

Aus dem Bereich der
Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung der Thioreduktase TXNDC15

- Characterisation of the thioredoxin TXNDC15 -

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Theoretischen Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von:
Maik Konrad
geb. am: 27.08.1988 in Wilhelmshaven

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Summary	3
2	Einleitung	4
2.1	Allgemeine Einleitung	4
2.2	TXNDC15	7
2.3	Thioredoxine und Glutaredoxine	7
2.4	Proteinbiosynthese, Qualitätskontrolle, Glykosylierung und ERAD	10
3	Material und Methoden	16
3.1	Klonierungen	16
3.2	Gel-Elektrophorese	26
3.3	Bakterienkultivierung und Transformation	27
3.4	Zellkultur und Transfektion	29
3.5	Calcium-Imaging	32
3.6	SDS-PAGE und Westernblot	34
3.7	Fixierung und Färbung von Zellen	37
3.8	Kolokalisationsstudien	38
3.9	Durchflusszytometrie gestütztes Zellsortieren	40
3.10	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	41
3.11	Induktion von ER-Stress	43
3.12	In Kapitel 3.1 - 3.11 verwendete Materialien und Geräte	44
3.13	SPC Präparation, <i>in vitro</i> Transkription, Translation und Transport*	47
3.14	Signifikanz	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Vorversuche zum Projekt	55
4.2	Nähere Charakterisierung von TXNDC15	58
4.3	Versuche zur Überexpression von TXNDC15	65
4.4	Glykosylierung von TXNDC15	72
4.5	Lokalisation von TXNDC15	78
5	Diskussion	83
5.1	Vorversuche zum Projekt	83
5.2	Charakterisierung und Einordnung von TXNDC15	84
5.3	Zusammenführung der Überexpressionsdaten	88
5.4	Glykosylierungsmuster verschiedener Konstrukte in HEKwt-Zellen	93
5.5	Möglicher Ausblick	94
6	Literaturverzeichnis	96
7	Publikationen und Danksagung	101
7.1	Bisherige Publikationen	101
7.2	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beduetung
°C	Grad Celsius
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
g	Gram
mg	Milligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
L	Liter
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
M	Molar
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
nM	Nanomolar
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
(m/m)	Massenprozent
(v/v)	Volumenprozent

1 Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

Die STIM und Orai-Proteine sind die beiden wesentlichen molekularen Spieler des Sore Operated Calcium Entry (SOCE), der unter anderem essentiell für eine erfolgreiche Aktivierung des Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated I cells) in Immunzellen ist. Die Untersuchung der Regulation dieser beiden Proteine ist daher von großem medizinischem und biologischem Interesse. Auf der Suche nach neuen molekularen SOCE-Regulatoren wurde TXNDC15 als ein potentieller Kandidat identifiziert. Die Herunterregulation von TXNDC15 in HELA-Zellen verlangsamte die calciumabhängige NFAT-Translokation in den Zellkern. TXNDC15 ist ein weitgehend unerforschtes Protein aus der Familie der Protein Disulfid Isomerasen (PDI). PDI's spielen bei vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, unter anderem regulieren sie die Aktivität mancher Transkriptionsfaktoren, sind an der Reifung und Degradation von Proteinen beteiligt oder helfen bei der Regulation des zellulären Redoxmilieus. Eine Interaktion von TXNDC15 mit STIM und Orai wäre daher denkbar. Erste Versuche mit einer siRNA gegen TXNDC15 sahen im Calcium Imaging vielversprechend aus, wobei sich herausstellte, dass die verwendete siRNA neben TXNDC15 auch TMX4 (ein weiteres Thioredoxin) effizient herunterregulierte. Eine Wiederholung der Versuche mit einem Satz spezifischer siRNAs zeigte keinen deutlichen Effekt auf den SOCE. Versuche zur Überexpression von TXNDC15 zeigten eine deutliche Reduktion des SOCE. Der stärkste Effekt ging von der Überexpression des C-terminal GFP-getaggten TXNDC15-Konstruktes aus. Die Überexpression von N-terminal getaggt mCherry- oder von ungetaggt Konstrukten hatten nur einen geringfügigen Effekt auf den SOCE. Um diese Diskrepanzen näher zu untersuchen, wurde die Lokalisation der Konstrukte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht. Das C-terminal getaggte GFP-Konstrukt zeigte eine klare Retention im Endoplasmatischen Reticulum (ER), das N-terminale mCherry-Konstrukt eine lysosomale- und das N-terminal getaggte HA-Konstrukt eine ER- oder Golgi-Lokalisation abhängig von der verwendeten Linkersequenz. Alle untersuchten Konstrukte zeigten jedoch dieselbe Endo H-sensitive N-Glykosylierung in Westernblotexperimenten. Eine O-Glykosylierung, wie sie im Golgi stattfinden kann, konnte bei keinem der Konstrukte beobachtet werden. Viele PDI's lokalisieren in das ER, dennoch finden sich einige Vertreter dieser Proteinfamilie auch außerhalb

des ER. Einige für Thioredoxine stark konservierte Reste fehlen in TXNDC15, was auf eine atypische Thioredoxinfunktion von TXNDC15 hindeuten könnte. Untersuchungen der möglichen Struktur von TXNDC15 deuten auf Ähnlichkeiten zu Monothiol-Glutaredoxinen hin. Die genaue Funktion und Lokalisation von TXNDC15 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, jedoch liefert sie viele wichtige Grundlagen zur näheren Untersuchung von TXNDC15 in kommenden Arbeiten.

1.2 Summary

STIM and Orai proteins are two of the most important molecular players of the store operated calcium entry (SOCE), which is among other things essential for the activation and translocation of the transcription factor NFAT (nuclear factor of activated T cells) of immune cells. For that reason, the regulation of these proteins is of great interest in the fields of biology and medicine. In a screen for new potential SOCE regulators, TXNDC15 was originally identified as a strong potential hit, whose downregulation reduced the NFAT translocation to the nucleus in HELA cells. TXNDC15 is a member of the protein disulfide isomerase (PDI) family, but other than that, there is not much known about TXNDC15. PDI's regulate, among other things, the activity of some transcription factors, are part of the ER protein maturation and degradation machinery, or help to regulate the cellular redox status. An interaction of TXNDC15 with STIM or Orai is therefore possible. Early experiments with siRNA's against TXNDC15 showed promising effects in calcium imaging, but also shows off target effects on the related TMX4. A more specific set of siRNA's, however showed no effects on SOCE. Overexpression experiments with TXNDC15 show a clear reduction of SOCE with a C-terminally tagged GFP-construct producing the strongest effect, which is dependent on the catalytic N-terminal region. An N-terminally tagged mCherry-TXNDC15 and an untagged construct only had a small effect on SOCE. To gain further insight, the localization of the different constructs was studied with confocal microscopy. The C-terminally tagged GFP-construct showed clear retention within the endoplasmic reticulum (ER), the N-terminally tagged mCherry construct showed a lysosomal-, and an N-terminally tagged HA-construct showed either ER or Golgi-localization depending on the linker sequence. All of the constructs show an Endo-H sensitive N-glycosylation, and no O-glycosylation, as can be added in the Golgi. Many PDI's localize to the ER, but there are also many members of that family which are found elsewhere. Some of the strongly conserved amino acids of the thioredoxin fold are missing in TXNDC15 which might hint towards an atypical thioredoxin function of TXNDC15. Molecular analysis of the structure of TXNDC15 shows similarities to some mono-thiol glutaredoxins. The exact function and localization of TXNDC15 could not be unequivocally solved during this thesis, but the basics for future research have been set.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einleitung

Zur Interaktion mit ihrer Umwelt benötigen Zellen Mechanismen, um auf chemische, mechanische und thermische Stimuli reagieren zu können. Sie haben dafür bestimmte lösliche oder membrangebundene Liganden und Rezeptorsysteme entwickelt. Diese Rezeptorsysteme sind teilweise stark spezialisiert in Organsystemen, basieren aber oftmals auf denselben einfachen chemisch-physikalischen Grundprinzipien. Eine Möglichkeit der Signalweiterleitung basiert auf der Nutzung chemischer und/oder elektrischer Ionengradienten über ein Membransystem hinweg wie z.B. bei der Erregungsleitung in Neuronen, der Muskelkontraktion oder dem Speicher gesteuerten Calciueinstrom (SOCE) bei Immunzellen. Hierfür sind Pumpen die Ionengradienten aufbauen, erforderlich und Ionenkanäle, die auf einen bestimmten Stimulus hin dem Ion ermöglichen, seinem elektrochemischen Gradienten zu folgen. In Zellen des Immunsystems z.B. führt eine Aktivierung des T- oder B-Zellrezeptors zu einer Aktivierung einer komplexen intrazellulären Signalkaskade. An diesem Prozess ist insbesondere ein Calciumausstrom aus dem ER, aber auch ein lang anhaltender Calciueinstrom aus dem Extrazellularraum beteiligt (Shaw et al. 2013). Um die calciumabhängige Signalkaskade zu ermöglichen, benötigen Immunzellen unter anderem plasmamembranständige Rezeptoren (z.B. T-Zellrezeptor), IP3-Rezeptor-, STIM-, Orai-, SERCA- und PMCA-Proteine (siehe **Abbildung 2.1**) (Feske et al. 2012; Shaw et al. 2013). Der Calciumgradient einer ruhenden T-Zelle wird über die ATP-abhängige Aktivität der SERCA (Sarcoplasmatische / Endoplasmatische Retikulum Calcium ATPase) und PMCA (Plasmamembran Calcium ATPase) gewährleistet. Die SERCA pumpt Calcium aus dem Zytosol ins ER und die PMCA pumpt Calcium aus dem Zytosol in den Extrazellularraum. Dadurch entsteht im Zytosol mit einer niedrigen Calciumkonzentration von 1×10^{-7} M im Vergleich zum ER mit bis zu 1×10^{-3} M und dem Extrazellularraum mit 1×10^{-3} M Calcium (Feske et al. 2012). Dies stellt den Ausgangszustand einer ruhenden T-Zelle dar (Feske et al. 2012). Kommt es zu einer Aktivierung eines T- oder B-Zellrezeptors wird die calciumabhängige Signalkaskade aktiviert. Unter anderem wird eine Phospholipase C (PLC), welche das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) in das lösliche Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und membrangebundene Diacylglycerol (DAG)

spaltet, aktiviert. IP3 bindet an die IP3-Rezeptoren des ER und verursacht dabei eine Calciumfreisetzung aus dem ER (Taylor & Tovey 2010). Die Calciumfreisetzung und die draus resultierende Verringerung der luminalen Calciumkonzentration im ER führt zu einer Calcium-Dissoziation von der EF-Hand des ER residenten STIM-Proteins (Stromal Interaction Molecule). Die STIM-Proteine durchlaufen dadurch eine Konformationsänderung, oligomerisieren (Liou et al. 2005) und aktivieren die plasmamembranständigen Orai-Kanäle (Feske et al. 2006; Prakriya et al. 2006; Yeromin et al. 2006; Peinelt et al. 2006; Mercer et al. 2006; Park et al. 2009). Orai-Kanäle gewährleisten daraufhin einen sehr selektiven Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum und die Calciumkonzentration im Zytosol steigt auf 1×10^{-6} M an (Feske et al. 2012).

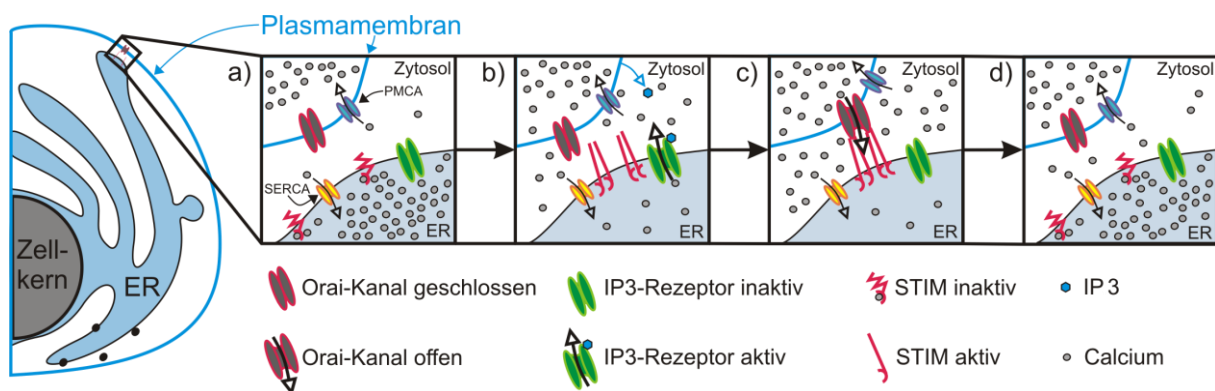


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der IP3-abhängigen ER-Calciumdepletion. (a) zeigt den Zustand einer ruhenden Zelle. Das ER ist mit Calcium gefüllt, wohingegen das Zytosol der Zelle weitgehend calciumarm ist. Dieser Zustand wird über die PMCA- und SERCA-Pumpen aufrechterhalten. (b) Durch die PLC-abhängige Spaltung des in der Plasmamembran befindlichen PIP2 und der daraus resultierenden Bildung von IP3 wird der in der ER-Membran befindliche IP3-Rezeptor aktiviert. Die Aktivierung des IP3-Rezeptors führt zu einer Calciumfreisetzung aus dem ER ins Zytosol. Durch den Abfall der Konzentration des ER-Calciums kommt es zu einer Calcium-Dissoziation von STIM, woraufhin die STIM-Moleküle oligomerisieren. (c) Die oligomerisierten STIM-Proteine aktivieren in den ER-Plasmamembran-Verbindungsstellen die Orai-Kanäle. Diese gewährleisten einen sehr selektiven Calciumeinstrom in das Zytosol. Nach Wegfall des IP3-Stimulus werden die IP3-Rezeptoren inaktiv und ermöglichen den SERCA-Pumpen ein erneutes Befüllen des ER. (d) Binden die STIM-Proteine erneut Calcium im ER, durchlaufen sie eine Konformationsänderung und dissoziieren von Orai. An dem Prozess der SOCE-Inaktivierung spielt jedoch auch eine PKC-abhängige phosphorylierung der STIM- und Orai-Protein eine Rolle (Shaw et al. 2013). Die Orai-Kanäle werden inaktiv und das zytosolische Calcium wird durch die PMCA und SERCA-Pumpen wieder auf ein Minimum reduziert.

