., French, R., and Silbart, L. (2007).** Non-toxic *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A expressing the FMDV VP1 G-H loop for mucosal vaccination of swine against foot and mouth disease virus. *Vaccine* 25, 3328-3337.
- Chami, M., Gozuacik, D., Lagorce, D., Brini, M., Falson, P., Peaucellier, G.r., Pinton, P., Lecoeur, H., Gougeon, M.-L., le Maire, M., *et al.* (2001).** Serca1 Truncated Proteins Unable to Pump Calcium Reduce the Endoplasmic Reticulum Calcium Concentration and Induce Apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 153, 1301-1314.
- Chami, M., Oules, B., Szabadkai, G., Tacine, R., Rizzuto, R., and Paterlini-Brechot, P. (2008).** Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol Cell* 32, 641-651.
- Cheetham, M.E., and Caplan, A.J. (1998).** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3, 28-36.
- Cheetham, M.E., Jackson, A.P., and Anderton, B.H. (1994).** Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, Hsj1a and Hsj1b. *Eur J Biochem* 226, 99-107.
- Chen, X., Karnovsky, A., Sans, M.D., Andrews, P.C., and Williams, J.A. (2010).** Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: insights from proteomic studies. *Proteomics* 10, 4040-4052.
- Chen, X., VanValkenburgh, C., Liang, H., Fang, H., and Green, N. (2001).** Signal Peptidase and Oligosaccharyltransferase Interact in a Sequential and Dependent Manner within the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2411-2416.
- Cheung, K.-H., Shineman, D., Müller, M., Cárdenas, C., Mei, L., Yang, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Lee, V.M.Y., and Foskett, J.K. (2008).** Mechanism of Ca²⁺ Disruption in Alzheimer's Disease by Presenilin Regulation of InsP3 Receptor Channel Gating. *Neuron* 58, 871-883.
- Cheung, W.Y. (1980).** Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207, 19-27.
- Chevet, E., Cameron, P.H., Pelletier, M.F., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (2001).** The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol* 11, 120-124.

- Chigri, F., Soll, J., and Vothknecht, U.C. (2005).** Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J* 42, 821-831.
- Chillaron, J., and Haas, I.G. (2000).** Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. *Mol Biol Cell* 11, 217-226.
- Chirico, W.J., Waters, M.G., and Blobel, G. (1988).** 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810.
- Cho, S., Beintema, J.J., and Zhang, J. (2005).** The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics* 85, 208-220.
- Chong, D.C., Paton, J.C., Thorpe, C.M., and Paton, A.W. (2008).** Clathrin-dependent trafficking of subtilase cytotoxin, a novel AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Cellular Microbiology* 10, 795-806.
- Chung, K.T., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2002).** BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* 277, 47557-47563.
- Cieciura, S.J., Marcus, P.I., and Puck, T.T. (1956).** Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues. *J Exp Med* 104, 615-628.
- Clapham, D.E. (2007).** Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
- Cline, J., Braman, J.C., and Hogrefe, H.H. (1996).** PCR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases. *Nucleic Acids Research* 24, 3546-3551.
- Coe, H.a.M., M. (2009).** Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *General physiology and biophysics* 28, F96-F103.
- Coelho-Sampaio, T., Teixeira-Ferreira, A., and Vieyra, A. (1991).** Novel effects of calmodulin and calmodulin antagonists on the plasma membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 266, 10249-10253.
- Colbeau, A., Nachbaur, J., and Vignais, P.M. (1971).** Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim Biophys Acta* 249, 462-492.
- Colombo, S.F., Longhi, R., and Borgese, N. (2009).** The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. *Journal of Cell Science* 122, 2383-2392.
- Connolly, T., and Gilmore, R. (1986).** Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein. *J Cell Biol* 103, 2253-2261.
- Connolly, T., and Gilmore, R. (1993).** GTP hydrolysis by complexes of the signal recognition particle and the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 123, 799-807.
- Connolly, T., Rapiejko, P.J., and Gilmore, R. (1991).** Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* 252, 1171-1173.
- Conolly, T., and Gilmore, R. (1989).** The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57, 599-610.

- Corbett, E.F., Oikawa, K., Francois, P., Tessier, D.C., Kay, C., Bergeron, J.J.M., Thomas, D.Y., Krause, K.-H., and Michalak, M. (1999).** Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem* 274, 6203-6211.
- Corsi, A.K., and Schekman, R. (1996).** Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 30299-30302.
- Corsi, A.K., and Schekman, R. (1997).** The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 137, 1483-1493.
- Craven, R.A., Egerton, M., and Stirling, C.J. (1996).** A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* 15, 2640-2650.
- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., and Johnson, A.E. (1994).** Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, 461-471.
- Crowley, K.S., Reinhart, G.D., and Johnson, A.E. (1993).** The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101-1115.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P.t., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T.s., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006).** Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 174, 915-921.
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., and Hajnóczky, G. (2010).** Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular cell* 39, 121-132.
- Cui, J., Kaandorp, J.A., Sloot, P.M., Lloyd, C.M., and Filatov, M.V. (2009).** Calcium homeostasis and signaling in yeast cells and cardiac myocytes. *FEMS Yeast Res* 9, 1137-1147.
- Dalbey, R.E., Lively, M.O., Bron, S., and van Dijl, J.M. (1997).** The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci* 6, 1129-1138.
- Dalbey, R.E., and von Heijne, G. (1992).** Signal peptidase in prokaryotes and eukaryotes - a new protease family. *Trends Biochem Sci* 17, 474-478.
- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A.G., Tian, X., Onoe, T., Qian, Q., Li, A., Cai, Y., Kamath, P.S., King, B.F., et al. (2004).** Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet* 36, 575-577.
- Dempski, R.E., Jr., and Imperiali, B. (2002).** Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol* 6, 844-850.
- Denic, V. (2012).** A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man. *Trends Biochem Sci* 37, 411-417.
- Deshai, R.J., Koch, D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A., and Schekman, R. (1988).** A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332, 800-805.

- 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. (1987).** A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 105, 633-645.
- 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.
- Di Giovanni, J., Iborra, C., Maulet, Y., Leveque, C., El Far, O., and Seagar, M. (2010).** Calcium-dependent regulation of SNARE-mediated membrane fusion by calmodulin. *J Biol Chem* 285, 23665-23675.
- Dick, I.E., Tadross, M.R., Liang, H., Tay, L.H., Yang, W., and Yue, D.T. (2008).** A modular switch for spatial Ca²⁺ selectivity in the calmodulin regulation of CaV channels. *Nature* 451, 830-834.
- Dierks, T., Klappa, P., Wiech, H., and Zimmermann, R. (1993).** The role of molecular chaperones in protein transport into the endoplasmic reticulum. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 339, 79-85.
- Dierks, T., Volkmer, J., Schlenstedt, G., Jung, C., Sandholzer, U., Zachmann, K., Schlotterhose, P., Neifer, K., Schmidt, B., and Zimmermann, R. (1996).** A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J* 15, 6931-6942.
- du Plessis, D.J.F., Nouwen, N., and Driessen, A.J.M. (2011).** The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 851-865.
- Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., Müller, L., and Zimmermann, R. (2009).** Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* 66, 1556-1569.
- Dudek, J., Greiner, M., Muller, A., Hendershot, L.M., Kopsch, K., Nastainczyk, W., and Zimmermann, R. (2005).** ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1008-1014.
- Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Muller, A., Lerner, M., Feick, P., Schafer, K.-H., Morgenstern, E., Hennessy, F., *et al.* (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 interaction between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 10, 329-344.
- Dwyer, J.L. (1993).** **Electrophoretic Techniques of Analysis and Isolation.** In, pp. 313-363.
- Earle, W.R., Bryant, J.C., and Schilling, E.L. (1954).** Certain factors limiting the size of the tissue culture and the development of massive cultures. *Ann N Y Acad Sci* 58, 1000-1011.
- Easton, D.P., Kaneko, Y., and Subjeck, J.R. (2000).** The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s. *Cell Stress Chaperones* 5, 276-290.
- Editorial (2003).** Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 5, 489-490.

- Edman, J.C., Ellis, L., Blacher, R.W., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1985).** Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317, 267-270.
- Egea, P.F., Stroud, R.M., and Walter, P. (2005).** Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 15, 213-220.
- Eilenberg, H., Klinger, E., Przedeki, F., and Shechter, I. (1989).** Inactivation and activation of various membranal enzymes of the cholesterol biosynthetic pathway by digitonin. *Journal of Lipid Research* 30, 1127-1135.
- Elbashir, S.M. (2001).** 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. (2001).** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20, 6877-6888.
- Eletto, D., Dersh, D., and Argon, Y. (2010).** GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 21, 479-485.
- Ellgaard, L., and Ruddock, L.W. (2005).** The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 6, 28-32.
- Ellgard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999).** Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.
- Ellis, R.J. (1997).** Molecular chaperones: avoiding the crowd. *Curr Biol* 7, R531-533.
- Ennis, H.L., and Lubin, M. (1964).** Cycloheximide: Aspects of Inhibition of Protein Synthesis in Mammalian Cells. *Science* 146, 1474-1476.
- Erdmann, F., Jung, M., Eyrich, S., Lang, S., Helms, V., Wagner, R., and Zimmermann, R. (2009).** Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity. *FEBS Letters* 583, 2359-2364.
- Erdmann, F., Jung, M., Maurer, P., Harsman, A., Zimmermann, R., and Wagner, R. (2010).** The mammalian and yeast translocon complexes comprise a characteristic Sec61 channel. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 714-720.
- Erdmann, F., Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Honigmann, A., Ahmad, M., Dudek, J., Benedix, J., Harsman, A., Kopp, A., et al. (2011).** Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 30, 17-31.
- Evans, E.A., Gilmore, R., and Blobel, G. (1986).** Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 581-585.
- Evans, T.I., and Shea, M.A. (2009).** Energetics of calmodulin domain interactions with the calmodulin binding domain of CaMKII. *Proteins* 76, 47-61.
- Favaloro, V., Vilardi, F., Schlecht, R., Mayer, M.P., and Dobberstein, B. (2010).** Asna1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins. *J Cell Sci* 123, 1522-1530.
- Fedeles, S.V., Tian, X., Gallagher, A.-R., Mitobe, M., Nishio, S., Lee, S.H., Cai, Y., Geng, L., Crews, C.M., and Somlo, S. (2011).** A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet* 43, 639-647.