Das ins Zytosol einströmende Calcium kann zur einer Aktivierung von NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) und das durch die Spaltung vom PIP2 gebildete DAG über die Aktivierung der PKC zu einer NF- κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) Aktivierung führen (Lee et al. 2005; Asehnoune et al. 2005; Gwack et al. 2007). NFAT und NF- κ B sind Transkriptionsfaktoren, die die Expression von diversen Proteinen steuern und somit zu einer Aktivierung und

Differenzierung von Immunzellen beitragen (Asehnoune et al. 2005; Gwack et al. 2007). Die Depletion des ER-Calciums kann mehrere unterschiedliche physiologische, aber auch pathophysiologische Ursachen haben. Der IP3-Rezeptor wird z.B. über Wasserstoffperoxid (H_2O_2) direkt aktiviert (Zheng & Shen 2005). Pharmakologisch kann eine Aktivierung des SOCE mittels des Gifts Thapsigargin bewirkt werden, welches ein Befüllen des ER durch die Hemmung der SERCA-Pumpe verhindert und somit zu einer passiven Depletion des ER führt. Unabhängig des Ursprungs der Calcium-Depletion des ER werden Veränderungen im ER-Calcium von STIM-Proteinen registriert. Die EF-Hand von STIM1 zeigt eine Calciumbindungsaffinität mit einer K_d von $\sim 0.2 - 0.6$ mM (Stathopoulos et al. 2006) und in STIM2 eine K_d von $\sim 0,5$ mM (Zheng et al. 2008) wodurch die STIM-Proteine empfindlich gegenüber selbst kleiner Veränderung im ER-Calcium sind. Eine Dysregulation der STIM- und Orai-Proteine kann ernsthafte Folgen für den Organismus haben. Eine überschießende Aktivität von STIM1 kann beim Menschen zu einer Myopathie mit tubulären Aggregaten (Böhm et al. 2013), dem Stormorken Syndrom (Misceo et al. 2014) oder dem York platelet Syndrom führen (Markello et al. 2015). In Mäusen führt eine zu hohe Aktivität von STIM1 zu verlängerten Blutungszeiten (Grosse et al. 2007). Der Verlust der STIM1 Funktion führt zur Immundefizienz, Autoimmunerkrankungen oder muskulärer Hypotonie (Picard et al. 2009). Überschießende Immunreaktionen können möglicherweise durch eine Inhibition des STIM/Orai-Systems verhindert werden. Es besteht deswegen großes medizinisches Interesse an der Erforschung der Regulation von STIM und Orai, welches neue pharmakologische Ansatzpunkte für manche Krankheiten hervorbringen könnte. Daher wurden in einem groß angelegten Screening nach neuen vielversprechenden SOCE-Regulatoren gesucht. Die Details des Screens sind in der Publikation von (Sharma et al. 2013) nachzulesen. Da bereits eine Interaktion von STIM1 mit dem redoxaktiven ERp57 gezeigt werden konnte (Prins et al. 2011), wurde zur genaueren Erforschung in dieser Arbeit das potentiell redox-aktive TXNDC15 aus den Hits des Screens ausgewählt.

2.2 TXNDC15

Hierbei handelt es sich um ein bislang weitgehend unerforschtes Protein, von dem sich homologe Proteine in zahlreichen Tierarten finden. Beim Menschen ist TXNDC15 (oder C5orf14) auf dem Chromosom 5 lokalisiert. Das menschliche Transkript enthält fünf Exons, vier Introns und codiert für ein Protein mit einer Länge von 360 Aminosäuren. Aufgrund der bioinformatischen Analyse von TXNDC15 werden ein Signalpeptid mit einer Länge von 32 Aminosäuren und als einzig bekannte katalytische Domäne eine Thioredoxin-Domäne sowie eine Transmembrandomäne zwischen Aminosäure 322 bis 342 vorhergesagt (NCBI Gene ID: 79770; Stand: 08.08.2016). Es wird daher angenommen, dass es sich bei TXNDC15 um ein Typ 1-Transmembranprotein mit einem kurzen C-Terminus von 18 Aminosäuren Länge handelt. TXNDC15 wird der Proteinfamilie der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) zugeordnet. PDIs zeichnen sich durch ihr redoxaktives CXXC-Motiv aus (C = Cystein, X = beliebige Aminosäure). TXNDC15 hat wie auch ERp44 im Gegensatz zu vielen anderen Vertretern dieser Familie allerdings ein CXXS-Motiv (S = Serin).

2.3 Thioredoxine und Glutaredoxine

Die Thioredoxine zeichnen sich durch die namensgebende Thioredoxin-Domäne aus. Sie weist bei allen Thioredoxinen eine ähnliche Sekundärstruktur auf bestehend aus fünf β -Faltblätter und vier α -Helices. Diese bilden zusammen eine Tertiärstruktur, in der die fünf β -Faltblätter den Kern der Domäne bilden, der von den vier α -Helices umgeben wird (Collet & Messens 2010). Die allgemeine Anordnung der Helices und Faltblätter ist der **Abb. 2.2** zu entnehmen. Fehlt der Domäne die α -Helix 1 und das β -Faltblatt 1, so ergibt sich die katalytische Domäne der Glutaredoxine (Collet & Messens 2010).

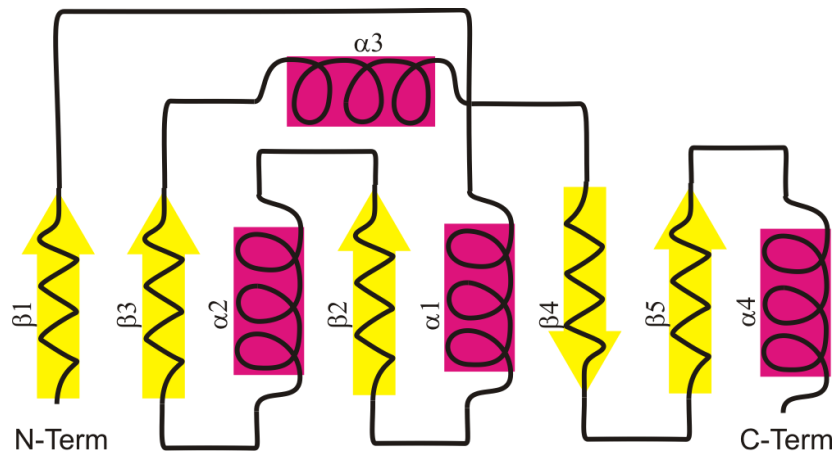


Abbildung 2.2 Allgemeine Anordnung der Sekundärstrukturen in der Thioredoxindomäne. Die Sekundärstrukturen sind vom N-Terminus aus in Richtung C-Terminus durchnummeriert. $\alpha 1$ beschreibt die erste α -Helix und $\beta 1$ das erste β -Faltblatt der Thioredoxindomäne. Modifiziert nach (Collet & Messens 2010).

Thioredoxine werden enzymatisch durch Thioredoxinreduktasen reduziert, wohingegen Glutharedoxine auf eine nicht enzymatische Reduktion durch Glutathion angewiesen sind (Meyer et al. 2009). Es gibt jedoch Ausnahmen, bei denen Glutathion Thioredoxine oder Thioredoxinreduktasen Glutaredoxine reduzieren (Gelhaye et al. 2003; Fernandes et al. 2005). Unabhängig von ihren Reduktionsmechanismen lassen sich Thio- und Glutaredoxine auch durch ihre unterschiedlichen Aminosäuresequenzen differenzieren (Meyer et al. 2009). Klassischerweise stellt das aktive Zentrum bei beiden ein CXXC-Motiv am Anfang der α -Helix 2 dar. Durch dieses Motiv sind die Proteine in der Lage, Reduktions- oder Oxidationsreaktionen an anderen Proteinen durchzuführen, wobei sie selbst oxidiert bzw. reduziert werden (Pan & Bardwell 2006) (**Abb. 2.3 (A)**). Monothiol-Thioredoxine und Monothiol-Glutaredoxine, also solche die ein CXXS-Motiv tragen, sind jedoch nur in der Lage, eine Deglutathionylierung (entfernen von Glutathion an Proteinen) oder eine Isomerisierung der Disulfidbrücken an Proteinen vorzunehmen (Sturley et al. 1995; Meyer et al. 2009) (**Abb. 2.3 (B-D)**).

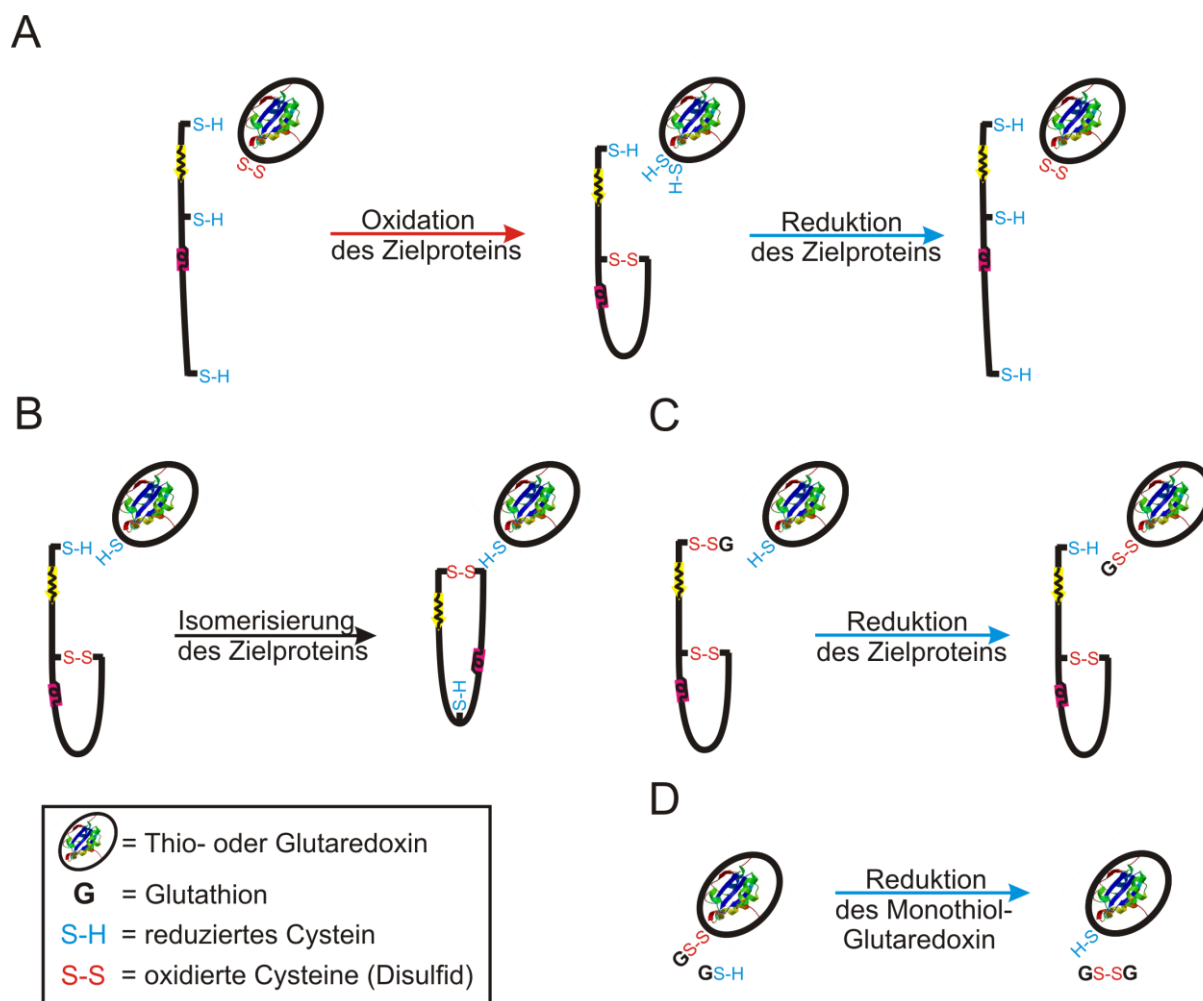


Abbildung 2.3 von Thio- und Glutaredoxine katalysierte Reaktionen. (A) Zeigt die von Dithiol-Thioredoxin und Dithiol-Glutaredoxin katalysierte Oxidation oder Reduktion von Zielproteinen. (B) veranschaulicht die sowohl von Monothiol- und Dithiol-Thioredoxin oder Monothiol- und Dithiol-Glutaredoxin vermittelte Isomerisierung der Disulfidbrücken in einem Protein. Der Redoxstatus der teilnehmenden Proteine wird hierbei nicht verändert. In (C) wird die von Monothiol-Glutaredoxinen katalysierte Deglutathionylierung von Zielproteinen und in (D) die Deglutathionylierung von Monothiol-Glutaredoxinen verdeutlicht.

Zellen benötigen Mechanismen, um ein konstantes Milieu im Inneren erzeugen zu können. Ein konstantes Milieu stellt sicher, dass chemische Reaktionen auf eine gewünschte Weise ablaufen, weswegen Zellen z.B. Einfluss auf den pH, oder die Redoxlage nehmen müssen. Thio- und Glutaredoxine sind Proteine, mit denen Zellen auf Veränderungen der eigenen Redoxhomöostase reagieren können (Meyer et al. 2009). Wie wichtig diese Einflussnahme ist, wird dadurch verdeutlicht, dass sich Thioredoxine nicht nur in Tieren, Pflanzen und Pilzen sondern auch schon in Archaeen und Bakterien finden. In einzelligen Organismen wie z.B. Hefen, ist der Verlust mehrere Monothiol-Glutaredoxine lethal (Rodríguez-Manzanique et al. 1999). In Mäusen führt sowohl der Verlust des Thioredoxinsystems (Matsui et al. 1996) oder der Verlust des Glutaredoxinsystems (Shi et al. 2000) zur embryonalen Lethalität. Diese Beispiele verdeutlichen eine Spezialisierung beider Systeme und

widerlegen eine Annahme, dass es sich um zwei redundante Systeme handeln könnte. Thio- oder Glutaredoxine sind außer an der Regulation des Redoxmilieus auch an der Bildung der Eisen-Schwefel-Cluster der Mitochondrien (Rodríguez-Manzanique et al. 2002; Haunhorst et al. 2010; Haunhorst et al. 2013), an der Qualitätskontrolle im ER (Anelli et al. 2003; Oliver et al. 1999), an der licht- und sauerstoffabhängigen Regulation von Chloroplasten (Buchanan & Balmer 2005), an einer Regulation der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Schenk et al. 1994), an der SOCE-Regulation (Prins et al. 2011) und an der Apoptoseregulation (Sato et al. 1995) beteiligt. Auch spielen sie womöglich bei der Entstehung diverser Krankheiten wie verschiedenen Diabetesformen (Hotta et al. 1998) oder Entzündungserkrankungen (Hoshino et al. 2003), bei HIV- (Human Immunodeficiency Virus) und HTLV-Infektionen (Human T-cell Leukemia Virus) (Masutani et al. 2005) eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit und ihrer deutlichen Einflussnahme auf die Zellphysiologie werden Thio- und Glutaredoxine interessante Forschungsobjekte der kommenden Jahre bleiben.

2.4 Proteinbiosynthese, Qualitätskontrolle, Glykosylierung und ERAD

Wie alle Proteine des Menschen, mit Ausnahme mancher mitochondrialer Proteine, ist die Information für TXNDC15 in der genomischen DNA verankert. Von der DNA wird im Vorgang, den man Transkription nennt, eine prä-mRNA des Genes abgelesen, die durch ein Splicisom in reife mRNA prozessiert wird. In diesem Prozess werden der mRNA die Introns entfernt, welche zwischen den codierenden Exons liegen. Durch alternatives Splicing und das daraus resultierende nutzen verschiedener Exons, können auf diesen Weg mehrere verschiedene Transkripte entstehen. Die reife mRNA besteht jetzt aus einer 3' und 5' untranslatierten Region (UTR) sowie der kodierenden Sequenz. Der kodierende Bereich enthält die Information der Aminosäureabfolge für das Protein, wo hingegen die UTR wichtig für die Regulation der Translation ist. Reife mRNA verlässt nun den Zellkern und bindet im Zytosol an Ribosomen, welche daraufhin mit der Translation beginnen. Im Falle vieler Transmembranproteine muss jedoch frühzeitig eine Integration des zu synthetisierenden Proteins in die Membran gewährleistet werden. Für TXNDC15 und viele weitere Proteine wird dies über eine N-terminale Signalsequenz erreicht. Diese aus Aminosäuren bestehende Signalsequenz wird durch ein „Signal Recognition

Particle“ (SRP) erkannt (Akopian et al. 2013). Die Bindung des SRP verlangsamt die Synthese des neuen Proteins und das SRP bindet seinerseits den Komplex an einen membranständigen Rezeptor (SRP-Rezeptor) des Endoplasmatischen Reticulums (ER) (Lakkaraju et al. 2008). Der SRP-Rezeptor vermittelt eine Interaktion des Ribosoms mit dem proteinleitenden Sec61-Komplex (Translokon), der es ermöglicht, das Protein über die ER-Membran hinweg ins ER zu transportieren (Akopian et al. 2013). Das Signalpeptid wird während dieses Vorganges von einer Signalpeptidpeptidase im Lumen des ER abgespalten (Shao & Hegde 2011). Beinhaltet das Protein eine Transmembrandomäne, wird es bis zu dieser Transmembrandomäne ins ER transloziert. Die hydrophobe Transmembrandomäne Länge wird seitlich aus der Pore des Translokons in die Membran entlassen (Shao & Hegde 2011). Das Ribosom produziert den C-terminalen Rest des Proteins ins Zytosol. Somit entsteht ein reifes Typ-1 Transmembranprotein mit N-Terminus im ER-Lumen und zytosolischem C-Terminus (**Abb. 2.4 (A)**). Proteine mit Signalpeptid, aber ohne Transmembrandomäne werden als lösliche Proteine im ER-Lumen produziert. Reife luminal Proteine oder Transmembranproteine können im ER verbleiben oder das ER über COPII positive Vesikel in Richtung Golgi verlassen (**Abb. 2.4 (B)**). Die Voraussetzung für das Verlassen von Proteinen aus dem ER ist die korrekte Faltung der Proteine. Um dies sicherzustellen, benötigen Zellen Mechanismen zur Detektion und notfalls zur Degradation von fehlgefalteten Proteinen. Zum Einen handelt es sich hierbei um die im ER-befindlichen Chaperone und den zytosolischen Proteasomkomplex, der ein zentrales Element des ERAD (ER Assoziierte Degradation) darstellt. Proteine, die im ER hergestellt werden, durchlaufen eine Qualitätskontrolle, an der diverse Chaperone, glykosylierende und deglykosylierende Proteine sowie Thioredoxine beteiligt sind (Stevenson et al. 2016). Chaperone wie z.B. GRP78 erkennen exponierte hydrophobe Bereiche im hydrophilen ER-Lumen und helfen diesen Proteinen, ihre native Struktur einzunehmen (Stevenson et al. 2016). Die Hrd1 E3 Ligase erkennt hydrophile Bereiche innerhalb der hydrophoben Umgebung der ER-Membran bei fehlgefalteten Proteinen (Stevenson et al. 2016). Nehmen die Proteine nicht die vorgesehene Konformation ein, werden sie dem ERAD zugeführt.

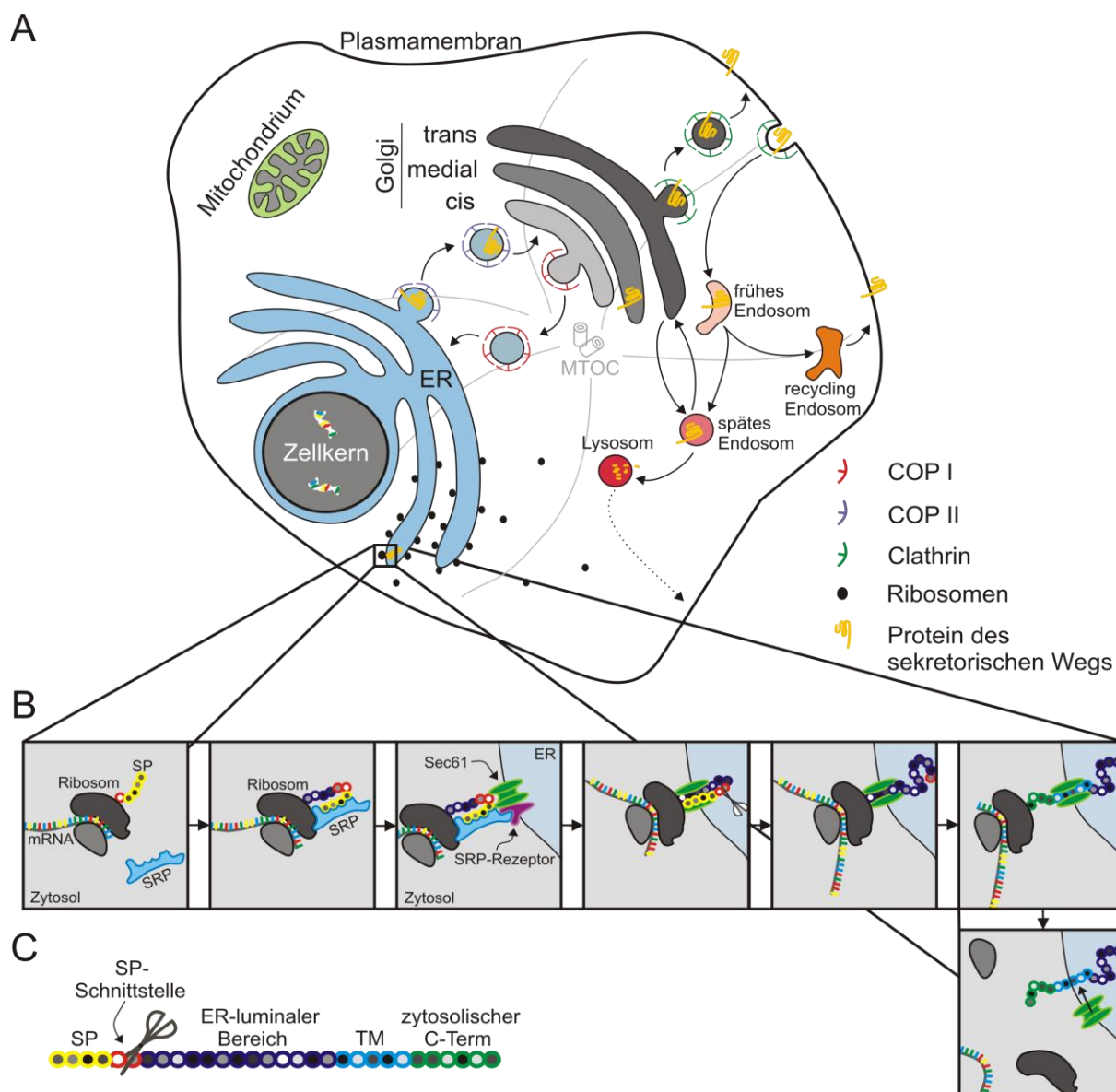


Abbildung 2.4: Schematisch vereinfachter Lebenszyklus eines Typ1-Transmembranproteins des sekretorischen Wegs.

(A) beschreibt den Weg, den ein am ER synthetisiertes Protein nehmen kann. Dieses kann nach der Synthese, das ER über COPII positive Vesikel in Richtung Golgi verlassen. Mittels COPI positiver Vesikel können fehlgeleitete oder fehlgefaltete Proteine zum ER zurücktransportiert werden. Vom Golgi können Proteine in die anderen Organellen oder zur Plasmamembran weitergeleitet werden. Proteine, die ihre Aktivität verloren haben, können in die Lysosomen zur Degradation transportiert werden. (B) zeigt den Ablauf der Synthese eines Typ1-Transmembranproteins. SP = Signalpeptid, SRP = Signal recognition particle, ER = Endoplasmatisches Reticulum, TM = Transmembrandomäne. (C) zeigt den schematischen Aufbau eines Typ1-Transmembranproteins wie z.B. den von TXNDC15.

N-Glykosylierungen spielen bei der Reifung von Proteinen und der Regulation der Qualitätskontrolle des ER eine wichtige Rolle. Proteine werden während des Importprozesses über das Translokon bereits im ER-Lumen N-glykosyliert (Ruiz-Canada et al. 2009). Dem entstehenden Protein werden dabei auf das Asparagin in der Sequenz N-X-S/T (Asparagin = N, X = jede Aminosäure außer Prolin, S/T = Serin oder Threonin) ein Polysaccharid übertragen. Dieses besteht aus zwei N-Acetylglucosaminen, neun Mannosen und drei Glucosen (Ruiz-Canada et al. 2009)

(Abb. 2.5 (A)). Die darauffolgende Trimmung der Glucosen des Polysaccharides dient als Informationsträger der Qualitätskontrolle des ER. Hierbei ermöglicht das Trimmen der ersten Glucose die Bindung an das Chaperon Malectin. Die Trimmung der zweiten Glucose macht eine Bindung an die Lektin-Chaperone Calreticulin und Calnexin möglich, wobei die Trimmung der letzten Glucose zu einer Dissoziation der Proteine von den Lektin-Chaperonen führt (Tannous et al. 2015). Calreticulin und Calnexin interagieren auch mit PDI's, um eine korrekte Disulfidbrückenbildung der eventuell fehlgefalteten Proteine zu gewährleisten (Oliver et al. 1999). Werden zu einem späteren Zeitpunkt fehlgefaltete Proteine erkannt, kann eine erneute Interaktion des Proteins mit Calreticulin und Calnexin ermöglicht werden. Hierfür überträgt die Glucosyltransferase 1 erneut eine Glucose auf das Polysaccharid des fehlgefalteten Proteins (Tannous et al. 2015). Ein Protein das als terminal fehlgefaltet identifiziert wurde, wird durch das Abspalten multipler Mannosen des Polysaccharides als solches gekennzeichnet und von Ubiquitinligasen polyubiquitiniert, um es dem ERAD zuzuführen (Benyair et al. 2015). Fehlgefaltete luminaire und membrangebundene Proteine müssen, bevor sie dem Proteasom zugeführt werden können, ins Zytosol transloziert werden (Benyair et al. 2015). Falten die im ER synthetisierten Proteine jedoch richtig, können sie entweder im ER-retiniert werden oder das ER in Richtung Golgi verlassen. Proteine, die für den Verbleib im ER vorgesehen sind, tragen oftmals ER-Retentionsmotive wie z.B. KDEL-, KKXX-, oder RXR-Motive (Raykhel et al. 2007; Barlowe & Helenius 2016). Proteine, die das ER verlassen sollen, tragen oftmals ER-Exportmotive (Nufer et al. 2002; Sato & Nakano 2007) oder Lokalisationsmotive für andere Organellen (z.B. für Lysosomen). Proteine, die den Golgi erreichen, können hier weiter modifiziert werden. Dazu wird im Golgi dem im ER angefügten N-Glykan diverse Mannosen entfernt und das N-Glykan im Anschluss durch das Anheften von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) sowie von Galactose, Fucose oder Sialinsäure weiter modifiziert (Freeze & Kranz 2010). Auch kann im Golgi eine O-Glykosylierung durch die Übertragungen eines N-Acetylgalactosamin (GalNAc) auf einen Serin- oder Threoninrest des Proteins erfolgen (Gill et al. 2011) **(Abb. 2.5 (B))**. Bereits ab diesem Punkt kann das O-Glykan durch das Anfügen von Galactose, GlcNAc, Mannose, Fucose, Glucose oder Xylose verändert werden, was eine enorme Variabilität der O-Glykosylierung zulässt (Gill et al. 2011).

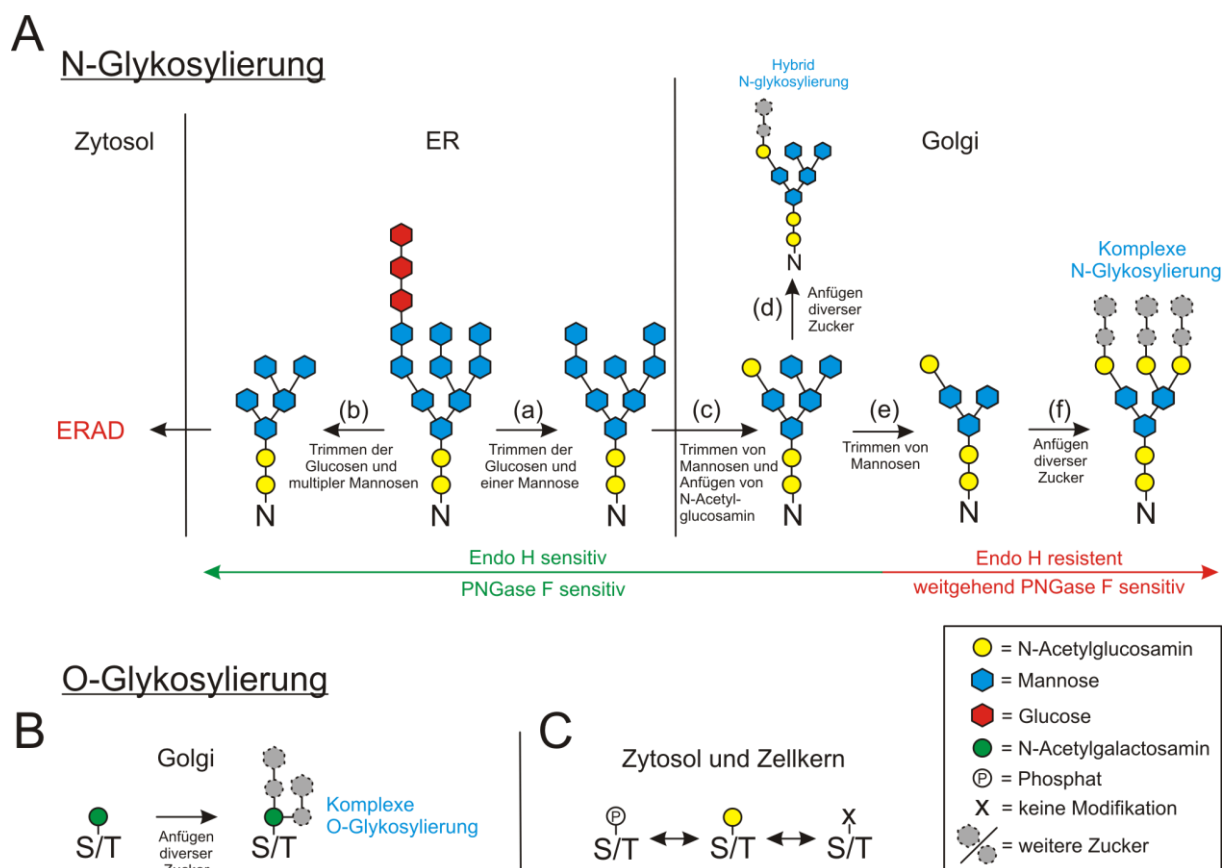


Abbildung 2.5: Vereinfachte Darstellung der N- und O-Glykosylierung von Proteinen. (A) zeigt vereinfacht den Ablauf der N-Glykosylierung und ihre Beteiligung als Signalmolekül im ER. (a) stellt den Übergang des Vorläufer N-Glykans dar, das auf alle N-glykosylierten Proteine übertragen wird. Das sequentielle Trimmen der Glucosen vermittelt Interaktionen mit verschiedenen ER-residenten Chaperonen, um eine korrekte Reifung der Proteine zu gewährleisten. (b) Werden von N-Glykanen bereits im ER multiple Mannosen entfernt, so ist dies ein Signal für ERAD-Proteine, dass es sich hierbei um terminal fehlgefaltete Proteine handelt. Terminal fehlgefaltete Proteine werden aus dem ER ins Zytosol transportiert und dort durch das Proteasom degradiert. (c) Mannosereiche N-Glykane können im Golgi durch das Trimmen multipler Mannosen und der im Anschluss stattfindenden Addition von N-Acetylglucosamin weiter modifiziert werden. Zu diesem Zeitpunkt können N-Glykane des Hybridtyps bereits mit weiteren Zuckern verändert werden (d) oder durch das Trimmen zweier weiterer Mannosen für die komplexe N-Glykosylierung vorbereitet werden (e). Das Trimmen der zwei Mannosen vermittelt zudem eine Resistenz des Glykans gegen die Endoglycosidase H (Endo H). Eine Sensitivität gegen die Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) bleibt dennoch bestehen. (f) Für die komplexe N-Glykosylierung werden dann weitere N-Acetylglucosamine auf das N-Glykan übertragen und dieses im Anschluss mit weiteren Zuckern modifiziert. (B) zeigt die O-Glykosylierung von Proteinen im Golgi, die durch die Übertragung eines N-Acetylgalactosamin auf ein Serin oder Threonin initiiert wird. Das N-Acetylgalactosamin kann bereits ab diesem Zeitpunkt mit diversen Zuckern stark modifiziert werden. So kann eine Vielzahl an verschiedenen O-Glykanen entstehen. (C) veranschaulicht die im Zellkern und Zytosol reversible O-Glykosylierung von Proteinen mit einem einzelnen N-Acetylglucosamin. Diese Form der O-Glykosylierung findet oft auch an Serin oder Threonin im Wechsel mit Phosphorylierungen statt.