- Feldheim, D., Rothblatt, J., and Scheckman, R. (1992).** Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Mol Cell Biol* 12, 3288-3296.
- Feldheim, D., and Schekman, R. (1994).** Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol* 126, 935-943.
- Feldkamp, M.D., O'Donnell, S.E., Yu, L., and Shea, M.A. (2010).** Allosteric effects of the antipsychotic drug trifluoperazine on the energetics of calcium binding by calmodulin. *Proteins* 78, 2265-2282.
- Ferrari, D.M., and Soling, H.D. (1999).** The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* 339 (Pt 1), 1-10.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006).** A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005).** Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-341.
- 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.
- Fisher, P.J., Prendergast, F.G., Ehrhardt, M.R., Urbauer, J.L., Wand, A.J., Sedarous, S.S., McCormick, D.J., and Buckley, P.J. (1994).** Calmodulin interacts with amphiphilic peptides composed of all D-amino acids. *Nature* 368, 651-653.
- Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D.B. (1990).** Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628.
- Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V.y., Beck, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006).** Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* 20, 1215-1217.
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T., and Rothman, J.E. (1991).** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353, 726-730.
- 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.
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.H., and Mak, D.O. (2007).** Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol Rev* 87, 593-658.
- Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2000).** Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5723-5728.
- Francoeur A, A.A., Microcat (1996).** A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. *Biochemica* 3, 19-25.
- Freymann, D.M., Keenan, R.J., Stroud, R.M., and Walter, P. (1997).** Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature* 385, 361-364.

- Gallego-Sandín, S., Alonso, M.T., and García-Sancho, J. (2011).** Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress. *Biochemical Journal* 437, 469-475.
- Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1992).** Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Gierasch, L.M. (1989).** Signal sequences. *Biochemistry* 28, 923-930.
- Gilead, Z., Jeng, Y.H., Wold, W.S., Sugawara, K., Rho, H.M., Harter, M.L., and Green, M. (1976).** Immunological identification of two adenovirus 2-induced early proteins possibly involved in cell transformation. *Nature* 264, 263-266.
- Gilmore, R., Blobel, G., and Walter, P. (1982a).** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* 95, 463-469.
- Gilmore, R., Walter, P., and Blobel, G. (1982b).** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 95, 470-477.
- Giodini, A., Rahner, C., and Cresswell, P. (2009).** Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3324-3329.
- Giunti, R., Gamberucci, A., Fulceri, R., Bánhegyi, G., and Benedetti, A. (2007).** Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: A mechanistic study on rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462, 115-121.
- Gnegy, M.E. (1993).** Calmodulin in neurotransmitter and hormone action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 45-70.
- Goder, V., Crottet, P., and Spiess, M. (2000).** In vivo kinetics of protein targeting to the endoplasmic reticulum determined by site-specific phosphorylation. *EMBO J* 19, 6704-6712.
- Goder, V., and Spiess, M. (2003).** Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 22, 3645-3653.
- Gomez-Lorenzo, M.G., Spahn, C.M., Agrawal, R.K., Grassucci, R.A., Penczek, P., Chakraborty, K., Ballesta, J.P., Lavandera, J.L., Garcia-Bustos, J.F., and Frank, J. (2000).** Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *EMBO J* 19, 2710-2718.
- 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.
- Gouridis, G., Karamanou, S., Gelis, I., Kalodimos, C.G., and Economou, A. (2009).** Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature* 462, 363-367.
- Greene, M.K., Maskos, K., and Landry, S.J. (1998).** Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6108-6113.

- Greiner, M., Kreutzer, B., Jung, V., Grobholz, R., Hasenfus, A., Stöhr, R.F., Tornillo, L., Dudek, J., Stöckle, M., Unteregger, G., et al. (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., Cavalié, A., Unteregger, G., Zimmermann, R., and Wullich, B. (2011b).** Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *The Prostate* 71, 1074-1083.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985).** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3440-3450.
- Guerini, D., Garcia-Martin, E., Zecca, A., Guidi, F., and Carafoli, E. (1998).** The calcium pump of the plasma membrane: membrane targeting, calcium binding sites, tissue-specific isoform expression. *Acta Physiol Scand Suppl* 643, 265-273.
- Gumbart, J., and Schulten, K. (2006).** Molecular Dynamics Studies of the Archaeal Translocon. *Biophysical journal* 90, 2356-2367.
- Gumbart, J., and Schulten, K. (2007).** Structural determinants of lateral gate opening in the protein translocon. *Biochemistry* 46, 11147-11157.
- Gumbart, J., Trabuco, L.G., Schreiner, E., Villa, E., and Schulten, K. (2009).** Regulation of the Protein-Conducting Channel by a Bound Ribosome. *Structure (London, England : 1993)* 17, 1453-1464.
- Gustafsson, M.G., Shao, L., Carlton, P.M., Wang, C.J., Golubovskaya, I.N., Cande, W.Z., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (2008).** Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J* 94, 4957-4970.
- Haas, I.G. (1994).** BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* 50, 1012-1020.
- Haas, I.G., and Wabl, M. (1983).** Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387-389.
- Haigh, N.G., and Johnson, A.E. (2002).** A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol* 156, 261-270.
- 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.
- Halic, M., and Beckmann, R. (2005).** The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 116-125.
- Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M.R., Sinning, I., and Beckmann, R. (2006).** Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* 312, 745-747.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammadi, M., Oulidi, A., Gackiere, F., Katsogiannou, M., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Dewailly, E., Delcourt, P., Lepage, G., Lotteau, S., et al. (2013).** Modulation of ER stress

- and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J.*
- Hamman, B.D., Chen, J.-C., Johnson, E.E., and Johnson, A.E. (1997).** The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89, 535-544.
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M., and Johnson, A.E. (1998).** BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
- Hammond, C., and Helenius, A. (1994).** Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* 126, 41-52.
- Hammond, C., and Helenius, A. (1995).** Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 523-529.
- Hanahan, D., and Meselson, M. (1983).** Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* 100, 333-342.
- Hannon, G.J. (2002).** RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I., and Ron, D. (2002).** Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 575-599.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000).** Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999).** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- Harper, J.L., and Daly, J.W. (2000).** Effect of calmidazolium analogs on calcium influx in HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 60, 317-324.
- Harsman, A., Kopp, A., Wagner, R., Zimmermann, R., and Jung, M. (2011c).** Calmodulin regulation of the calcium-leak channel Sec61 is unique to vertebrates. *Channels* 5, 293-298.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009).** Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 16, 574-581.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Gorlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T.A. (1994).** Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367, 654-657.
- Haßdenteufel, S. (2011).** Einfluss von Ca²⁺-CaM, ATP und SEC-Proteinen auf die Biogenese der "tail-anchor"-Membranproteine Diplomarbeit, Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB), Universität des Saarlandes.
- 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 letters* 585, 3485-3490.

- Hatsuzawa, K., Tagaya, M., and Mizushima, S. (1997).** The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane. *J Biochem* 121, 270-277.
- Haunso, A., Simpson, J., and Antoni, F.A. (2003).** Small ligands modulating the activity of mammalian adenylyl cyclases: a novel mode of inhibition by calmidazolium. *Mol Pharmacol* 63, 624-631.
- Hegde, R.S., and Kang, S.-W. (2008).** The concept of translocational regulation. *The Journal of Cell Biology* 182, 225-232.
- Hegde, R.S., and Keenan, R.J. (2011).** Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 787-798.
- Hegde, R.S., and Lingappa, V.R. (1999).** Regulation of protein biogenesis at the endoplasmic reticulum membrane. *Trends Cell Biol* 9, 132-137.
- Helenius, A., Trombetta, E.S., Herbert, D.N., and Simons, J.F. (1997).** Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol* 7, 193-200.
- Hendershot, L.M., and Kearney, J.F. (1988).** A role for human heavy chain binding protein in the developmental regulation of immunoglobulin transport. *Mol Immunol* 25, 585-595.
- Hendrick, J.P., and Hartl, F.U. (1993).** Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62, 349-384.
- Hennessy, F., Cheetham, M.E., Dirr, H.W., and Blatch, G.L. (2000).** Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress Chaperones* 5, 347-358.
- Heritage, D., and Wonderlin, W.F. (2001).** Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *J Biol Chem* 276, 22655-22662.
- Hewavitharana, T., Deng, X., Wang, Y., Ritchie, M.F., Girish, G.V., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2008).** Location and Function of STIM1 in the Activation of Ca²⁺ Entry Signals. *Journal of Biological Chemistry* 283, 26252-26262.
- High, S., Lecomte, F.J., Russell, S.J., Abell, B.M., and Oliver, J.D. (2000).** Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett* 476, 38-41.
- High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S.S., Ashford, A.J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B., *et al.* (1993).** Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem* 268, 26745-26751.
- High, S., and Stirling, C.J. (1993).** Protein translocation across membranes: Common themes in divergent organisms. *Trends Cell Biol* 3, 335-339.
- Hilgemann, D.W., Yaradanakul, A., Wang, Y., and Fuster, D. (2006).** Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17 Suppl 1, S47-S56.
- Hinrichsen, R.D. (1993).** Calcium and calmodulin in the control of cellular behavior and motility. *Biochim Biophys Acta* 1155, 277-293.