O-Glykosylierungen können auch im Zellkern und Zytosol stattfinden, jedoch wird hier ein einzelnes GlcNAc reversibel auf Serin- oder Threoninreste übertragen ((Abb. 2.5 (C)). Dies spielt eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Proteine (Zeidan & Hart 2010). Nach der Reifung der Proteine im Golgi werden diese an ihr vorgesehenes Kompartiment weitergeleitet. Der Golgi stellt zudem ein Kompartiment dar, in dem Proteine, die ihre native Form nicht erreicht haben, retrograd ins ER transportiert werden könnten (Benyair et al. 2015).

Über die Lokalisation und die Funktion von TXNDC15 ist bisher wenig bekannt und das Wenige basiert auf bioinformatischen Analysen (siehe **Kapitel 2.2**). Aus diesem Grund befasst sich ein großer Teil der Arbeit mit der Reifung und der Lokalisation von TXNDC15. Erst wenn diese Fragestellungen geklärt sind, kann gezielt nach der Funktion von TXNDC15 in Organismen gesucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Klonierungen

Zum Amplifizieren, Mutieren oder Deletieren bestimmter Bereiche in DNA-Sequenzen wurde die PCR-Reaktion genutzt. Die Bedingungen wurden für die jeweilige PCR optimiert. Auch die „quick change PCR“ (QC-PCR) zum Mutieren weniger Basenpaare innerhalb einer Sequenz verlief wie folgt:

- 1) Initiales Denaturieren: 98 °C für 1 - 3 Minuten (je nach Template)
- 2) Denaturieren: für 98 °C für 15 - 30 Sekunden
- 3) Annealing der Primer: 56 - 64 °C für 15 Sekunden bis 1 Minute (an Primerpaar angepasst)
- 4) Elongationsschritt der Polymerase: 72 °C, die Zeit wurde der Länge des zu erwarteten Produkts angepasst
- 5) Finaler Elongationsschritt: 72 °C für 5 - 10 Minuten
- 6) Abkühlen der Reaktion: 4 °C für 1 Minute

Die Schritte # 2 – 4 wurden während der PCR für 28 bis 36 Zyklen wiederholt.

Sogenannte „Two-step-PCR“-Programme wurden verwendet um Mittels der Primer z.B. Schnittstellen oder Tag-Sequenzen in die DNA zu integrieren.

- 1) 98 °C für 1 - 3 Minuten (je nach Template-DNA)
- 2) 98 °C für 15 - 30 Sekunden
- 3) 56 °C für 1 Minute
- 4) 72 °C , die Zeit wurde der Länge des zu erwarteten Produkts angepasst
- 5) 98 °C für 15 - 30 Sekunden
- 6) 64 °C für 1 Minute
- 7) 72 °C, die Zeit wurde der Länge des zu erwarteten Produkts angepasst
- 8) Finaler Elongationsschritt: 72 °C für 5 - 10 Minuten
- 9) Abkühlen der Reaktion: 4 °C für 1 Minute

Die Schritte # 2 – 4 wurden während der PCR für 6 Zyklen wiederholt, bevor die Schritte # 5 – 7 für die restlichen 28 Zyklen wiederholt wurden.

PCR-Ansätze:

~20-50 ng DNA	x µL
Primer For.	1,1 µL
Primer Rev.	1,1 µL
Nucleotide (dNTP's)	1,1 µL (je 10 mM: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
HF oder GC-Puffer (5x)	10 µL (GC-Puffer bei Bedarf)
DMSO	1,5 µL (bei Verwendung von GC-Puffer)
Phusion Polymerase	0,5 -1 µL

	Ad 50 µL mit Aqua Dest.

Primer wurden in einer Stockkonzentration von 10 pmol/ µL angesetzt. Für eine PCR wurden 1,1 µL der jeweiligen Stocklösung der Primer eingesetzt. Die in der Arbeit verwendeten Primer sind über die Eurofins GmbH (Hamburg, DEU) bestellt und sind der **Tabelle 3.1** zu entnehmen.

PCR-Reaktion zur Amplifikation von DNA wurden nach der PCR-Reaktion entweder mit Hilfe des PCR Nucleotide Removal Kit direkt aufgereinigt oder über ein GTQ-Agarosegel aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wurde im Anschluss aus dem Gel isoliert. (Siehe **Kapitel 3.2**)

QC-PCR- oder Two-Step-PCR-Reaktionen wurden nach dem Beenden des Programms einem DpnI-Verdau unterzogen um die Template-DNA zu eliminieren, wenn sich das zu erwartende Produkt nicht merklich in der Größe vom dem eingesetzten DNA-Template unterschied. Wiesen Template-DNA und Produkt jedoch starke Größenunterschiede auf, wurde auf ein DpnI-Verdau verzichtet und der PCR-Ansatz direkt über ein GTQ-Agarosegel aufgetrennt. Auch DpnI-verdaute Ansätze wurden im Anschluss über ein GTQ-Agarosegel aufgereinigt. Die Aufreinigung und DNA-Isolation aus Gel ist in **Kapitel 3.2** beschrieben.

DpnI-Verdau:

PCR-Ansatz	50 µL
DpnI	1 µL

Die Ansätze wurden 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 3.1: Zusammenfassende Klonierungs-Primerliste: Aufgelistet ist der Kurzname und die Sequenz jedes Primers, sowie eine sehr kurze Beschreibung. **(P):** Primer tragen eine 5' Phosphatgruppe, **Kozak:** Primer kodiert eine Kozak-Sequenz, **Start:** Primer kodiert für ein Start-Methionin (ATG), **Stopp:** Primer kodiert ein Stopp (TAG), **For.:** Vorwärtsprimer, **Rev.:** Rückwärtsprimer, **SP:** Signalpeptid, **TM:** Transmembranbereich, **NT:** Nucleotid

Kurzname	Sequenz von 5' nach 3'	Beschreibung
BAN930	(P) 5' GCCGCCACCATGGTCCCGGCTGCCGG 3'	TXNDC15 Start mit Kozak
BAN931	(P) 5' CTACTCCACATGTTCTGCT 3'	TXNDC15 mit Stopp
BAN932	(P) 5' CTCCACATGTTCTGCTCT 3'	TXNDC15 ohne Stopp
BAN934	(P) 5' CGCCGATTGCCTCTCGG 3'	TXNDC15 vor Start-ATG
BAN1006	5' GTGGGCTAGCCTACTCCACATGTTCTGCT 3'	TXNDC15 mit Stop und NheI
BAN1031	5' GCCGAATTCGCCACCATGGTCCCGGCTGCCGG 3'	TXNDC15 For. mit EcoRI und Kozak
BAN1054	5' AGGGCGCGCCTACTCCACATGTTCTGCT 3'	TXNDC15 Rev. mit BssHII
BAN1055	5' GATCCGCGTCGACATCGAAGCCGTTCTGCGACCGG 3'	DNA-Oligo für BamHI/BssH1 geschnittenen Vektor
BAN1056	5' CGCGCCGGTCCACGAACGGCTTCGATGTCGACGCG 3'	DNA-Oligo für BamHI/BssH1 geschnittenen Vektor
BAN1099	5' GAACCCAAACGGTAGTGACAGTACTCTAGTCTGTTTTACACC 3'	QC primer For. TXNDC15 C210S
BAN1100	5' GGTGTAAACAGGACTAGAGTACTGTCACTACCGTTTGGGTTT 3'	QC primer Rev. TXNDC15 C210S
BAN1101	5' GCCTAGCGGCGTCACCACTGGTGCTGGAGGAGCG 3'	QC primer For. TXNDC15 C114S
BAN1102	5' CGCTCCTCCAGCACCCTGGTGACGCCGCTAGGC 3'	QC primer Rev. TXNDC15 C114S
BAN1105	5' GGGCCGCGGCATGGTGAGCAAGGGCGAG 3'	mCherry For. mit SacII
BAN1106	5' CTGCCGCGGCCCTTGTACAGCTCGTCCAT 3'	EGFP/mCherry Rev. mit Stopp, mit SacII.
BAN1109	5' CCTGTTTTACACCCCGTGGAGCCGCTTTTCTGCCAGTTTG 3'	QC primer For. TXNDC15 C220S
BAN1110	5' CAACTGGCAGAAAAGCGGCTCCACGGGGTGTAACAGG 3'	QC primer Rev. TXNDC15 C220S
BAN1111	(P) 5' GTACCGGATTACGCCGTGGAGGTTGCAGAGGAA 3'	Fügt halben HA tag an TXNDC15 nach NT: C96 an. For.
BAN1112	(P) 5' GTCATATGGGTAGCCGCGGACGGGAAGT 3'	Fügt halben HA tag an TXNDC15 nach NT: C96 an. Rev.
BAN1139	(P) 5' GATATCTAATCGAGCTCGATGAGTTTG 3'	pMax nach GFP mit EcoRV und Stopp. For.
BAN1140	(P) 5' GGCCCTCTCCAGCAC 3'	TXNDC15 For. vor der TM
BAN1154	(P) 5' ACCACTTCTCTGCAACCTC 3'	TXNDC15 Rev. nach dem SP
BAN1158	5' GAGGAGTATTACAGAGCC 3'	TXNDC15 For. (interner Sequenzierprimer)

Tabelle 3.1 fortgesetzt:

Kurzname	Sequenz von 5' nach 3'	Beschreibung
BAN1159	5' GGCTCTGTGTAATACTCCTC 3'	TXNDC15 Rev. (interner Sequenzierprimer)
BAN1160	5' GCCTTCGAAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'	EGFP For. mit BstB1
BAN1161	5' TGGAAAAACGCCAGCAAC 3'	pMax Rev. nach Mfe1-Schnittstelle
BAN1162	5' GCCTTCGAAGCTAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'	EGFP For. mit Stopp und BstB1
BAN1167	5' GTTTTATTATGTATGCTACCATTTAGACTGAGAGTATTCGGTGGC 3'	QC primer For. fügt ein Stopp in die native BstBI-Schnittstelle ein
BAN1168	5' GCCACCGAATACTCTCAGTCTAAATGGTAGCATACATAATAAAA 3'	QC primer Rev. fügt ein Stopp in die native BstBI-Schnittstelle ein
BAN1186	5' AGAGCAGGAACATGTGGAGTAGGCCACCATGGTGAGCAAG 3'	QC primer For. TXNDC15 fügt Stopp vor GFP ein
BAN1187	5' CTTGCTCACCATGGTGGCCTACTCCACATGTTCTGCTCT 3'	QC primer Rev. TXNDC15 fügt ein Stopp vor GFP ein
BAN1223	5' GGTCACGAACGGCTTCGATGTCGACGC 3'	DNA-Oligo für PstI/XhoI geschnittenen Vektor
BAN1224	5' TCGAGCGTCGACATCGAAGCCGTTCTGTTGACCTGCA 3'	DNA-Oligo für PstI/XhoI geschnittenen Vektor
BAN1229	5' CTCCACAGGGGTACCATCGTAGAATTCAAGCTTCTAGAGATCTG 3'	QC primer For. um vorzeitiges ATG in „pMax IRES GFP Leervektor“ zu entfernen
BAN1230	5' CAGATCTCTAGAAGCTTGAATTCTACGATGGTACCCCTGTGGAG 3'	QC primer Rev. um vorzeitiges ATG in „pMax IRES GFP Leervektor“ zu entfernen
BAN1231	5' CTCCACAGGGGTACCATCGTAGAATTCCGCCACCATGGTC 3'	QC primer For. um vorzeitiges ATG in „pMax HA-TXNDC15“ zu entfernen
BAN1232	5' GACCATGGTGGCGGAATTCTACGATGGTACCCCTGTGGAG 3'	QC primer Rev. um vorzeitiges ATG in „pMax HA-TXNDC15“ zu entfernen
BAN1233	(P) 5' GAGGAAAGTGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'	QC primer For. „pMax mCherry-TXNDC15“ um native SP-Schnittstelle wiederherzustellen
BAN1234	(P) 5' TGCAACCTCCACGCCGCGGACGGGAAGTC 3'	QC primer Rev. „pMax mCherry-TXNDC15“ um native SP-Schnittstelle wiederherzustellen
BAN1244	5' GACCGGCAGCCGGGACCATGTTGCGGCCGCCAGTGT 3'	QC primer Rev. „pcDNA3 HA-TXNDC15“ um Start-Met. Wiederherzustellen
BAN1245	5' AACTGGCGGCCGCAACATGGTCCCGGCTGCCGGTC 3'	QC primer For. „pcDNA3 HA-TXNDC15“ um Start-Met. Wiederherzustellen

Restriktionsverdau wurden nach den für die Enzyme empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Alle Restriktionsenzyme die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von NEB (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA) bezogen. Wenn möglich wurde von jedem Enzym die NEB „High Fidelity“ (HF) variante und der „Cut Smart Puffer“ bevorzugt. Die **Tab. 3.2** listet die in dieser Arbeit zum Klonieren verwendeten Enzyme auf. Restriktionsverdau wurden, wenn möglich, auch als Doppelverdau angesetzt. Nach dem Verdau wurden Ansätze mittels dem passenden Kit (**Tab. 3.3**) von den Enzymen und kleineren DNA-Fragmenten befreit. Mussten größer Fragmente entfernt werden, wurde der Ansatz über ein GTQ-Agarosegel aufgetrennt, die passende Bande ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion Kit nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die Ausgangsplasmide für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte sind der **Tab. 3.4** zu entnehmen. Die fertigen Konstrukte sind in der **Abbildung 3.1** zusammengefasst.