- Hizlan, D., Robson, A., Whitehouse, S., Gold, V.A., Vonck, J., Mills, D., Kuhlbrandt, W., and Collinson, I. (2012).** Structure of the SecY complex unlocked by a preprotein mimic. *Cell Rep* 1, 21-28.
- Hofer, A.M., Curci, S., Machen, T.E., and Schulz, I. (1996).** ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. *FASEB J* 10, 302-308.
- Hofer, A.M., Schlue, W.R., Curci, S., and Machen, T.E. (1995).** Spatial distribution and quantitation of free luminal [Ca] within the InsP3-sensitive internal store of individual BHK-21 cells: ion dependence of InsP3-induced Ca release and reloading. *FASEB J* 9, 788-798.
- Hogan, P.G., Lewis, R.S., and Rao, A. (2010).** Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28, 491-533.
- Hoseki, J., Ushioda, R., and Nagata, K. (2009).** Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* 147, 19-25.
- Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007).** Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 25, 193-205.
- Hu, C.C., Dougan, S.K., Winter, S.V., Paton, A.W., Paton, J.C., and Ploegh, H.L. (2009).** Subtilase cytotoxin cleaves newly synthesized BiP and blocks antibody secretion in B lymphocytes. *J Exp Med* 206, 2429-2440.
- Hu, K., Carroll, J., Fedorovich, S., Rickman, C., Sukhodub, A., and Davletov, B. (2002).** Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion. *Nature* 415, 646-650.
- Ikeda, J., Kaneda, S., Kuwabara, K., Ogawa, S., Kobayashi, T., Matsumoto, M., Yura, T., and Yanagi, H. (1997).** Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 94-99.
- Ikura, M., and Ames, J.B. (2006).** Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1159-1164.
- Ishida, H., and Vogel, H.J. (2006).** Protein-peptide interaction studies demonstrate the versatility of calmodulin target protein binding. *Protein Pept Lett* 13, 455-465.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 255, 2123-2130.
- Jackson, M.E., Simpson, J.C., Girod, A., Pepperkok, R., Roberts, L.M., and Lord, J.M. (1999).** The KDEL retrieval system is exploited by *Pseudomonas* exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 112 (Pt 4), 467-475.
- Jackson, R.C., and Blobel, G. (1977).** Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5598-5602.

- Jackson, T.R., Patterson, S.I., Thastrup, O., and Hanley, M.R. (1988).** A novel tumour promoter, thapsigargin, transiently increases cytoplasmic free Ca²⁺ without generation of inositol phosphates in NG115-401L neuronal cells. *Biochem J* 253, 81-86.
- Jaepel, J., and Blum, R. (2011).** Capturing ER calcium dynamics. *European Journal of Cell Biology* 90, 613-619.
- Jan, C.R., and Tseng, C.J. (2000).** Calmidazolium-induced rises in cytosolic calcium concentrations in Madin Darby canine kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 162, 142-150.
- Janda, C.Y., Li, J., Oubridge, C., Hernandez, H., Robinson, C.V., and Nagai, K. (2010).** Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* 465, 507-510.
- Jiang, J., Maes, E.G., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Lafer, E.M., and Sousa, R. (2007).** Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol Cell* 28, 422-433.
- Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M., and Sousa, R. (2005).** Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell* 20, 513-524.
- Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, M., Gambetti, P., and Singh, N. (2000).** The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 275, 38699-38704.
- 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.
- John, L.M., Lechleiter, J.D., and Camacho, P. (1998).** Differential Modulation of SERCA2 Isoforms by Calreticulin. *The Journal of Cell Biology* 142, 963-973.
- Johnson, A.E., and van Waes, M.A. (1999).** The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 799-842.
- Johnson, J.D., and Wittenauer, L.A. (1983).** A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands. *Biochem J* 211, 473-479.
- Johnson, N., Vilardi, F., Lang, S., Leznicki, P., Zimmermann, R., and High, S. (2012).** TRC-40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *Journal of Cell Science Advance Online Publication*, doi:10.1242/jcs.102608
- Jung, V., Kindlich, R., Kamradt, J., Jung, M., Müller, M., Schulz, W., Engers, R., Unteregger, G., Stöckle, M., Zimmermann, R., et al. (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.
- Kabani, M., Kelley, S.S., Morrow, M.W., Montgomery, D.L., Sivendran, R., Rose, M.D., Gierasch, L.M., and Brodsky, J.L. (2003).** Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* 14, 3437-3448.
- 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.

- Kalies, K.-U., Rapoport, T.A., and Hartmann, E. (1998).** The beta-Subunit of the Sec61 Complex Facilitates Cotranslational Protein Transport and Interacts with the Signal Peptidase during Translocation. *The Journal of Cell Biology* *141*, 887-894.
- Kalies, K.U., Görlich, D., and Rapoport, T.A. (1994).** Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* *126*, 925-934.
- Kamariah, N., Eisenhaber, F., Adhikari, S., Eisenhaber, B., and Gruber, G. (2011).** Purification and crystallization of yeast glycosylphosphatidylinositol transamidase subunit PIG-S (PIG-S71-467). *Acta Crystallographica Section F* *67*, 896-899.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010).** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 579-592.
- Kanekal, S., Sahai, A., Jones, R.E., and Brown, D. (1995).** Storage-phosphor autoradiography: a rapid and highly sensitive method for spatial imaging and quantitation of radioisotopes. *J Pharmacol Toxicol Methods* *33*, 171-178.
- 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., Schrempf, S., Lemberg, M. and Dobberstein, B. (2009).** **Post-Targeting Functions of Signal Peptides.** In *Protein transport into the Endoplasmic Reticulum*, R. Zimmermann, ed. (Landes Bioscience), pp. 1-16.
- Kassenbrock, C.K., Garcia, P.D., Walter, P., and Kelly, R.B. (1988).** Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated *in vitro*. *Nature* *335*, 90-93.
- Katiyar, S., Joshi, S., and Lennarz, W.J. (2005).** The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* *16*, 4584-4594.
- Kaufman, R.J., Back, S.H., Song, B., Han, J., and Hassler, J. (2010).** The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in beta-cells. *Diabetes Obes Metab* *12 Suppl 2*, 99-107.
- Kawasaki, H., and Kretsinger, R.H. (1994).** Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Protein Profile* *1*, 343-517.
- 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.
- Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (2006).** An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* *16*, 47R-62R.
- Kim, J.H., Johannes, L., Goud, B., Antony, C., Lingwood, C.A., Daneman, R., and Grinstein, S. (1998).** Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2997-3002.
- Kim, K., Lee, Y.S., and Carthew, R.W. (2007).** Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA* *13*, 22-29.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., and Murakami, S. (2006).** Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* *11*, 5-13.

- 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. *Developmental Cell* 2, 207-217.
- Klappa, P., Freedman, R.B., and Zimmermann, R. (1995).** Protein disulfide isomerase and a luminal cyclophilin-type peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase are in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *Eur J Biochem* 232, 755-764.
- 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* 10, 2795-2803.
- Klausner, R.D., and Sitia, R. (1990).** Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* 62, 611-614.
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004).** Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 16, 343-349.
- Knittler, M.R., and Haas, I.G. (1992).** Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *Embo J* 11, 1573-1581.
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.-J., and Mori, K. (1993).** The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 13, 877-890.
- Kong Au, T., and Chow Leung, P. (1998).** Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Physiol* 118, 965-973.
- Koopmann, J.-O., Albring, J., Hüter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Hämmerling, G.J., and Momburg, F. (2000).** Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity* 13, 117-127.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985).** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.
- Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003).** For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J* 22, 2309-2317.
- Kowarik, M., Kung, S., Martoglio, B., and Helenius, A. (2002).** Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10, 769-778.
- Kreibich, G., Ulrich, B.L., and Sabatini, D.D. (1978).** Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II. Membrane characteristics of rough microsomes. *J Cell Biol* 77, 464-487.
- Krieg, P.A., and Melton, D.A. (1984).** Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucl Acids Res* 12, 7057-7070.
- Kroczyńska, B., Evangelista, C.M., Samant, S.S., Elguindi, E.C., and Blond, S.Y. (2004).** The SANT2 domain of the murine tumor cell DnaJ-like protein 1 human homologue interacts with alpha1-antichymotrypsin and kinetically interferes with its serpin inhibitory activity. *J Biol Chem* 279, 11432-11443.