Restriktionsverdau:

Insert oder Vektor	x µL
Puffer (10x)	2 µL (je nach Enzym gewählt)
Enzym 1	1 µL
Enzym 2	1 µL (bei Bedarf)

	Ad 20 µL mit Aqua Dest.

Die Ansätze wurden 1-2 Stunden bei entsprechender Temperatur inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung der Enzyme wurde angeschlossen falls eine Dephosphorylieren des Vektors notwendig war. Dadurch kann eine Religation des Vektors, falls er mit sich selbst kompatible Enden beinhaltet, verhindert werden.

Dephosphorylierung eines Vektors:

Vektor	20 µL (nach Restriktionsverdau)
Puffer (10x)	3 µL
Antarctic Phosphatase	0,5 µL

	Ad 30 µL mit Aqua Dest.

Der Ansatz wurde 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Ligation:

Insert	x µL
Vektor	x µL
PEG4000	2 µL (bei Bedarf)
Ligase Puffer (10x)	2 µL
T4-Ligase	1 µL

	Ad 20 µL mit Aqua Dest.

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei RT oder für bis zu 18 Stunden bei 16 °C inkubiert.

Tabelle 3.2: In der Arbeit zum Klonieren verwendeten Restriktionsenzyme, Polymerase und Ligase. Enzym: bezeichnet den Namen des entsprechenden Enzyms; Puffer und Temperatur: der für das entsprechende Enzym verwendete Puffer und die verwendete Inkubationstemperatur. Angegeben sind zusätzlich der Hersteller und die Bestellnummer. * = Nur für analytische Cuts verwendet, da TXNDC15 eine endogene EcoNI-Schnittstelle hat

Enzym	Puffer	Temperatur	Hersteller ; Bestellnummer
Antarctic Phosphatase	Antarctic Phosphatase Puffer	37 °C	NEB ; M0289
BamH I	NEBuffer 3.1 / Cut Smart	37 °C	NEB ; R0136
BamH I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3136
Bgl II	NEBuffer 3.1	37 °C	NEB ; R0144
BssH II	Cut Smart	50 °C	NEB ; R0199
BstB I	Cut Smart	65 °C	NEB ; R0519
Dpn I	Cut Smart / PCR Puffer	37 °C	NEB ; R0176
EcoN I *	Cut Smart	37 °C	NEB ; R0521
EcoR I	NEBuffer EcoRI	37 °C	NEB ; R0101
EcoR I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3101
EcoR V	NEBuffer 3.1	37 °C	NEB ; R0195
EcoR V HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3195
Kpn I	NEBuffer 1.1	37 °C	NEB ; R0142
Kpn I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3142
Mfe I	Cut Smart	37 °C	NEB ; R0589
Mfe I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3589
Nhe I	NEBuffer 2.1	37 °C	NEB ; R0131
Nhe I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3131
Not I	NEBuffer 3.1	37 °C	NEB ; R0189
Not I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3189
Phusion DNA Polymerase	HF- / GC-Puffer	PCR	ThermoFischer Scientific ; F530L
Pst I	NEBuffer 3.1	37 °C	NEB ; R0140
Pst I HF	Cut Smart	37 °C	NEB ; R3140
Sac II	Cut Smart	37 °C	NEB ; R0157
T4-DNA Ligase Kit	Ligase Puffer	RT	ThermoFischer Scientific ; EL0012
Xho I	Cut Smart	37 °C	NEB ; R0146

Tabelle 3.3 Verwendete DNA-Isolierungskits. Neben dem Namen, dem Hersteller und der Bestellnummer ist eine kurze Beschreibung des Verwendungszweckes für jedes Kit angegeben.

Kit	Verwendungszweck	Hersteller ; Bestellnummer
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	QIAGEN ; 28304
QIAquick Gel Extraction Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten oder Vektoren nach Agarose-Gelextraktion	QIAGEN ; 28706

Tabelle 3.4 Zur Klonierung verwendete Ausgangsplasmide. Die in der Arbeit klonierten Konstrukte basieren auf den folgenden Plasmiden. Angegeben sind der Originalvektor und die Person die das Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Plasmide	Hersteller / Bereitgestellt durch
pCAGGS	Originalvektor von (Hitoshi et al. 1991) zur Verfügung gestellt durch Herrn Dr. Stephan Philip (Universität d. Saarlandes; Pharmakologie und Toxikologie)
pMax GFP	Originalvektor von Lonza modifiziert durch Herrn Dr. Ulrich Wissenbach und Frau Dr. Dalia Alansary (Universität d. Saarlandes)
pMax Syb2wt	Zur Verfügung gestellt von Hawraa Bzeih aus dem Labor von Herrn Prof. Dr. Jens Rettig (Universität d. Saarlandes; Zelluläre Neurophysiologie)
IRES GFP	
pcDNA3	Originalvektor von Invitrogen

Erzeugung von DNA-Oligos zur Ligation mit geschnittenen Vektoren

Zwei Primer aus denen ein DNA-Linker erzeugt werden sollte, wurden zuerst in einer Konzentration von 400 pmol angesetzt. Sie wurden im folgenden 1 zu 1 vermischt und für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt. Es wurde dann für 1 Stunde im Thermocycler langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Dies wurde dadurch erreicht, dass der Thermocycler nach dem 5 minütigen Kochen ausgeschaltet wurde. Danach wurde das Gemisch 1:500 in Wasser verdünnt und 0,5 – 2 µL in einer Ligation (20 µL Gesamtvolumen) mit einem Vektor verwendet.

pMax TXNDC15-GFP

Die initiale Klonierung von TXNDC15 erfolgte aus Jurkat E6-1 cDNA mit dem Vorwärtsprimer BAN930 und dem Rückwärtsprimer BAN932. Das PCR-Produkt wurde in den mit EcoRV geschnittenen „pMax GFP“-Vektor ligiert. Für das „delta kat. Domäne“-Konstrukt wurde in dem „pMax TXNDC15-GFP“-Konstrukt mit Hilfe einer Deletions-PCR und den Primern BAN1140 und BAN1154 der Bereich zwischen Arginin 40 und Glycin 312 deletiert.

pMax TXNDC15 IRES Konstrukte

TXNDC15 wurde aus dem „pMax GFP“-Vektor mit den Primern BAN931 und BAN1006 reamplifiziert und das PCR-Produkt mit NheI geschnitten. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den mit NheI und EcoRV geschnittenen „pCAGGS IRES RFP“-Vektor ligiert. Da der „IRES RFP“-Vektor für Mikroskopie-Anwendungen dieser Arbeit nicht optimal geeignet war, wurde die „IRES RFP“-Kassette durch eine „IRES GFP“-Kassette getauscht. „IRES RFP“ wurde über NheI und NotI ausgeschnitten und durch die mit Hilfe von NheI und BglII ausgeschnittene „IRES GFP“-Kassette (aus „pCAGGS IRES GFP“) ersetzt. Aufgrund der Größe des „pCAGGS TXNDC15 IRES GFP“-Konstrukts wurde dies in ein kleineres „pMax IRES GFP“-Konstrukt umklont. Hierfür wurde aus dem „pMax-Syp2wt IRES GFP“-Vektor, der von der AG-Rettig (CIPMM; Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt wurde, das SYP2wt mit EcoRI & BssHII ausgeschnitten. Parallel wurde TXNDC15 mit den Primern BAN1031 und BAN1054 reamplifiziert und das PCR-

Produkt mit EcoRI und BssHII geschnitten. PCR-Produkt und Vektor wurden anschließend ligiert um den Vektor „pMax TXNDC15 IRES GFP“ zu erhalten.

pMax IRES GFP Leervektor

Zur Erzeugung des „pMax IRES GFP“-Leervektors wurde aus dem „pMax Syp2wt IRES GFP“ mittels BssHII & BamHI das Syp2wt ausgeschnitten und der Vektor aus einem BAN1056 und BAN1055 erzeugtem DNA-Linker wieder geschlossen. Um ein vorzeitiges Start-Methionin aus einem der Leserahmen des Leervektors zu entfernen wurde eine PCR mit den Primern BAN1229 und BAN1230 durchgeführt.

pMax SP-mCherry-TXNDC15 Konstrukte

Hierfür wurde zuerst mCherry aus dem „pIRES mCherry-STIM2“-Vektor (Miederer et al. 2015) mit den Primer BAN1105 und dem Primer BAN1106 amplifiziert und über SacII in "pMax TXNDC15-GFP" kloniert (TXNDC15 enthält eine endogene SacII-Schnittstelle nach dem Signalpeptid). Nach erfolgreicher Ligation von mCherry und „pMax TXNDC15-GFP“ wurde über eine Deletions-PCR mit den Primern BAN931 und BAN1139 das GFP deletiert. Das doppelt getaggte „pMax SP-mCherry-TXNDC15-GFP“-Konstrukt wurde als Template für weitere Klonierungen bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Deletion der C-terminalen Domäne in „pMax SP-mCherry-TXNDC15“ wurde das doppelt getaggte „SP-mCherry-TXNDC15-GFP“-Konstrukt mit BstBI und MfeI geschnitten. TXNDC15 enthält nach der Transmembrandomäne eine endogene BstBI-Schnittstelle und MfeI schneidet nach dem GFP im Vektor. Parallel wurde eine PCR mit den Primern BAN1162 und BAN1161 angesetzt, welches den Bereich nach dem C-Term (GFP + Vektor) amplifiziert, dieses PCR-Produkt wurde mit MfeI und BstBI geschnitten und anschließend in den Vektor ligiert. So entstand ein „pMax SP-mCherry-TXNDC15-delta C-Term“-Konstrukt. Der Primer BAN1062 fügte ein Stopcodon vor dem im Vektor erhaltenen GFP ein.

Die native Signalpeptidase-Schnittstelle in „pMax SP-mCherry-TXNDC15“ wurde wieder hergestellt, um potentielle Effekte durch Störung der Signalpeptidase-

Erkennungssequenz zu verhindern. Dies wurde über eine „Two-Step-PCR“ mit den Primern (AN1234 und BAN1233) gewährleistet. Diese stellen die Aminosäuresequenz „VEVAEESG“ nach dem Signalpeptid und vor mCherry wieder her.

pMax TXNDC15-GFP und TXNDC15 IRES GFP Cystein-Mutanten

Die Cystein-Mutanten wurden sowohl in „pMax TXNDC15-GFP“ als auch „pMax TXNDC15 IRES GFP“ erzeugt. Die C220S-Mutanten wurden in einer QC-PCR mit den Primern BAN1109 und BAN1110 erzeugt. Für die Doppel-Cystein-Mutanten C114S und C210S wurden zwei aufeinanderfolgende QC-PCR durchgeführt. Die erste mit dem Primerpaar BAN1099 und BAN1100 um das Cystein 210 zu Serin zu mutieren und die zweite PCR mit den Primern BAN1101 und BAN1102 um das Cystein 114 zu Serin zu mutieren.

pMax / pCDNA3 HA-TXNDC15 Konstrukte

Dem „pMax TXNDC15 IRES GFP“-Konstrukt wurde mittels Primerpaar BAN1111 und BAN1112 über eine „Two-Step-PCR“ ein HA Tag nach der Aminosäure 33 eingefügt. Zur Deletion des „IRES GFP“ in „pMax HA-TXNDC15 IRES GFP“ für Kollokalisationsstudien wurde dieses mit Hilfe von XhoI und PstI ausgeschnitten. Über einen aus BAN1223 und BAN1224 erzeugten DNA-Linker wurde der „pMax HA-TXNDC15“-Vektor durch Ligation mit dem Linker geschlossen. Für die Umklonierung von HA-TXNDC15 in den pcDNA3 Vektor wurde sowohl der „pcDNA3“-Leervektor und der „pMax HA-TXNDC15“-Vektor mit EcoRI und XhoI geschnitten und die gewünschten Fragmente miteinander ligiert.

pMax IRES GFP Konstrukte und Abkömmlinge

In den „pMax TXNDC15 IRES GFP“, „pMax HA-TXNDC15 IRES GFP“ und „pMax HA-TXNDC15“ wurde ein vorzeitiges Start-Codon, welches zusätzlich 5 Aminosäuren an das Signalpeptid von TXNDC15 addierte, mit Hilfe der Primer BAN1231 und BAN1232 entfernt. Dies erfolgte erst nachdem die Calcium-

Imagingdaten generiert wurden. Lokalisations- und Glykosylierungsstudien wurden erst nach dem Entfernen des frühzeitigen Start-Methionin durchgeführt.

pcDNA3 HA-TXNDC15 mit Linker

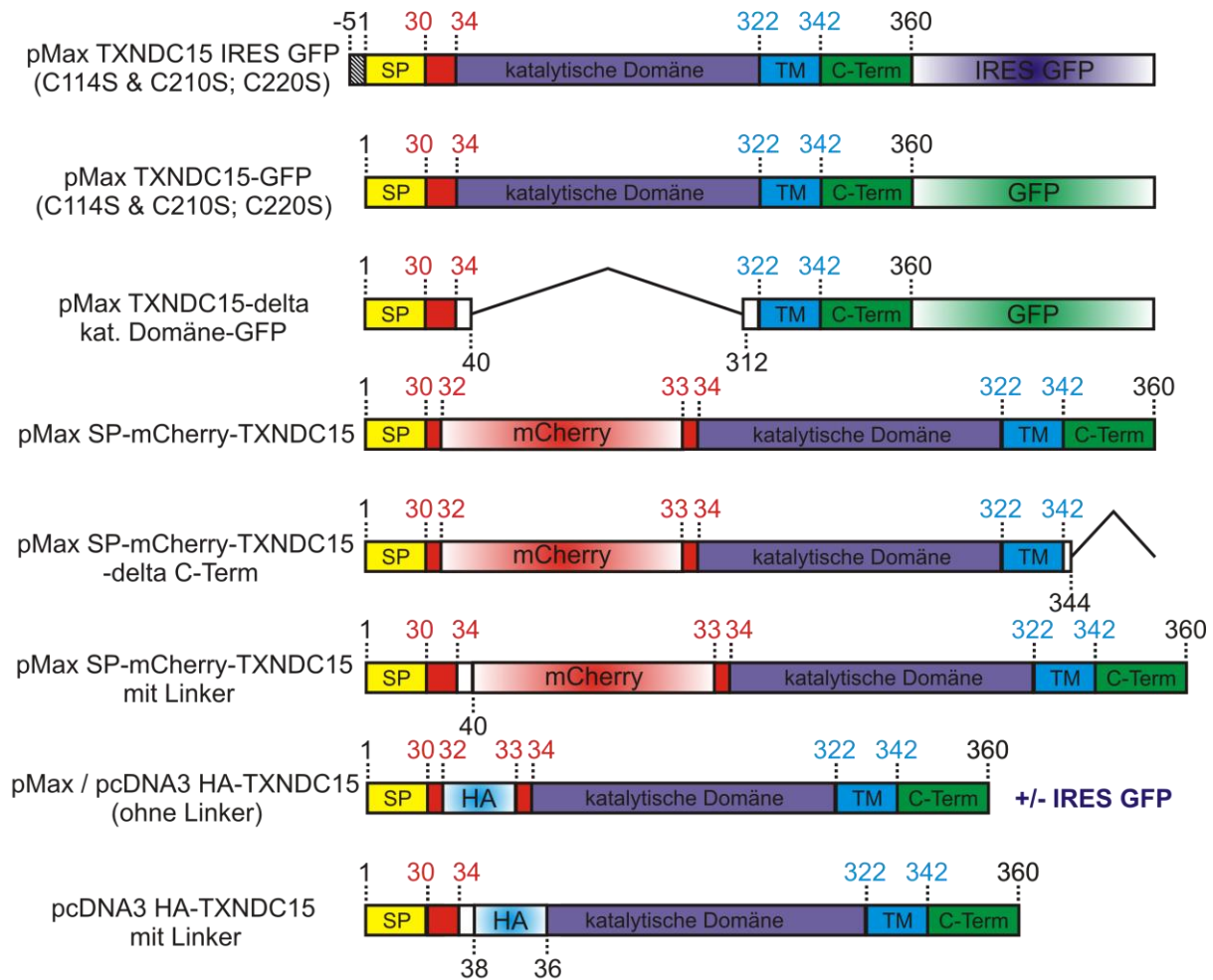
Ein zusätzliches HA getaggtetes TXNDC15-Konstrukt wurde von Herrn Prof. Dr. Lars Ellgaard (University of Copenhagen) zur Verfügung gestellt. Jedoch wies dieses Konstrukt im Sequenzieren ein fehlendes Start-Methionin auf, sodass die Translation mit einem internen Methionin begann. Das fehlende Start-Methionin wurde mittels der Primer BAN1245 und BAN1244 wiederhergestellt.