- Kuhlbrandt, W. (2004).** Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 282-295.
- Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B., and Rapoport, T.A. (1995).** Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* 14, 217-223.
- Kutay, U., Hartmann, E., and Rapoport, T.A. (1993).** A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol* 3, 72-75.
- Laboissiere, M.C., Sturley, S.L., and Raines, R.T. (1995).** The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds. *J Biol Chem* 270, 28006-28009.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 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. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S.V., Schorr, S., Schirra, C., Schäuble, N., Jalal, C., Greiner, M., Haßdenteufel, S., Tatzelt, J., et al. (2012).** Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Journal of Cell Science* 125, 1958-1969.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A., and Zimmermann, R. (2011).** Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels*, in press.
- Latterich, M., and Schekman, R. (1994).** The karyogamy gene KAR2 and novel proteins are required for ER-membrane fusion. *Cell* 78, 87-98.
- 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.
- Le Gall, S., Neuhof, A., and Rapoport, T. (2004).** The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Mol Biol Cell* 15, 447-455.
- Lebiedzinska, M., Szabadkai, G.r., Jones, A.W.E., Duszynski, J., and Wieckowski, M.R. (2009).** Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 1805-1816.
- Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., and Subject, J. (1995).** Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 270, 15725-15733.

- Lee, A.S. (1992).** Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr Opin Cell Biol* 4, 267-273.
- Lee, A.S. (2001).** The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26, 504-510.
- Legate, K.R., Falcone, D., and Andrews, D.W. (2000).** Nucleotide-dependent binding of the GTPase domain of the signal recognition particle receptor beta-subunit to the alpha-subunit. *J Biol Chem* 275, 27439-27446.
- Lemberg, M.K., Bland, F.A., Weihofen, A., Braud, V.M., and Martoglio, B. (2001).** Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J Immunol* 167, 6441-6446.
- Lemberg, M.K., and Martoglio, B. (2002).** Requirements for Signal Peptide Peptidase-Catalyzed Intramembrane Proteolysis. *Molecular cell* 10, 735-744.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., and Tipton, C.L. (1984).** Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J Biol Chem* 259, 2742-2747.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., and Tipton, C.L. (1985).** Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin a. *Plant Physiol* 77, 303-308.
- Levy, R., Wiedmann, M., and Kreibich, G. (2001).** In vitro binding of ribosomes to the beta subunit of the Sec61p protein translocation complex. *J Biol Chem* 276, 2340-2346.
- Lewis, R.S. (2001).** Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19, 497-521.
- Li, J., and Lee, A.S. (2006).** Stress Induction of GRP78/BiP and Its Role in Cancer. *Current Molecular Medicine* 6, 45-54.
- Li, J., Puceat, M., Perez-Terzic, C., Mery, A., Nakamura, K., Michalak, M., Krause, K.H., and Jaconi, M.E. (2002).** Calreticulin reveals a critical Ca(2+) checkpoint in cardiac myofibrillogenesis. *J Cell Biol* 158, 103-113.
- Liebermeister, W., Rapoport, T.A., and Heinrich, R. (2001).** Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. *J Mol Biol* 305, 643-656.
- Lievremont, J.P., Rizzuto, R., Hendershot, L., and Meldolesi, J. (1997).** BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* 272, 30873-30879.
- Lin, H.Y., Masso-Welch, P., Di, Y.P., Cai, J.W., Shen, J.W., and Subject, J.R. (1993).** The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol Biol Cell* 4, 1109-1119.
- Lindquist, S., and Craig, E.A. (1988).** The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631-677.
- Linxweiler, M., Linxweiler, J., Barth, M., Benedix, J., Jung, V., Kim, Y., 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*.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., and Meyer, T. (2005).** STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.

- Liu, H., Bowes, R.C., 3rd, van de Water, B., Silience, C., Nagelkerke, J.F., and Stevens, J.L. (1997).** Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 272, 21751-21759.
- Lloyd, D.J., Wheeler, M.C., and Gekakis, N. (2010).** A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* 59, 460-470.
- Lomax, R.B., Camello, C., Van Coppenolle, F., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2002).** Basal and Physiological Ca²⁺ Leak from the Endoplasmic Reticulum of Pancreatic Acinar Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26479-26485.
- Lord, J.M., Roberts, L.M., and Lencer, W.I. (2005).** Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Curr Top Microbiol Immunol* 300, 149-168.
- Lu, K.P., and Means, A.R. (1993).** Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocr Rev* 14, 40-58.
- Lucero, H.A., Lebeche, D., and Kaminer, B. (1998).** ERcalcristorin/protein-disulfide isomerase acts as a calcium storage protein in the endoplasmic reticulum of a living cell. Comparison with calreticulin and calsequestrin. *J Biol Chem* 273, 9857-9863.
- Luik, R.M., and Lewis, R.S. (2007).** New insights into the molecular mechanisms of store-operated Ca²⁺ signaling in T cells. *Trends Mol Med* 13, 103-107.
- Lukas, T.J., Marshak, D.R., and Watterson, D.M. (1985).** Drug-protein interactions: isolation and characterization of covalent adducts of phenoxybenzamine and calmodulin. *Biochemistry* 24, 151-157.
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., and Lee, A.S. (2006).** GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 26, 5688-5697.
- Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T.A., and Dobberstein, B. (1995).** Signal sequence processing in rough microsomes. *J Biol Chem* 270, 19873-19878.
- Lyman, S.K., and Schekman, R. (1995).** Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 131, 1163-1171.
- Lyman, S.K., and Schekman, R. (1997).** Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88, 85-96.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E., and MacLennan, D.H. (1992).** Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267, 14483-14489.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2001).** The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107, 827-830.
- Machamer, C.E., Doms, R.W., Bole, D.G., Helenius, A., and Rose, J.K. (1990).** Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *J Biol Chem* 265, 6879-6883.

- MacKinnon, A.L., Garrison, J.L., Hegde, R.S., and Taunton, J. (2007).** Photo-leucine incorporation reveals the target of a cyclodepsipeptide inhibitor of cotranslational translocation. *J Am Chem Soc* *129*, 14560-14561.
- Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B.M., Zimonjic, D., Popescu, N., and Ried, T. (1999).** Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* *59*, 141-150.
- Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2010).** Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* *54*, 795-809.
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2007).** The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 716-731.
- Marcinowski, M., Höller, M., Feige, M.J., Baerend, D., Lamb, D.C., and Buchner, J. (2011).** Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 150-158.
- 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 in Cell Biology* *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.
- Masters, J.R. (2002).** HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* *2*, 315-319.
- Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T.A. (1999).** BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-a factor across the ER membrane. *Cell* *97*, 553-564.
- Matlack, K.E.S., Mothes, W., and Rapoport, T.A. (1998).** Protein translocation: tunnel vision. *Cell* *92*, 381-390.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (1998).** Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol Chem* *379*, 261-268.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005).** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* *62*, 670-684.

- Mayer, M.P., Schroder, H., Rudiger, S., Paal, K., Laufen, T., and Bukau, B. (2000).** Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol* 7, 586-593.
- Mazzarello, P. (1999).** A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol* 1, E13-15.
- Mazzarello, P., Calligaro, A., Vannini, V., and Muscatello, U. (2003).** The sarcoplasmic reticulum: its discovery and rediscovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 69-74.
- Mazzarello, P., Garbarino, C., and Calligaro, A. (2009).** How Camillo Golgi became "the Golgi". *FEBS Lett* 583, 3732-3737.
- McCormick, P.J., Miao, Y., Shao, Y., Lin, J., and Johnson, A.E. (2003).** Cotranslational Protein Integration into the ER Membrane Is Mediated by the Binding of Nascent Chains to Translocon Proteins. *Molecular cell* 12, 329-341.
- McKay, D.B., Wilbanks, S.M., Flaherty, K.M., Ha, J.H., O'Brian, M.C., and Shirvane, L. (1994).** **Stress-70 proteins and their interaction with nucleotides.** In *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, R.I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos, eds. (Plainview, NY, Cold Spring Laboratory Press), pp. 153-178.
- McMaster, C.R. (2001).** Lipid metabolism and vesicle trafficking: more than just greasing the transport machinery. *Biochem Cell Biol* 79, 681-692.
- Meador, W.E., Means, A.R., and Quijcho, F.A. (1993).** Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* 262, 1718-1721.
- Means, A.R., and Dedman, J.R. (1980).** Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature* 285, 73-77.
- Melnick, J., Aviel, S., and Argon, Y. (1992).** The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J Biol Chem* 267, 21303-21306.
- Ménétret, J.F., Hegde, R.S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Park, E., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. (2008).** Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure* 16, 1126-1137.
- Ménétret, J.F., Schaletzky, J., Clemons, W.M., Jr., Osborne, A.R., Skanland, S.S., Denison, C., Gygi, S.P., Kirkpatrick, D.S., Park, E., Ludtke, S.J., et al. (2007).** Ribosome binding of a single copy of the SecY complex: implications for protein translocation. *Mol Cell* 28, 1083-1092.
- Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K.H., Opas, M., MacLennan, D.H., and Michalak, M. (1999).** Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144, 857-868.
- Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., and Hendershot, L.M. (2002).** A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 13, 4456-4469.
- 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., and Dobberstein, B. (1980).** Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 87, 503-508.
- 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.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009).** Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417, 651-666.
- Michalak, M., Robert Parker, J.M., and Opas, M. (2002).** Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32, 269-278.
- Miller, J.D., Tajima, S., Lauffer, L., and Walter, P. (1995).** The β subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the α subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 128, 273-282.
- Milner, R.E., Baksh, S., Shemanko, C., Carpenter, M.R., Smillie, L., Vance, J.E., Opas, M., and Michalak, M. (1991).** Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 266, 7155-7165.
- Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K., and Hartl, F.-U. (1996).** Regulation of the heat-shock-protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem* 271, 19617-19624.
- Misselwitz, B. (1999).** Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J Biol Chem* 274, 20110-20115.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997).** Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887.
- Moazed, D. (2009).** Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413-420.
- Möller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B., and Wiedmann, M. (1998a).** Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Lett* 441, 1-5.
- Möller, I., Jung, M., Beatrix, B., Levy, R., Kreibich, G., Zimmermann, R., Wiedmann, M., and Lauring, B. (1998b).** A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13425-13430.
- Monesterolo, N.E., Santander, V.S., Campetelli, A.N., Arce, C.A., Barra, H.S., and Casale, C.H. (2008).** Activation of PMCA by calmodulin or ethanol in plasma membrane vesicles from rat brain involves dissociation of the acetylated tubulin/PMCA complex. *FEBS J* 275, 3567-3579.
- Montecucco, C., and Molinari, M. (2006).** Microbiology: death of a chaperone. *Nature* 443, 511-512.
- Moreau, B., Straube, S., Fisher, R.J., Putney, J.W., Jr., and Parekh, A.B. (2005).** Ca²⁺-calmodulin-dependent facilitation and Ca²⁺ inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 280, 8776-8783.

- Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Moss, J., and Noda, M. (2008).** Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell Microbiol* 10, 921-929.
- Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Watanabe, M., Nomura, F., Moss, J., and Noda, M. (2007).** Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75, 488-496.
- Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T.A. (1994).** Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* 13, 3973-3982.
- Müller, L., Diaz de Escauriaza, M., Lajoie, P., Theis, M., Jung, M., Müller, A., Burgard, C., Greiner, M., Snapp, E.L., Dudek, J., et al. (2010).** Evolutionary Gain of Function for the ER Membrane Protein Sec62 from Yeast to Humans. *Mol Biol Cell* 21, 691-703.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Munro, S., and Pelham, H.R.B. (1986).** An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291-300.
- Müsch, A., Wiedmann, M., and Rapoport, T.A. (1992).** Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69, 343-352.
- Muto, H., and Ito, K. (2008).** Peptidyl-prolyl-tRNA at the ribosomal P-site reacts poorly with puromycin. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 1043-1047.
- Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Parys, J.B., Måller-Esterl, W., et al. (2001).** Functional specialization of calreticulin domains. *The Journal of Cell Biology* 154, 961-972.
- Nakayama, S., and Kretsinger, R.H. (1994).** Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 473-507.
- Naraghi, M., and Neher, E. (1997).** Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci* 17, 6961-6973.
- Nathan, D.F., Vos, M.H., and Lindquist, S. (1997).** In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12949-12956.
- 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.
- Ngosuwan, J., Wang, N.M., Fung, K.L., and Chirico, W.J. (2003).** Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278, 7034-7042.
- Nicchitta, C.V., and Blobel, G. (1993).** Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation. *Cell* 73, 989-998.

- Nicoll, W.S., Botha, M., McNamara, C., Schlange, M., Pesce, E.R., Boshoff, A., Ludewig, M.H., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., Chapple, J.P., et al. (2007).** Cytosolic and ER J-domains of mammalian and parasitic origin can functionally interact with DnaK. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 736-751.
- Niggli, E. (1999).** Localized intracellular calcium signals in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annual Review of Physiology* 61, 311-335.
- Ning, Y.M., and Sanchez, E.R. (1996).** In vivo evidence for the generation of a glucocorticoid receptor-heat shock protein-90 complex incapable of binding hormone by the calmodulin antagonist phenoxylbenzamine. *Mol Endocrinol* 10, 14-23.
- Nishiyama, K.-i., Hanada, M., and Tokuda, H. (1994).** Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J* 13, 3272-3277.
- 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.
- Ogg, S.C., Barz, W.P., and Walter, P. (1998).** A functional GTPase domain, but not its transmembrane domain, is required for function of the SRP receptor β -subunit. *J Cell Biol* 142, 341-354.
- Ohishi, K., Nagamune, K., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2003).** Two Subunits of Glycosylphosphatidylinositol Transamidase, GPI8 and PIG-T, Form a Functionally Important Intermolecular Disulfide Bridge. *Journal of Biological Chemistry* 278, 13959-13967.
- Oikawa, D., Kimata, Y., Kohno, K., and Iwawaki, T. (2009).** Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res* 315, 2496-2504.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000).** Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 445-450.
- Okun, M.M., and Shields, D. (1992).** Translocation of preproinsulin across the endoplasmic reticulum membrane. The relationship between nascent polypeptide size and extent of signal recognition particle-mediated inhibition of protein synthesis. *J Biol Chem* 267, 11476-11482.
- Onek, L.A., and Smith, R.J. (1992).** Calmodulin and calcium mediated regulation in prokaryotes. *J Gen Microbiol* 138, 1039-1049.
- Ong, H., Liu, X., Sharma, A., Hegde, R., and Ambudkar, I. (2007).** Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch* 453, 797-808.
- Ooi, C.E., and Weiss, J. (1992).** Bidirectional movement of a nascent polypeptide across microsomal membranes reveals requirements for vectorial translocation of proteins. *Cell* 71, 87-96.
- Oyadomari, S., and Mori, M. (2004).** Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 11, 381-389.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N.C.J., and Dalbey, R.E. (2002).** Signal Peptidases. *Chemical Reviews* 102, 4549-4580.

- 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.
- Papp, S., Dziak, E., Michalak, M., and Opas, M. (2003).** Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins. *The Journal of Cell Biology* 160, 475-479.
- Parekh, A.B., and Putney, J.W., Jr. (2005).** Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85, 757-810.
- Park, E., and Rapoport, T.A. (2012).** Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes. *Annual Review of Biophysics* 41, 21-40.
- Park, J., Easton, D.P., Chen, X., MacDonald, I.J., Wang, X.Y., and Subject, J.R. (2003).** The chaperoning properties of mouse grp170, a member of the third family of hsp70 related proteins. *Biochemistry* 42, 14893-14902.
- Paton, A.W., Beddoe, T., Thorpe, C.M., Whistock, J.C., Wilce, M.C., Rossjohn, J., Talbot, U.M., and Paton, J.C. (2006).** AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* 443, 548-552.
- Paton, A.W., Srimanote, P., Talbot, U.M., Wang, H., and Paton, J.C. (2004).** A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic Escherichia coli. *The Journal of Experimental Medicine* 200, 35-46.
- Pavlovskis, O.R., Iglewski, B.H., and Pollack, M. (1978).** Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in experimental mouse infections: adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun* 19, 29-33.
- Pelham, H.R., and Jackson, R.J. (1976).** An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67, 247-256.
- Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007).** SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve* 35, 430-442.
- 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.
- Pfeffer, S., Brandt, F., Hrabe, T., Lang, S., Eibauer, M., Zimmermann, R., and Förster, F. (2012).** Structure and 3D Arrangement of Endoplasmic Reticulum Membrane-Associated Ribosomes. *Structure*.
- Phizicky, E.M., and Fields, S. (1995).** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59, 94-123.
- Pilon, M., Römisch, K., Quach, D., and Schekman, R. (1998).** Sec61p Serves Multiple Roles in Secretory Precursor Binding and Translocation into the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Molecular Biology of the Cell* 9, 3455-3473.
- Pilon, M., Schekman, R., and Römisch, K. (1997).** Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16, 4540-4548.

- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000).** Reduced Loading of Intracellular Ca²⁺ Stores and Downregulation of Capacitative Ca²⁺-Influx in Bcl-2-Overexpressing Cells. *J Cell Biol* 148, 857-862.
- Pinton, P., and Rizzuto, R. (2006).** Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* 13, 1409-1418.
- Plath, K., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., and Rapoport, T.A. (2004).** Interactions between Sec Complex and Prepro- α -Factor during Posttranslational Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* 15, 1-10.
- Potter, M.D., and Nicchitta, C.V. (2002).** Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J Biol Chem* 277, 23314-23320.
- Powers, T., and Walter, P. (1995).** Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* 269, 1422-1424.
- Pressman, S., Bei, Y., and Carthew, R. (2007).** Posttranscriptional gene silencing. *Cell* 130, 570.
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T.A., Hartmann, E., and Kalies, K.-U. (2000a).** Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J* 19, 1900-1906.
- Prinz, W.A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J.A., Silver, P.A., and Rapoport, T.A. (2000b).** Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150, 461-474.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1999).** Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *Embo J* 18, 754-762.
- Puck, T.T., Marcus, P.I., and Cieciura, S.J. (1956).** Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med* 103, 273-283.
- Puhka, M., Vihinen, H., Joensuu, M., and Jokitalo, E. (2007).** Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 179, 895-909.
- Puntervoll, P., Linding, R., Gemund, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., *et al.* (2003).** ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* 31, 3625-3630.
- Putney, J.W., Jr. (1986).** A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27504-27513.
- Raden, D., Song, W., and Gilmore, R. (2000).** Role of the cytoplasmic segments of Sec61a in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *Journal of Cell Biology* 150, 53-64.

- Rapoport, S.M., Schewe, T., Wiesner, R., Halangk, W., Ludwig, P., Janicke-Hohne, M., Tannert, C., Hiebsch, C., and Klatt, D. (1979).** The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem* 96, 545-561.
- Rapoport, T.A. (1986).** Protein translocation across and integration into membranes. *CRC Crit Rev Biochem* 20, 73-137.
- Rapoport, T.A., Matlack, K.E.S., Plath, K., Misselwitz, B., and Staeck, O. (1999).** Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380, 1143-1150.
- Rasheva, V.I., and Domingos, P.M. (2009).** Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14, 996-1007.
- Raue, U., Oellerer, S., and Rospert, S. (2007).** Association of Protein Biogenesis Factors at the Yeast Ribosomal Tunnel Exit Is Affected by the Translational Status and Nascent Polypeptide Sequence. *Journal of Biological Chemistry* 282, 7809-7816.
- Rehberg, M., Lepier, A., Solchenberger, B., Osten, P., and Blum, R. (2008).** A new non-disruptive strategy to target calcium indicator dyes to the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 44, 386-399.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979).** Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-3120.
- Rhoads, A.R., and Friedberg, F. (1997).** Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J* 11, 331-340.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., et al. (2009).** Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787, 1342-1351.
- Robert, V., De Giorgi, F., Massimino, M.L., Cantini, M., and Pozzan, T. (1998).** Direct Monitoring of the Calcium Concentration in the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle Myotubes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 30372-30378.
- Roderick, H.L., Lechleiter, J.D., and Camacho, P. (2000).** Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca²⁺ oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* 149, 1235-1248.
- Rodriguez-Fonseca, C., Phan, H., Long, K.S., Porse, B.T., Kirillov, S.V., Amils, R., and Garrett, R.A. (2000).** Puromycin-rRNA interaction sites at the peptidyl transferase center. *RNA* 6, 744-754.
- Römisch, K. (1999).** Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *Journal of Cell Science* 112, 4185-4191.
- 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., et al. (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 homologue of the mammalian BiP/Grp78 gene. *Cell* 57, 1211-1221.
- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G., and Schekman, R. (1989).** Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* 109, 2641-2652.
- Roy, A., and Wonderlin, W.F. (2003).** The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 4397-4403.
- Roy, B., and Lee, A.S. (1999).** The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress-inducible complex. *Nucleic Acids Res* 27, 1437-1443.
- Rüdiger, S., Buchberger, A., and Bukau, B. (1997).** Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol* 4, 342-349.
- Rutkevich, L.A., and Williams, D.B. (2010).** Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*.
- Saelinger, C.B., Morris, R.E., and Foertsch, G. (1985).** Trafficking of Pseudomonas exotoxin A in mammalian cells. *Eur J Clin Microbiol* 4, 170-174.
- Sagara, Y., Fernandez-Belda, F., de Meis, L., and Inesi, G. (1992).** Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin. *J Biol Chem* 267, 12606-12613.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J.F. (1990).** The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell* 61, 197-199.
- Saparov, S.M., Erlandson, K., Cannon, K., Schaletzky, J., Schulman, S., Rapoport, T.A., and Pohl, P. (2007).** Determining the Conductance of the SecY Protein Translocation Channel for Small Molecules. *Molecular cell* 26, 501-509.
- Schäfer, A., and Wolf, D.H. (2009).** Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *Embo J* 28, 2874-2884.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, O., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., *et al.* (2012).** BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *Embo J* 31, 3282-3296.
- Scheibel, T., Weikl, T., and Buchner, J. (1998).** Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1495-1499.
- Scheschonka, A., Findlow, S., Schemm, R., El Far, O., Caldwell, J.H., Crump, M.P., Holden-Dye, K., O'Connor, V., Betz, H., and Werner, J.M. (2008).** Structural determinants of calmodulin binding to the intracellular C-terminal domain of the metabotropic glutamate receptor 7A. *J Biol Chem* 283, 5577-5588.
- Schewe, T., Halang, W., Hiebsch, C., and Rapoport, S.M. (1975).** A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett* 60, 149-152.

- 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 posttranslationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem* 265, 13960-13968.
- Schmidt, B.Z., and Perlmutter, D.H. (2005).** Grp78, Grp94, and Grp170 interact with alpha1-antitrypsin mutants that are retained in the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G444-455.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A., and Herzog, V. (2000).** Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148, 1203-1212.
- Schrag, J.D., Procopio, D.O., Cygler, M., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (2003).** Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci* 28, 49-57.
- Schröder, M. (2008).** Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* 65, 862-894.
- Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005).** The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789.
- Schwann, T.H. (1993).** Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants. 1847. *Obes Res* 1, 408-418.
- Schwartz, T., and Blobel, G. (2003).** Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell* 112, 793-803.
- Scidmore, M.A., Okamura, H.H., and Rose, M.D. (1993).** Genetic interactions between KAR2 and SEC63, encoding eukaryotic homologues of DnaK and DnaJ in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 4, 1145-1159.
- Scott, D.C., and Schekman, R. (2008).** Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. *J Cell Biol* 181, 1095-1105.
- Senderek, J., Krieger, M., Stendel, C., Bergmann, C., Moser, M., Breitbach-Faller, N., Rudnik-Schoneborn, S., Blaschek, A., Wolf, N.I., Harting, I., et al. (2005).** Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet* 37, 1312-1314.
- Shamu, C.E., Cox, J.S., and Walter, P. (1994).** The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol* 4, 56-60.
- Shan, S.O., and Walter, P. (2005).** Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett* 579, 921-926.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2011b).** A Flip Turn for Membrane Protein Insertion. *Cell* 146, 13-15.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2011c).** A Calmodulin-Dependent Translocation Pathway for Small Secretory Proteins. *Cell* 147, 1576-1588.
- Shelness, G.S., Kanwar, Y.S., and Blobel, G. (1988).** cDNA-derived primary structure of the glycoprotein component of canine microsomal signal peptidase complex. *J Biol Chem* 263, 17063-17070.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002a).** ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3, 99-111.

- Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2005).** ERdj3, a Stress-inducible Endoplasmic Reticulum DnaJ Homologue, Serves as a CoFactor for BiP's Interactions with Unfolded Substrates. *Molecular Biology of the Cell* 16, 40-50.
- Shen, Y., Meunier, L., and Hendershot, L.M. (2002b).** Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP *in vitro* and is induced by ER stress. *J Biol Chem* 277, 15947-15956.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2010).** Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* 143, 774-788.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., and Rapoport, T.A. (2006).** Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell* 126, 435-439.
- Siegel, V., and Walter, P. (1988).** Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: analysis of biochemical mutants of SRP. *Cell* 52, 39-49.
- Simon, S.M., and Blobel, G. (1991).** A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65, 371-380.
- Simon, S.M., Blobel, G., and Zimmerberg, J. (1989).** Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6176-6180.
- Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D., and Helenius, A. (1995).** BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J Cell Biol* 130, 41-49.
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D.H., and Lord, J.M. (1999).** Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett* 459, 80-84.
- Sitia, R., and Braakman, I. (2003).** Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891-894.
- Skowronek, M.H., Rotter, M., and Haas, I.G. (1999).** Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem* 380, 1133-1138.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X.L., Coppenolle, F.V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B., and Prevarskaya, N. (2000).** Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 527 Pt 1, 71-83.
- Snapp, E., Reinhart, G., Bogert, B., Lippincott-Schwartz, J., and Hegde, R. (2004).** The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Biol* 164, 997-1007.
- Sobieszek, A. (1989).** Calmodulin antagonist action in smooth-muscle myosin phosphorylation. Different mechanisms for trifluoperazine and calmidazolium inhibition. *Biochem J* 262, 215-223.
- Song, W., Raden, D., Mandon, E.C., and Gilmore, R. (2000).** Role of Sec61a in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. *Cell* 100, 333-343.

- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Spehr, J., Hagendorf, S., Weiss, J., Spehr, M., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2009).** Ca²⁺ - calmodulin feedback mediates sensory adaptation and inhibits pheromone-sensitive ion channels in the vomeronasal organ. *J Neurosci* 29, 2125-2135.
- Stathopoulos, P.B., Li, G.Y., Plevin, M.J., Ames, J.B., and Ikura, M. (2006).** Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* 281, 35855-35862.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., and Pavletich, N.P. (1997).** Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Stefanovic, B., Stefanovic, L., Schnabl, B., Bataller, R., and Brenner, D.A. (2004).** TRAM2 protein interacts with endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump Serca2b and is necessary for collagen type I synthesis. *Mol Cell Biol* 24, 1758-1768.
- Stefanovic, S., and Hegde, R.S. (2007).** Identification of a Targeting Factor for Posttranslational Membrane Protein Insertion into the ER. *Cell* 128, 1147-1159.
- Stewart, D.A., Cooper, C.R., and Sikes, R.A. (2004).** Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 2.
- Strehler, E.E., and Treiman, M. (2004).** Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* 4, 323-335.
- Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001).** Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 81, 21-50.
- Strynadka, N.C., and James, M.N. (1989).** Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 58, 951-998.
- Suchanek, M., Radzikowska, A., and Thiele, C. (2005).** Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2, 261-267.
- Suh, W.-C., Lu, C.Z., and Gross, C.A. (1999).** Structural features required for the interaction of the hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J Biol Chem* 274, 30534-30539.
- Sumner, J.B., and Howell, S.F. (1936).** Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol* 32, 227-237.
- Suzuki, T., Lu, J., Zahed, M., Kita, K., and Suzuki, N. (2007).** Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys* 468, 1-14.
- Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B., and Hartl, F.U. (1994).** The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of *Escherichia coli* hsp70 system-DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10345-10349.
- Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C., and Wüthrich, K. (1994).** NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure

- and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 11343-11347.
- Tajima, S., Lauffer, L., Rath, V.L., and Walter, P. (1986).** The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol* *103*, 1167-1178.
- Talmadge, K., Stahl, S., and Gilbert, W. (1980).** Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 3369-3373.
- Terzi, L., Pool, M.R., Dobberstein, B., and Strub, K. (2003).** Signal Recognition Particle Alu Domain Occupies a Defined Site at the Ribosomal Subunit Interface upon Signal Sequence Recognition. *Biochemistry* *43*, 107-117.
- Thastrup, O., Dawson, A.P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Bjerrum, P.J., Christensen, S.B., and Hanley, M.R. (1989).** Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* *27*, 17-23.
- Thomas, A.P. (2008).** Optical methods in calcium signaling. *Methods* *46*, 141-142.
- 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.
- Tidow, H., Poulsen, L.R., Andreeva, A., Knudsen, M., Hein, K.L., Wiuf, C., Palmgren, M.G., and Nissen, P. (2012).** A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes. *Nature* *491*, 468-472.
- Tipton, C.L., Paulsen, P.V., and Betts, R.E. (1977).** Effects of ophiobolin A on ion leakage and hexose uptake by maize roots. *Plant Physiol* *59*, 907-910.
- Tisi, R., Belotti, F., Wera, S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., and Martegani, E. (2004).** Evidence for inositol triphosphate as a second messenger for glucose-induced calcium signalling in budding yeast. *Curr Genet* *45*, 83-89.
- Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005).** Machines for RNAi. *Genes Dev* *19*, 517-529.
- Tozer, B.T., and Pirt, S.J. (1964).** Suspension Culture of Mammalian Cells and Macromolecular Growth-Promoting Fractions of Calf Serum. *Nature* *201*, 375-378.
- Trueman, S.F., Mandon, E.C., and Gilmore, R. (2011).** Translocation channel gating kinetics balances protein translocation efficiency with signal sequence recognition fidelity. *Molecular Biology of the Cell* *22*, 2983-2993.
- Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2010).** The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* *1*, 764-778.
- Tse, F.W., Tse, A., and Hille, B. (1994).** Cyclic Ca²⁺ changes in intracellular stores of gonadotropes during gonadotropin-releasing hormone-stimulated Ca²⁺ oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9750-9754.
- Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassylyev, D.G., Ito, K., et al. (2008).** Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. *Nature* *455*, 988-991.
- Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J., and Weissman, J.S. (2000).** Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* *290*, 1571-1574.

- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006).** Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations. *Cell* *126*, 981-993.
- 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 USA* *97*, 7214-7219.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2003).** Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* *4*, 505-510.
- Tyson, J.R., and Stirling, C.J. (2000).** LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Embo J* *19*, 6440-6452.
- van Anken, E., and Braakman, I. (2005).** Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *40*, 191-228.
- Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E., and Prevarskaya, N. (2004).** Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* *117*, 4135-4142.
- 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.
- van der Werf, S., Bradley, J., Wimmer, E., Studier, F.W., and Dunn, J.J. (1986).** Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *83*, 2330-2334.
- Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vangheluwe, P. (2009).** Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 18533-18538.
- Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y.V., Baranova, A.V., Ivanov, D.V., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006).** Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *The Journal of Cell Biology* *174*, 535-546.
- Vandonselaar, M., Hickie, R.A., Quail, J.W., and Delbaere, L.T. (1994).** Trifluoperazine-induced conformational change in Ca(2+)-calmodulin. *Nat Struct Biol* *1*, 795-801.
- Vembar, S.S., Jin, Y., Brodsky, J.L., and Hendershot, L.M. (2009).** The mammalian Hsp40 ERdj3 requires its Hsp70 interaction and substrate-binding properties to complement various yeast Hsp40-dependent functions. *J Biol Chem* *284*, 32462-32471.
- 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.

- Vidugiriene, J., and Menon, A.K. (1995).** Soluble constituents of the ER lumen are required for GPI anchoring of a model protein. *EMBO J* 14, 4686-4694.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., et al. (2006).** CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science* 312, 1220-1223.
- 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. *Journal of Cell Science* 124, 1301-1307.
- Voeltz, G., Rolls, M. and Rapoport, T., (2002).** Structural organization of the endoplasmic reticulum *EMBO reports* 3, 944-950.
- 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 endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134, 25-35.
- Volkmer, J., Guth, S., Nastainczyk, W., Knippel, P., Klappa, P., Gnau, V., and Zimmermann, R. (1997).** Pancreas specific protein disulfide isomerase, PDIp, is in transient contact with secretory proteins during late stages of translocation. *FEBS Lett* 406, 291-295.
- von Heijne, G. (1983).** Patterns of Amino Acids near Signal-Sequence Cleavage Sites. *European Journal of Biochemistry* 133, 17-21.
- 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. (1986b).** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res* 14, 4683-4690.
- Voss, N.R., Gerstein, M., Steitz, T.A., and Moore, P.B. (2006).** The Geometry of the Ribosomal Polypeptide Exit Tunnel. *Journal of Molecular Biology* 360, 893-906.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.-J., Doherty, J.J., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J.M. (1991).** SSR α and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 266, 19599-19610.
- Walter, P., and Blobel, G. (1980).** Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 7112-7116.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983a).** Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol* 96, 84-93.
- Walter, P., and Blobel, G. (1983b).** Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. *J Cell Biol* 97, 1693-1699.

- Walter, P., Gilmore, R., and Blobel, G. (1984).** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38, 5-8.
- Walter, P., and Johnson, A.E. (1994).** Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10, 87-119.
- Wang, C., Wang, H.G., Xie, H., and Pitt, G.S. (2008).** Ca²⁺/CaM controls Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors by dimerizing the NR1 C termini. *J Neurosci* 28, 1865-1870.
- Wang, C.C. (1998).** Protein disulfide isomerase assists protein folding as both an isomerase and a chaperone. *Ann N Y Acad Sci* 864, 9-13.
- Wang, H., Paton, J.C., and Paton, A.W. (2007).** Pathologic Changes in Mice Induced by Subtilase Cytotoxin, a Potent New Escherichia coli AB5 Toxin That Targets the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Infectious Diseases* 196, 1093-1101.
- Wang, L., and Dobberstein, B. (1999).** Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 457, 316-322.
- Wang, X.Y., Kazim, L., Repasky, E.A., and Subject, J.R. (2001).** Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 166, 490-497.
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998).** Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 17, 5708-5717.
- Waters, M.G., and Blobel, G. (1986).** Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J Cell Biol* 102, 1543-1550.
- 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 USA* 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.
- 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.
- Weinstein, H., and Mehler, E.L. (1994).** Ca²⁺-binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Annu Rev Physiol* 56, 213-236.
- Weitzmann, A., Baldes, C., Dudek, J., and Zimmermann, R. (2007).** The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *Febs J* 274, 5175-5187.
- Weitzmann, A., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2006).** The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sil1 function in man and mouse. *FEBS Lett* 580, 5237-5240.
- Wheeler, M.C., and Gekakis, N. (2012).** Defective ER associated degradation of a model luminal substrate in yeast carrying a mutation in the 4th ER luminal loop of Sec61p. *Biochem Biophys Res Commun* 427, 768-773.

- Whitley, P., Grahn, E., Kutay, U., Rapoport, T.A., and von Heijne, G. (1996).** A 12-residue-long polyleucine is sufficient to anchor synaptobrevin to the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* *271*, 7583-7586.
- 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.
- Wilkinson, B., and Stirling, C.J. (2009).** **Sec Complexes in the Yeast ER.** In Protein transport into the Endoplasmic Reticulum, R. Zimmermann, ed. (Landes Bioscience), pp. 55-64.
- Wilkinson, B.M., Regnacq, M., and Stirling, C.J. (1997).** Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Membrane Biol* *155*, 189-197.
- Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y., and Fay, F.S. (1985).** Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscope using Fura-2. *Nature* *318*, 558-561.
- Williams, E.J.B., Pal, C., and Hurst, L.D. (2000).** The molecular evolution of signal peptides. *Gene* *253*, 313-322.
- 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*, 679-687.
- Winnefeld, M., Grewenig, A., Schnölzer, M., Spring, H., Knoch, T.A., Gan, E.C., Rommelaere, J., and Cziepluch, C. (2006).** Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest. *Experimental Cell Research* *312*, 2500-2514.
- Wirth, A., Jung, M., Bies, C., Frenn, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R., and Wagner, R. (2003).** The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol Cell* *12*, 261-268.
- Wittke, S., Dunnwald, 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.
- Wolfson, J.J., May, K.L., Thorpe, C.M., Jandhyala, D.M., Paton, J.C., and Paton, A.W. (2008).** Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways. *Cellular Microbiology* *10*, 1775-1786.
- Wolpert, L. (1995).** Evolution of the cell theory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *349*, 227-233.
- Wu, M.M., Luik, R.M., and Lewis, R.S. (2007).** Some assembly required: constructing the elementary units of store-operated Ca²⁺ entry. *Cell Calcium* *42*, 163-172.
- Wu, Y., Li, J., Jin, Z., Fu, Z., and Sha, B. (2005).** The crystal structure of the C-terminal fragment of yeast Hsp40 Ydj1 reveals novel dimerization motif for Hsp40. *J Mol Biol* *346*, 1005-1011.
- Wuytack, F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaekers, L., Dode, L., Bobe, R., Enouf, J., Bokkala, S., Authi, K.S., and Casteels, R. (1994).** A sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem* *269*, 1410-1416.