Konstrukte, die kloniert wurden, zu denen jedoch noch keine Daten vorliegen

Zur Deletion der katalytischen Domäne in TXNDC15 (pMax SP-mCherry-delta kat. Domäne-TXNDC15) wurde folgende Strategie verwendet. Zuerst wurde mCherry aus „pIRES mCherry-STIM2“ (Miederer et al. 2015) mit den Primern BAN1105 & BAN1106 amplifiziert und über eine SacII-Schnittstelle in "pMax TXNDC15-delta kat. Domäne-GFP" kloniert (TXNDC15 enthält eine SacII Schnittstelle nach dem Signalpeptid). Um die Translation des GFPs zu vermeiden wurde ein Stopp-Codon vor dem GFP mit den Primern BAN931 und BAN1139 eingefügt.

Zur Deletion der C-terminalen Domäne in „pMax TXNDC15-GFP“ wurde der Vektor mit BstBI (schneidet im C-Terminus von TXNDC15) und MfeI (schneidet nach GFP) geschnitten, um den C-Terminus und das GFP zu entfernen. Parallel wurde eine PCR vom „pMax TXNDC15-GFP“-Vektor mit den Primern BAN1160 und BAN1161 angesetzt, welches das GFP und den C-terminalen Bereich dahinter amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde mit MfeI und BstBI geschnitten und anschließend in den Vektor ligiert. Das erhaltene Produkt wurde „pMax TXNDC15-delta C-Term-GFP“ genannt.

A



B



C

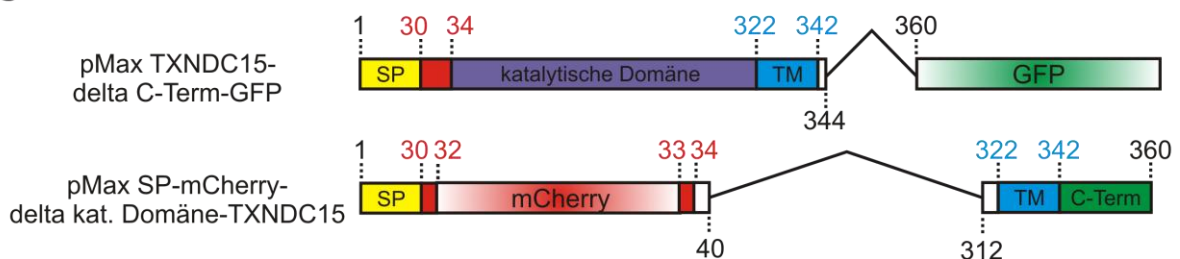


Abbildung 3.1: Graphische Zusammenfassung der für die Arbeit klonierten Konstrukte. (A) beschreibt die in der Arbeit verwendeten Konstrukte, welche auch zur Datengewinnung eingesetzt wurden. (C114S & C210S; C220S) bedeutet, dass in der Arbeit neben den WT-Konstrukten, auch solche mit den entsprechenden Cysteinmutationen verwendet wurden. (B) beschreibt die mittels SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011) vorhergesagte Signalpeptidase-Schnittstelle (*). (C) zeigt die im Rahmen der Arbeit klonierten Konstrukte, die jedoch noch nicht zur Datengewinnung genutzt wurden. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuren in TXNDC15, welches eine Gesamtlänge von 360 Aminosäuren aufweist. Insertierte Bereiche (HA- oder mCherry-Tag) oder deletierte Bereiche (^) werden bei der Nummerierung außer Acht gelassen.

3.2 Gel-Elektrophorese

Zur Aufreinigung von DNA, der Kontrolle analytischer Restriktionsverdauungen, oder zur Abschätzung der Qualität von isolierter RNA/DNA wurden Agarosegele benötigt. Diese wurden mit 1 – 2 % (m/m) Agarose oder GTQ-Agarose in 1x TBE-Puffer angesetzt. Hierzu wurde die Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und beim Abkühlen entweder mit GelRedTM oder peqGREEN versehen um die DNA in UV-Licht sichtbar machen zu können. Proben wurden mit 6x Gel-Loading-Dye versehen und in eine der Geltaschen geladen, bevor das Gel in 1x TBE-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 80 V laufen gelassen wurde. Die RNA oder DNA im Gel wurde mit Hilfe des ChemiDocTM XRS-System sichtbar gemacht und bei Bedarf mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA konnte mittels Gel-Extraktion Kit (siehe **Tab. 3.3**) nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel extrahiert werden.

10x TBE-Puffer:

(in Aqua Dest. angesetzt)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Tris Base oder Tris HCl	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	10 mM
pH:	8.3

3.3 Bakterienkultivierung und Transformation

Herstellung von kompetenten Bakterien

Es wurde eine kleine Menge, der bei -80 °C gelagerten XL-1Blue- oder JM-109-Zellen (**Tab. 3.6**) auf eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht wachsen gelassen. Von dieser Platte wurde eine einzelne Kolonie genutzt um eine Vorkultur in 5 mL 2YT-Medium anzupfen, welche über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen wurde. Um eine Hauptkultur anzupfen, wurde 1 mL der Vorkultur am nächsten Tag in 100 mL LB-Medium überführt. Die Hauptkultur wurde bei 37 - 39 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,5 wachsen gelassen bevor sie geerntet wurde. Dazu wurde die Kultur für 15 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 mL TSS-Puffer aufgenommen und der Ansatz a 200 µL in ERG aliquotiert. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff weggefroren und bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

Transformation von kompetenten Bakterien

Für die Transformation wurde ein 200 µL-Aliquot kompetenter Bakterien für 10 Minuten auf Eis auftauen gelassen und anschließend die gewünschte DNA zugegeben. Nach Zugabe der DNA wurde der Ansatz durch vorsichtiges Pipettieren gemischt, und weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert bevor die Bakterien für 90 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen wurden. Danach wurden sie für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert bevor ihnen 800 µL LB-Medium zugegeben wurde und sie für 1 Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurden. Danach wurden sie auf einer LB-Agarplatte mit selektionierendem Antibiotikum ausgestrichen. Nach dem Ausstreichen erfolgte die Kultivierung von E. coli auf LB-Agarböden im Inkubator zwischen 35 – 39 °C. Von dieser Platte wurde am nächsten Tag verschiedene Klone in 5 mL LB-Medium mit selektionierendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Spin Mini-Kultur). Die Spin Mini-Kultur liefert genug DNA für analytische PCRs, analytische Restriktionsverdauung oder zum Sequenzieren. Die für die Isolation der Plasmid-DNA genutzten Kits sind der **Tab. 3.7** zu entnehmen.

Tabelle 3.5: Für Transformationen genutzte Bakterienstämme. Angegeben ist der Hersteller und die Bestellnummer (sofern vorhanden) für den jeweiligen Bakterienstamm.

Bakterienstämme	Hersteller ; Bestellnummer
XL1-Blue	Stratagene (jetzt: Agilent Technologies)
JM109	Promega ; L2001

Tabelle 3.6 Verwendete Isolierungskits für Plasmid-DNA. Neben dem Namen, dem Hersteller und der Bestellnummer ist eine kurze Beschreibung des Verwendungszweckes für jedes Kit angegeben.

Kit	Verwendungszweck	Hersteller ; Bestellnummer
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (5 mL)	ThermoFischer Scientific ; K0503
QIAprep Spin Miniprep Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (5 mL)	QIAGEN ; 27106
HiSpeed Plasmid Kits	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (250 mL)	QIAGEN ; 12663

LB-Medium:

(in Aqua Dest. angesetzt)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Trypton oder Pepton	1 % (m/m)
NaCl	1 % (m/m)
Hefe-Extrakt	0,5 % (m/m)
pH	7 - 7.5

LB-Medium wird nach dem Ansetzen direkt autoklaviert und im Anschluss erst mit entsprechenden Antibiotika versehen. Für LB-Agarplatten wird vor dem Autoklavieren noch 1,5 % Agarose zugesetzt.

2YT-Medium:

(in Aqua Dest. angesetzt)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Trypton oder Pepton	1,6 % (m/m)
NaCl	1 % (m/m)
Hefe-Extrakt	0,5 % (m/m)
pH:	7 - 7.5

TSS-Puffer:

(in Aqua Dest. angesetzt)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
PEG3350 (40 %)	25 % (v/v)
DMSO (100 %)	5 % (v/v)
MgCl ₂ (1M Stock)	5 % (v/v)

3,5 mL des Ansatzes wird mit 6,5 mL LB-Medium vermischt um 10 mL TSS-Puffer (1x) zu erhalten.

3.4 Zellkultur und Transfektion

Jurkat E6-1 Zellen

Jurkat E6-1 Suspensionszellen (**Tab. 3.8**) wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sie wurden drei Mal die Woche (Mo., Mi., Fr.) gesplittet, wobei nur ein Teil der Zellen weiterkultiviert wurde. Dies war notwendig damit Zellen eine gewisse Anzahl/Volumen des Mediums nicht übersteigen. Das verworfene Volumen der alten Kultur wurde durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden in 25 cm² kultiviert (TC-Flasche T25,Suspension; Sarstedt).

Die Transfektion der Zellen, erfolgte mit dem Amaxa® Cell Line Nucleofector™ Kit V und dem Amaxa® Nucleofector™ II nach Anleitung des Herstellers. Für die Transfektion wurden ein entsprechendes Volumen der Kulturflasche bei 200 g und RT für 5 Minuten zentrifugiert um drei- bis fünfmillionen Zellen zu pelletieren. Das Zell-Pellet wurde in 100 µL der Nucleofector™-Lösung aufgenommen und mit 1 µg DNA oder 0,4 µM - 1,6 µM siRNA versehen. Siehe **Tab. 3.9 und 3.10** für die verwendeten Konstrukte oder siRNA's. Danach wurde der Transfektionsansatz in eine Transfektionsküvette überführt und im Amaxa® Nucleofector™ II transfiziert. Es wurde stets das Programm für „Jurkat E6-1“ zur hohen Transfektions-Effizienz verwendet. Zellen wurden nach der Transfektion vier Stunden lang in antibiotikafreiem Medium mit β-Mercaptoethanol (50 µM) gehalten, welches im Anschluss durch β-Mercaptoethanolfreies und antibiotikafreies Medium getauscht wurde. Hierfür wurden die Zellen bei 200 g, 5 Minuten abzentrifugiert und in das neue Medium überführt, in dem sie bis zum Versuchsbeginn weiterkultiviert wurden.

HEKwt-Zellen

Adhärente HEKwt-Zellen (**Tab. 3.8**) wurden in MEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in 125 cm² Flaschen und Zellen wurden zwei Mal die Woche passagiert (Mo., Fr.). Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, vom Boden mittels Trypsin-EDTA (0.05%) gelöst und anschließend in frischem Kulturmedium wieder aufgenommen. Ein Teil der Zellen wurden zusammen mit frischem Medium in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Dies

war notwendig, da der Boden der Kulturflasche adhären Kulturen nur begrenzt Platz bietet.

Für Transfektionen zur Immunhistochemie wurden ~50,000 HEK-Zellen in 100 µL MEM-Medium aufgenommen, auf einem 12 mm Poly-L-Ornithin gecoateten Coverslip ausgesät und für 30 Minuten adhären gelassen. Dann wurde den Zellen 900 µL Kulturmedium zugeben. Der FuGENE® HD Transfektionsansatz wurde in einem ERG parallel angesetzt. Hierzu wurden 1,1 µg DNA in 52 µL OptiMEM™ gegeben, dies gemischt und im Anschluss 3,3 µL FuGENE® HD zugegeben. Das Ganze wurde erneut gemischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert bevor 50 µL des Ansatzes auf die zuvor ausgesäten Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für Westernblots wurden Zellen in einer 25 cm² Kulturflaschen (TC-Flasche T25, Stand., Bel. Ka.; Sarstedt) transfiziert. Hierfür wurde das Kulturmedium 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen abgesaugt und 10 mL frisches Medium zugegeben. Der FuGENE® HD Transfektionsansatz wurde wieder in einem ERG parallel angesetzt. Hierzu wurden 8 µg DNA in 350 µL OptiMEM™ gegeben, im Anschluss wurden 25 µL FuGENE® HD hinzugefügt, und das Ganze gut gemischt. Dies wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und 375 µL des Ansatzes zu den Zellen gegeben, bevor sie weitere 24 Stunden inkubiert wurden.

Tabelle 3.7: Für Versuche verwendete Zelllinien. Angegeben sind die Bestellnummer und die Zellbank aus der die Zellen stammen.

Zelllinien	Zellbank ; Bestellnummer
HEKwt	ATCC ; CRL-1573
Jurkat E6.1	ATCC ; TIB-152

Tabelle 3.8: In der Arbeit für Transfektionen verwendete Plasmide. Plasmide die nicht eigens für diese Arbeit kloniert wurden sind unten aufgelistet. Angegeben ist der Plasmidname und wer sie freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat, bzw. der Hersteller unter Angabe der Bestellnummer.

Plasmide	Hersteller ; Bestellnummer / Bereitgestellt durch
pMax GFP	Im Nucleofector Kit V von Lonza enthalten ; VCA-1003
pEGFP-RAB5	Prof. Dr. Jens Rettig (Universität des Saarlandes; Zelluläre Neurophysiologie)
pEGFP-RAB7	Prof. Dr. Jens Rettig
pEGFP-RAB11	Prof. Dr. Jens Rettig
LAMP1-GFP	Prof. Dr. Lu Lei (Nanyang Technological University)
pmKate2-Clathrin	Evrogen ; FP322
pTagRFP-Golgi	Evrogen ; FP367
pMax ER-tagRFP-T	Kloniert von Carmen Mangerich (Universität des Saarlandes; Biophysik)

Tabelle 3.9: Für die Transfektionen von Zellen verwendete siRNA. Angegeben sind die in der Arbeit verwendeten siRNA's, die Ziel-Sequenz gegen die die siRNA gerichtet ist, der Hersteller, sowie die Bestellnummer (sofern vorhanden). Die siRNA-Mixe bestanden aus den vier einzelnen siRNA's (#1 - #4).

siRNA	Ziel-Sequenz(en)	Hersteller ; Bestellnummer
siTXNDC15 (alt)	5' CGACAGAGGACTCCAATAA 3'	Microsynth
siTXNDC15 Mix (neu) #1	5' CTGAGAGTATTCGCTGGCTAA 3'	Qiagen ; SI02655590
siTXNDC15 Mix (neu) #2	5' CTGCATGAACGTAATCCAGTA 3'	Qiagen ; SI00136976
siTXNDC15 Mix (neu) #3	5' CCGGCAGAATAGTGAGTAGAA 3'	Qiagen ; SI00136983
siTXNDC15 Mix (neu) #4	5' TACTATAAGGGTTATAGTAAA 3'	Qiagen ; SI00136990
siTMX4 Mix #1	5' CTGGGTCTTGAACACTTTAA 3'	Qiagen ; SI00129794
siTMX4 Mix #2	5' CTCCAGTACCTGAAAGTGAAA 3'	Qiagen ; SI00129808
siTMX4 Mix #3	5' CTCCAATAACAGCCAGGTTTA 3'	Qiagen ; SI00129815
siTMX4 Mix #4	5' TCGAAGACCTGCAGAATTATA 3'	Qiagen ; SI03115931
nsRNAi	5' TTCTCCGAACGTGTCACGT 3'	Qiagen ; 1022076

3.5 Calcium-Imaging

Das Calcium-Imaging erfolgte mit Hilfe des durch UV-Licht erregbaren Calciumindikator Fura-2. Da Fura-2 jedoch Zellimpermeabel ist, wurde ein Acetoxymethylester-Derivat (AM) des Farbstoffes verwendet, das über passive Diffusion in die Zellen eindringen kann. Intrazelluläres Fura2-AM wird durch zelluläre Esterasen von seinen Acetoxymethylestergruppen befreit und das Fura-2 verliert seine Fähigkeit frei über Membranen diffundieren zu können. Die Abspaltung der AM-Gruppen ist auch für das Erlangen der Fura-2 typischen Fluoreszenzspektren wichtig. Fura-2 lässt sich in Abhängigkeit der Calciumbindung durch UV-Licht verschiedener Wellenlängen maximal anregen, jedoch bleibt das Emissionsmaximum bei ca. 510 nm annähernd unverändert. Im Calcium-freien Zustand befindet sich das Anregungsmaximum bei ca. 360 nm und im Calcium-gebundenen Zustand bei 335 nm (Produktbeschreibung Invitrogen). In dieser Arbeit wurde Fura-2 sequentiell bei 340 nm und 380 nm alle 5 Sekunden für 10 - 20 ms angeregt. Die Detektion des Signals erfolgte mit einer Kamera und einem Binning von 1 oder 2 (zusammenfassen der Signale von 2 x 2 Pixel). Da Fura-2 ein ratiometrischer Farbstoff ist, bedeutet dies für die folgende Auswertung, dass die errechnete Ratio fast ausschließlich von der Calcium-Konzentration anhängig ist. Es bleibt also unbeeinflusst von der in den einzelnen Zellen vorliegende Farbstoff-Konzentration oder dem durch den Messvorgang bedingten Photobleaching. Fura-2-AM wurde als 1 mM Stock in DMSO angesetzt und bei -20 °C gelagert. Zellen wurden 25 Minuten vor den Versuchen mit einer Endkonzentration von 1 µM Fura-2-AM in Medium bei RT inkubiert. Suspensionszellen wurden vor dem Versuch bei 100 g für 90 Sekunden abzentrifugiert, in 0,25 mM Calciumlösung aufgenommen und für 10 Minuten auf zuvor mit Poly-L-Ornithin beschichteten Coverslips absitzen gelassen. Die Messungen erfolgten mit der in **Tab. 3.11** beschriebenen Mikroskop Konfiguration. Die Zusammensetzung der zum Imaging genutzten Lösungen ist unterterhalb aufgelistet.

Zur Nachfolgenden Analyse wurde das Offline Analysis-Programm verwendet. Nach jeder Messung wurden in Messungen einzelne Zellen mit Hilfe des ROI (Region of Interest) Werkzeug markiert. Zusätzlich wurde eine ROI als Hintergrundbestimmung in möglichst großen Abstand zu anderen Zellen in ein leeres Gebiet gelegt. Die Software subtrahiert nun bei jeder Wellenlänge einen spezifischen Hintergrundwert von jeder ROI bevor sie das Ratio („ROI 340 nm“ - „BG-

ROI 340 nm“) / („ROI 380 nm“ – „BG-ROI 380 nm“) der ROI bildet. Der Hintergrund ist für jede Wellenlänge und Zeitpunkt separat bestimmt, um dynamische Veränderungen, die auch den Hintergrund betreffen, berücksichtigen zu können. Die Software berücksichtigt bei ihrer Berechnung zusätzlich noch einen festgesetzten Schwellenwert. Dieser wurde für Messungen bei 20 angesetzt und führt dazu, dass die Software Pixel in ihre Auswertung nicht berücksichtigt, die diesen Wert unterschreiten. Dies führt zu einer Reduzierung des unspezifischen „Noise“ in analysierten Bildern.

0 mM Ca²⁺ Lösung:

(in Aqua Dest. angesetzt)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
NaCl	145 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	1 mM
Hepes, pH 7,4	10 mM
Glucose	10 mM
pH:	7.4
Osmolarität:	~310mosmol/L

0,25 mM Ca²⁺ Lösung:

(in Aqua Dest. angesetzt)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
NaCl	145 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	2 mM
CaCl ₂	0,25 mM
Hepes, pH 7,4	10 mM
Glucose	10 mM
pH:	7.4
Osmolarität:	~310mosmol/L

Tabelle 3.10: Wesentliche Komponenten des Calcium-Imaging Setup von TILL Photonics. (TILL Photonics jetzt FEI Company, Hillsboro, OR, USA).

<u>Komponente</u>	<u>Konfiguration (Hersteller)</u>
Mikroskop:	Axio Observer A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER)
Messsoftware:	Live Acquisition Software (TILL Photonics)
Auswertesoftware:	Offline Analysis (TILL Photonics)
Lichtquelle:	Polychrom V (TILL Photonics)
Steuereinheit:	ICU (TILL Photonics)
Kamera:	Clara (Andor Technology plc., Belfast, UK)
Filter:	F76-521 Fura-2 HC (AHF Analysetechnik AG, Tübingen, GER)
Zusätzliche Filter:	F36-528 HC Filterset für YFP /GFP (AHF Analysetechnik) F26-511 HC BrightLine Basic für CFP (AHF Analysetechnik) F20-451 TopPride Filterset für RFP (AHF Analysetechnik)

3.6 SDS-PAGE und Westernblot

HEK-Zellen wurden am Vortag, wie zuvor beschrieben, transfiziert. Am Tag der Zell-Ernte wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit DPBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in RIPA-Puffer mit cOmplete™ Proteinase-Inhibitor abgelöst und in ein 1,5 mL ERG überführt. Die Zellyse im RIPA-Puffer wurde dadurch beschleunigt, dass die Zellen für 10 Minuten bei – 80 °C eingefroren und beim Auftauen immer wieder gevortext wurden (ca. jede Minute für 10 Minuten). Im Anschluss wurden die Lysate für 20 Minuten bei 4 °C und 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt im Anschluss in ein neues ERG überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay in dem Platerader GENios™ Pro bestimmt. Danach wurde eine gewünschte Menge des Protein (25 - 100 µg) in ein neues ERG überführt, das Gesamtvolumen der Probe mit Wasser eingestellt (25 oder 50 µL), die Probe mit Laemmli-Puffer versehen und bei 65 °C für 10 Minuten oder bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Die Proteine konnten wahlweise auch vor dem Denaturieren mit den in **Tab. 3.12** aufgelisteten modifizierenden Proteinen nach Anleitung des Herstellers deglykosyliert werden. Ein exemplarischer Ablauf eines Deglykosylierungsversuchs ist unten aufgeführt:

Denaturierungs-Ansatz:

Protein	45 µL (x µg)
Denaturierungspuffer	5 µL

	50 µL

Der Denaturierungs-Ansatz wurde für 10 Minuten bei 95 °C gekocht und im Anschluss auf 4 Ansätze aufgeteilt.

3 x Deglykosylierungs-Ansätze:

Denaturierungs-Ansatz	10 µL
Deglykosylierungs-Puffer	2 µL (entsprechend dem verwendeten Protein(-mix))
Endo H/ PNGase F/ Deklyko.mix	2 µL
NP40	2 µL (nur bei Verwendung von PNGase F oder dem Protein Deklykosylierungsmix)

	Ad 20 µL mit Aqua Dest.

1 x denaturierte Kontrolle:

Denaturierungs-Ansatz	10 µL
Aqua Dest	10 µL

Die drei Deglykosylierungs-Ansätze und die denaturierte Kontrolle wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie mit 20 µL 2x Laemmli-Puffer versehen und für 10 Minuten bei 65 °C erneut denaturiert.

Die Proben konnten direkt nach dem Denaturieren in Laemmli-Puffer auf ein 10 % Trenngel mit 5 % Sammelgel aufgetragen werden. Die Proben wurde bei einer konstanten Spannung von 80 V durch das Sammelgel laufen gelassen. Hatten die Proben das Trenngel erreicht, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Der Laufpuffer bestand zu 10 % aus 10x SDS-Puffer und 90 % Aqua Dest. Im Anschluss wurde das Gel auf eine PVDF Membran geblottet. Diese wurde zuvor für 1 Minute in 100 % Methanol aktiviert. Das Blotten wurde für 90 - 120 Minuten bei 350 mA in eiskalten Blotting-Puffer durchgeführt. Der Blotting-Puffer bestand zu 10 % aus 10x SDS-Puffer, 20 % Methanol, und 70 % Aqua Dest. Im Anschluss wurde der Blot in 5 % Magermilch (in TBST) geblockt und über Nacht bei 4 °C mit dem gewünschten primären Antikörper inkubiert (**Tab. 3.13**). Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal in TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (**Tab. 3.14**) in 5 % Magermilch (in TBST) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Blot zweimal mit TBST und einmal in TBS gewaschen, bevor er in ECL-Entwicklerlösung (**Tab. 3.15**) für 1 Minute inkubiert und im ChemiDoc™ XRS-System entwickelt wurde. Die Auswertung der Signale erfolgte mit der Image Lab Software Version 5.2.1 (Bio-Rad).

RIPA Puffer:
(in PBS pH 7,4)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Tris base (Trizma)	10 mM
Triton X 100	1 % (v/v)
NP40	0,5 % (v/v)
NaCl	150 mM
pH:	7,4

10x SDS-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Tris base (Trizma)	250 mM
Glycin	1.92 M
SDS	1% (m/m)
pH:	8.3

Sammelgel Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Tris HCl	0.5 M
SDS	0.4 % (m/m)
pH:	6.8

Trenngel Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Tris base (Trizma)	1.5 M
SDS	0.4 % (m/m)
pH:	8.8

2x Laemmli-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
SDS	8 % (m/m)
Tris-HCl (pH 6.8)	120 mM
Glycerin	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (v/v)

Wurde als 900 µL Aliquot bei -20 °C gelagert. Vor dem Verwenden wurden 100 µL β-Mercaptoethanol hinzugegeben.

5x Laemmli-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
SDS	10 % (m/m)
Tris-HCl pH 6,8	300 mM
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (v/v)

Als 800 µL Aliquots gelagert, vor dem Gebrauch wurden 200 µL β-Mercaptoethanol zugegeben.

10x TBS-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Tris base (Trizma®)	500 mM
NaCl	1,5 M
pH:	7.5

Für **TBST** muss dem 1x TBS Puffer noch 1% Tween-20 zugegeben werden.

Antikörperlösung:
(in DPBS)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
BSA	1 % (m/m)
NaN ₃	0,02 % (v/v)
Antikörper	(siehe Tab.3.6-2)

5% Sammelgel (5 mL)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Acrylamid-Bisacrylamid	0,63 mL
Aqua Dest.	3,08 mL
Sammelgelpuffer	1,25 mL
APS	37,5 µL
TEMED	7,50 µL

10% Trenngel (10 mL)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Acrylamid-Bisacrylamid	2,5 mL
Aqua Dest.	4,91 mL
Trenngelpuffer	2,5 mL
APS	75 µL
TEMED	

Tabelle 3.11: Modifizierende Enzyme für Proteine aus Zelllysaten. Die Enzyme wurden wie vom Hersteller vorgeschlagen verwendet. Der verwendete Puffer, die Inkubationstemperatur, der Hersteller und die Bestellnummer sind angegeben.

<u>Enzyme</u>	<u>Puffer</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Hersteller ; Bestellnummer</u>
Endo H	G5-Puffer	37 °C	NEB ; P0702S
PNGase F	G7-Puffer	37 °C	NEB ; P0704S
Protein Deglykosylierungsmix	GlycoBuffer 2	37 °C	NEB ; P6039S

Tabelle 3.12: Verwendete Primärantikörper. Angegeben sind Eigenschaften des Antikörpers sowie der Hersteller, die Bestellnummer und die für die Arbeit verwendete Verdünnung des Antikörpers in der Antikörperlösung (siehe oben).

<u>Primärer Antikörper (Klon)</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Wirt</u>	<u>Hersteller ; Bestellnummer</u>	<u>Verdünnung</u>
α-GAPDH (14C10)	monoklonal	Hase	Cell Signaling Technology ; 2118	1:2000
α-GFP (D5.1)	monoklonal	Hase	Cell Signaling Technology ; 2956	1:1000
α-HA (3F10)	monoklonal	Ratte	Roche ; 12158167001	1:1000
α-mCherry	monoklonal	Maus	Biorbyt ; orb66657	1:1000

Tabelle 3.13: Zur Detektion der Primärantikörper verwendete Sekundärantikörper. Die Antikörper sind an eine HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt. Angegeben sind die Hersteller, die Bestellnummer und die für die Arbeit verwendete Verdünnung des Antikörpers in 5% Magermilchlösung (in TBST).

Sekundärer Antikörper	Hersteller ; Bestellnummer	Verdünnung
α -Maus	GE Healthcare Amersham ; NA931	1:5000
α -Hase	GE Healthcare Amersham ; NA9340	1:25000
α -Ratte	Sigma-Aldrich ; A5795	1:40000

Tabelle 3.14 Verwendete Kits für Westernblot-Experimente. Neben dem Namen, dem Hersteller und der Bestellnummer ist der Verwendungszweck für jedes Kit angegeben.