- Yamada, M., Miyawaki, A., Saito, K., Nakajima, T., Yamamoto-Hino, M., Ryo, Y., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1995).** The calmodulin-binding domain in the mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* 308 (Pt 1), 83-88.
- Yap, K.L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., and Ikura, M. (2000).** Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* 1, 8-14.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000).** ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6, 1355-1364.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T.A. (2004).** A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998).** Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273, 33741-33749.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000).** ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20, 6755-6767.
- 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.
- Young, J.C. (2010).** Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol* 88, 291-300.
- Young, J.C., Obermann, W.M., and Hartl, F.U. (1998).** Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem* 273, 18007-18010.
- Young, J.C., Schneider, C., and Hartl, F.U. (1997).** In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett* 418, 139-143.
- Yu, M., and Haslam, D.B. (2005).** Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun* 73, 2524-2532.
- 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.
- Zahedi, R.P., Volzing, C., Schmitt, A., Frien, M., Jung, M., Dudek, J., Wortelkamp, S., Sickmann, A., and Zimmermann, R. (2009).** Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics* 9, 3463-3473.
- Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1999).** Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* 7, R173-182.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2004).** Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 25935-25938.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006).** Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies

- genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9357-9362.
- Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2005).** STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-905.
- Zhou, M., and Schekman, R. (1999).** The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* 4, 925-934.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., and Hendrickson, W.A. (1996).** Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614.
- Ziman, A.P., Ward, C.W., Rodney, G.G., Lederer, W.J., and Bloch, R.J. (2010).** Quantitative Measurement of Ca²⁺ in the Sarcoplasmic Reticulum Lumen of Mammalian Skeletal Muscle. *Biophysical journal* 99, 2705-2714.
- Zimmer, J., Nam, Y., and Rapoport, T.A. (2008).** Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* 455, 936-943.
- Zimmermann, R. (1998).** The role of molecular chaperones in protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 379, 275-282.
- Zimmermann, R. (2009).** Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum (Austin, Texas, Landes Bioscience).
- Zimmermann, R., and Blatch, G.L. (2009).** A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends Parasitol* 25, 147-150.
- Zimmermann, R., Eyrich, S., Ahmad, M., and Helms, V. (2011).** Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 912-924.
- Zimmermann, R., and Meyer, D.I. (1986).** 1986: a year of new insights into how proteins cross membranes. *Trends Biochem Sci* 11, 512-515.
- 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.B. (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., Zimmermann, M., Mayinger, P., and Klappa, P. (1991).** Photoaffinity labeling of dog pancreas microsomes with 8-azido-ATP inhibits association of nascent preprolactin with the signal sequence receptor complex. *FEBS Lett* 286, 95-99.
- Zimmermann, R., Zimmermann, M., Wiech, H., Schlenstedt, G., Müller, G., Morel, F., Klappa, P., Jung, C., and Cobet, W.W. (1990).** Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. *J Bioenerg Biomembr* 22, 711-723.
- Zopf, D., Bernstein, H., Johnson, A., and Walter, P. (1990).** The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J* 9, 4511-4517.

- Zorov, D.B., Krasnikov, B.F., Kuzminova, A.E., Vysokikh, M., and Zorova, L.D. (1997).** Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci Rep* 17, 507-520.
- Zuhlke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W., and Reuter, H. (1999).** Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399, 159-162.

IX. Danksagung

Mein großer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Richard Zimmermann, der mir nicht nur dieses überaus interessante Thema zur Verfügung gestellt hat, sondern mich zudem stets gefördert hat und ein besserer Mentor für meine wissenschaftliche Wegbereitung nicht hätte sein können. Vielen Dank Richard!

Ich bedanke mich ferner bei Prof. Dr. Adolfo Cavalié für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie die hervorragende Betreuung der Ca^{2+} -imaging-Experimente und die vielen hilfreichen Ergebnisbesprechungen.

Des Weiteren danke ich vielmals Markus Greiner und Martin Jung für das Korrekturlesen der Arbeit und viele produktive Ratschläge und Verbesserungsvorschläge. Auch möchte ich Armin Melnyk danken, der ebenfalls einen Teil der Arbeit korrekturgelesen hat.

Weiterhin möchte ich mich natürlich bei allen Mitarbeitern der AG Zimmermann für die tolle und angenehme Zeit im Labor bedanken, bei unseren Postdocs Martin Jung, Markus Greiner und Johanna Dudek für die stetige Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Tipps, ferner bei allen anderen Doktoranden/Studenten, Sven Lang, Stefan Schorr, Sabine Cappel, Julia Benedix, Sarah Haßdenteufel, Maximilian Linxweiler, Johannes Linxweiler, Armin Melnyk, Tina Keller, Anke Ziska, Alexandra Hoffmann, Marie-Christine Klein und Florian Bochen für das großartige Arbeitsklima und die vielen fruchtbaren Diskussionen (bei letzterem Punkt möchte meine beiden Ca^{2+} -Imaging-Buddys Stefan und Sven hervorheben). Und nicht zuletzt möchte ich mich in diesem Rahmen bei der unschätzbaren Unterstützung unserer technischen Assistentinnen Monika Lerner, Anika Müller, Simone Amman und Nicole Heim bedanken. Ich möchte mich vielmehr auch bei Johannes Linxweiler für die freundliche Unterstützung und hervorragende Durchführung der qRT-PCRs einiger meiner Proben bedanken, deren Ergebnisse einen wertvollen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei einigen Kooperationspartnern bedanken, bei Prof. Dr. Volkhard Helms, Prof. Dr. Robert Blum, sowie Prof. Dr. Claudia Fecher-Trost, welche allesamt freundlichst Zelllinien, Gerätschaften bzw. ihr know-how zur Verfügung gestellt haben.

Ferner danke ich meiner Familie, meinem Vater Heinz, meiner Mutter Gabriele und meinen Brüdern Christian und Jannik, die immer Verständnis hatten und mich die ganzen Jahre unterstützt haben.

Ich möchte mich insbesondere auch bei meiner lieben Freundin Tina Usner bedanken, die mich auf dem Weg zur Promotion stets unterstützt und aufgebaut hat und mir die nötige Kraft gegeben hat auch in stressigen Phasen durchzuhalten. Vielen Dank Tina! Ein ganz besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang natürlich auch meiner „Ersatzoma“ Elisabetha Usner, die mich und das ganze Labor während der ganzen Zeit bestens mit Kuchen und anderen Leckereien versorgt hat.

Zuletzt möchte ich mich bei all meinen guten Freunden bedanken, die nicht nur Verständnis für die Investition der vielen Zeit in diese Arbeit hatten, sondern in meiner Freizeit auch für den nötigen Ausgleich gesorgt haben.

X. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nico Schäuble
Geburtsdatum: 22.07.1982
Geburtsort: Waldshut-Tiengen
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch

Schulische Laufbahn

1993-2002: Leibniz-Gymnasium, St. Ingbert
1989-1993: Grundschule am Hasenfels, St. Ingbert/Oberwürzbach

Wehrdienst/Wehrersatzdienst

08/2011–05/2003: Zivildienstleistender im Kreiskrankenhaus St. Ingbert

Universitäre Ausbildung

01/2009–heute: Promotion am Lehrstuhl für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,
Uniklinikum des Saarlandes
04/2008–12/2008: Diplomarbeit am Lehrstuhl für Angewandte Molekularbiologie,
Universität des Saarlandes,
Thema: Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zur Identifizierung
von *in vivo* Interaktionspartnern des viralen K28 Toxins in Hefe
10/2003–12/2008: Studium der Human- und Molekularbiologie,
Universität des Saarlandes

Publikationen

Erdmann, F. *, **Schäuble, N.** *, Lang, S., Jung, M., Honigmann, A., Ahmad, M., Dudek, J., Benedix, J., Harsman, A., Kopp, A., *et al.* (2011). Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 30, 17-31.

*both authors contributed equally

Lang, S. *, **Schäuble, N.** *, Cavali, A., and Zimmermann, R. (2011). Live Cell Calcium Imaging Combined with siRNA Mediated Gene Silencing Identifies Ca²⁺ Leak Channels in the ER Membrane and their Regulatory Mechanisms. *Journal of Visualized Experiments*, e2730.

*both authors contributed equally

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 letters* 585, 3485-3490.

Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S.V., Schorr, S., Schirra, C., **Schäuble, N.**, Jalal, C., Greiner, M., Haßdenteufel, S., Tatzelt, J., *et al.* (2012). Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Journal of Cell Science* 125, 1958-1969.

Schäuble, N. *, Lang, S. *, Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, O., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., *et al.* (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J* 31, 3282-3296.

*both authors contributed equally