Kit	Verwendungszweck	Hersteller ; Bestellnummer
BCA Protein Assay Kit	Bestimmung von Proteingehalt in Zelllysaten	ThermoFischer Scientific ; 23225
Clarity™ Western ECL	Zur Detektion von HRP gekoppelten Sekundärantikörpern	Biorad ; 1705060

3.7 Fixierung und Färbung von Zellen

Hierfür mussten adhärenente Zellen am Vortag auf Coverslips ausgesät werden. Für Suspensionszellen reichte es jedoch, wenn diese für 10 Minuten auf Poly-L-Ornithin gecoateten Coverslips absitzen konnten. Zum Fixieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal in 0,25 mM Calcium-Ringerlösung gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 % PFA in 0,25 mM Calcium-Ringerlösung für 15 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,25 mM Calcium-Ringerlösung gewaschen und falls dies notwendig war für 5 – 10 Minuten mit 0,1 % TritonX-100 in Ringerlösung permeabilisiert. Nach dem Permeabilisieren wurden Zellen erneut mit Ringerlösung gewaschen. Unabhängig von der Permeabilisierung, wurden sie im nächsten Schritt mit 2 % BSA in DPBS für 30 Minuten geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Primärantikörper in einer 2 % BSA DPBS-Lösung für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Enthielt der Primärantikörper keinen an ihn gekoppelten Fluorophor, folgte eine Inkubation mit einem Fluorophor tragenden Sekundärantikörper für 30 Minuten in DPBS. Danach wurden Zellen erneut zweimal in DPBS und einmal in Aqua Dest gewaschen bevor sie im Anschluss mittels ProLong® Mountingmedium auf Objektträgern fixiert wurden.

3.8 Kolokalisationsstudien

Für Kolokalisationsversuche wurden Aufnahmen mit dem LSM 780 von Zeiss aufgezeichnet. Die Konfiguration des LSM ist der **Tab.3.16** zu entnehmen. Es wurde stets ein roter Fluorophor mit einem grünem kolokalisiert. Die in der Arbeit verwendeten Konstrukte sind im **Kapitel 3.1** aufgelistet. Die Detektion der HA-getaggten Konstrukte erfolgte mit den in **Tab. 3.17** aufgelisteten Antikörper. Die Laserintensität sowie der Pixeldwell wurden dem Fluorophor und der Intensität des Signals angepasst. Es wurde für jede Wellenlänge ein Pinhole von 1 Airy Unit Durchmesser verwendet. Stets wurde die maximale XY-Auflösung mit einer Pixelgröße von ca. 80 - 90 nm gewählt und Z-Stacks wurden im Abstand von 500 nm aufgenommen. Aufnahmen der beiden Fluorophore wurden sequentiell für eine Ebene im Z-Stack durchgeführt und jeder Pixel viermal gemessen, woraus dann ein Mittelwert des Signals errechnet wurde. Um chromatische Aberrationen weitgehend zu vermeiden wurden spezielle Zeiss-Objektive verwendet (Plan-Apochromat). Chromatische Aberrationen wurden zusätzlich mit TetraSpeck™ Beads ausgeschlossen, wofür Jurkat E6-1 Zellen wie zuvor beschrieben kultiviert und ausgesät wurden. Im Anschluss wurden sie fixiert und mit TetraSpeck™ Beads versetztem ProLong® Mountingmedium auf Objektträgern fixiert. Die Aufnahmen der in der Probe befindlichen TetraSpeck™ Beads wurden auf der Z-Ebene nahe der Zellen durchgeführt (**Abb. 3.2**).

Tabelle 3.15: Wesentliche Komponenten des LSM780 von Zeiss.

Komponente	Konfiguration (Hersteller)
Mikroskop:	Axio Observer für Superauflösungsmikroskopie (Carl Zeiss)
Lichtquellen:	Laser Argon Multiline 458/488/514 nm (25 mW)
	Laser Rack LSM 710: 405 nm Dioderlaser (30 mW) für LSM 710
	561 nm Laser für LSM 710
	633 nm Laser für LSM 710
Detektoren:	Durchlichtdetektor T-PMT für LSM 710
	Scanmodul LSM 710 (Carl Zeiss)
Objektiv:	Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27 (Carl Zeiss)
Mess- & Auswertesoftware:	Zen Software 2011 (Carl Zeiss)

Tabelle 3.16: Für Immunhistochemie verwendete Antikörper. Angegeben sind Eigenschaften des Antikörpers sowie der Hersteller, die Bestellnummer und die für die Arbeit verwendete Verdünnung des Antikörpers in DPBS.

Antikörper (Klon)	Klonalität	Wirt	Hersteller ; Bestellnummer	Verdünnung
α -HA (3F10)	monoklonal	Ratte	Roche ; 12158167001	1:1000
α -HA alexa Fluor 488 (16B12)	monoklonal	Maus	ThermoFischer Scientific ; A-21287	1:500
α -Ratte alexa Fluor 568	polyklonal	Ziege	ThermoFischer Scientific ; A-11077	1:200

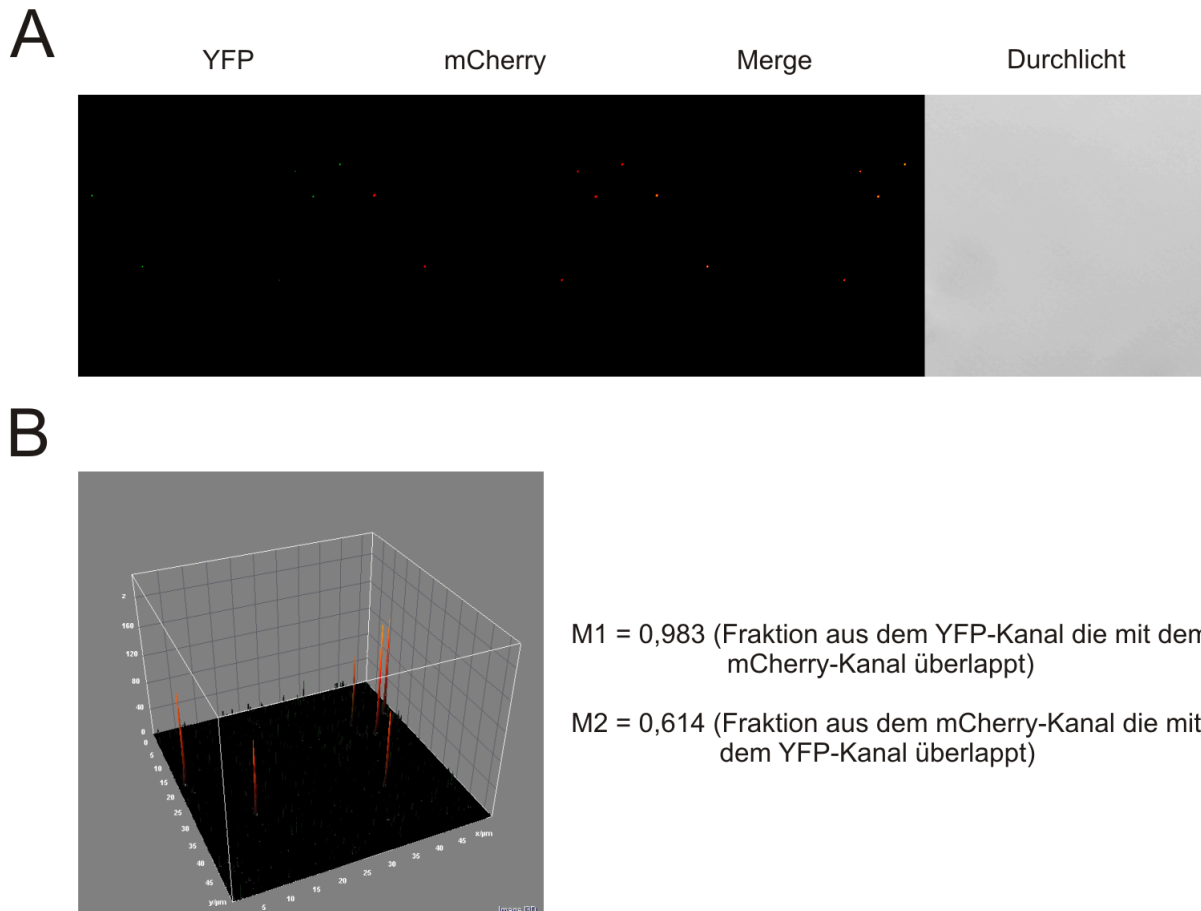


Abbildung 3.2: Kontrolle der chromatische Aberrationen des LSM780 mit TetraSpeck™ Beads und der berechneten Kolokalisation von TetraSpeck™ Beads in zwei Kanälen. (A) Die TetraSpeck™ Beads wurden im YFP und mCherry Kanal detektiert und eine Kolokalisation mit Hilfe des JaCop Plug-In berechnet. Es wurde der gelbe und rote Kanal verwendet, da die Beads in beiden Kanälen optimal angeregt wurden. Die 12-Bit Graustufen-Dateiformate wurden nachträglich in eingefärbte RGB Dateiformat umgewandelt. Der YFP-Kanal wurde grün eingefärbt, der m-Cherry-Kanal rot. Gelbe Pixel im Merge-Bild entstehen durch die Überlagerung der grünen und roten Pixel. (B) Zur einfachen Visualisierung der Signale wurde in Fiji ein 3D-Surfaceplot nach der Hintergrundkorrektur erstellt. Auf der XY-Ebenen befinden sich die Koordinaten und in Z-Richtung die Pixelintensität der kombinierten Kanäle.

Die Bearbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit Fiji (Schindelin et al. 2012; Schneider et al. 2012) und die Kolokalisation wurde mit Hilfe des JaCop Plug-In (Bolte & Cordelières 2006) berechnet. Für die Berechnung der Kolokalisation wurden „Maximum Intensity Projections“ (MIP) verwendet. Hierzu wurde in den Rohdaten

eine ROI (region of interest) um die zu analysierende Zelle gezogen und für diesen Bereich eine MIP aus dem Z-Stack der Bilder 3 bis 5 errechnet. War in diesem Z-Stack zu wenig Signal für eine zuverlässige Auswertung, wurde eine MIP der Bilder 6 bis 8 verwendet. Im Anschluss wurde das Histogramm der MIP für den grünen oder roten Kanal in Fiji betrachtet. Der Mittelwert der Pixelintensität plus das Dreifache der Standardabweichung jedes Kanals wurde als jeweilige Grenze für „echtes“ Signal (keine Autofluoreszenz oder Hintergrundsignal) gesetzt. Dies war Notwendig um eine Überschätzung der Kolo-kalisation durch das JaCop Plug-In zu vermeiden und um eine reproduzierbare Methode des zu setzenden Schwellenwerts möglich zu machen. Da durch das setzen des Schwellenwerts für „echtes“ Signal der Hintergrund nicht beachtet wird, wurde vorher keine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Für die Bilder der exemplarischen Zelle jeder Färbung wurde wieder aus dem entsprechenden Z-Stack der Bilder 3 bis 5 eine MIP für jeden Kanal errechnet. Diese MIP wurde dann mit Hilfe des Hintergrundkorrekturbefehl von Fiji mit einem „rolling ball“ Algorithmus mit 10 Pixel Durchmesser korrigiert. Im Anschluss wurde das 12-Bit Graustufen-Dateiformat in ein nachträglich eingefärbtes RGB Dateiformat umgewandelt.

3.9 Durchflusszytometrie gestütztes Zellsortieren

Jurkat-Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn mit dem pMax GFP-Kontrollvektor oder dem pMax-TXNDC15-GFP-Vektor transfiziert. Vor Beginn der Durchflusszytometrie wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen bevor sie in einer Dichte von ca. 1×10^7 Zellen / ml in PBS mit 0,5 % BSA aufgenommen wurden. Danach wurden sie durch ein 30 μ m Sieb gefiltert um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Das Sortieren erfolgt mit Hilfe des FACSAriaTM III (BD Biosciences) ausgestattet mit einer 70 μ m Einzugsdüse. Mit dem FACS wurden zuerst Dubletten ausgeschlossen und im Anschluss lebende Zellen ausgewählt. Dies wurde unter Zuhilfenahme der FSC-Werte vs. des SSC-Wertes getätigt. Das eigentliche Sortieren der Zellen erfolgte danach anhand ihres GFP-Fluoreszenzsignals im FITC-Kanal (Ex: 488 nm; Em: 530/30 nm) in eine GFP-positive und GFP-negative Population. Die sortierten Populationen wurden danach direkt abzentrifugiert und das Zell-Pellet in TRIzol® (Life Technologies) aufgenommen.

3.10 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurde versucht mindestens eine Million Zellen pro Extraktion zu verwenden. Die Zellen wurden für 3 Minuten bei 200 g abzentrifugiert, das Kulturmedium abgenommen und die Zellen in 800 µL TRIzol® aufgenommen. Das Zellpellet wurde durch Vortexen wieder gelöst und die Probe bei -80 °C bis zur RNA-Isolation gelagert. Vor der RNA-Isolation wurde die Probe wieder aufgetaut und bei 12,000 g für 10 Minuten bei 4 °C Zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Die Probe wurde nun für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 200 µL Chloroform hinzugegeben und diese durch starkes Schütteln von Hand vermischt wurde. Im Anschluss wurde die Probe für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor sie wieder bei 12000 g für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert wurde. Danach wurde die wasserlösliche Phase in ein neues Eppi überführt und 1 µL Glycogen (5 µg/µL) sowie 0,5 mL Isopropanol zugegeben, das Ganze vorsichtig vermischt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Probe wieder bei 12000 g für 10 Minuten und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 mL 75 % Ethanol (in DEPC-behandeltem H₂O) gewaschen bevor sie für 7500 g für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das RNA-Pellet für bis zu 10 Minuten getrocknet und in 5 – 10 µL DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Ausbeute wurde photometrisch und die Qualität der RNA über ein Gel bestimmt. Für die reverse Transkription wurden 0,8 µg der isolierten RNA eingesetzt und wurde wie unten angegeben durchgeführt.

Reverser Transkriptions Ansatz:

RNA (0,8 µg)	x µL
Oligo dT (0,5 µg/µL)	1 µL
dNTP's (10 mM in DEPC H ₂ O)	1 µL
H ₂ O (DEPC)	x µL

	Ad 12 µL mit H ₂ O (DEPC behandelt)

Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert bevor im Anschluss folgendes zugegeben wurde:

5x First strand buffer	4 µL
DTT (0,1 M)	2 µL
RNaseOUT™	1 µL

	Ad 19 µL mit H ₂ O (DEPC behandelt)

Das Ganze wurde vorsichtig gemischt und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert, bevor 1 µL Superscript® II (ThermoFischer Scientific; Bestellnummer: 18064014) zugegeben wurde.

Die reverse Transkription verlief im Thermocycler wie folgt:

- 1) Die reverse Transkription fand bei 42 °C für 50 Minuten statt.
- 2) Im Anschluss wurde die Reaktion bei 70 °C für 15 Minuten hitzeinaktiviert.
- 3) Der Ansatz wurde auf 4 °C gekühlt und bis zur weiteren Verwendung gelagert

Für die eigentliche qRT-PCR wurde das QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit (QIAGEN; Bestellnummer: 204145) unter Zuhilfenahme des CFX96 Touch™ Real Time System (Bio-Rad) verwendet. Die verwendeten Primer sind der **Tab. 3.18** zu entnehmen. Das Programm der qRT-PCR verlief wie folgt:

- 1) Initiales Denaturieren: 95 °C für 15 Minuten
- 2) Denaturieren: für 95 °C für 30 Sekunden
- 3) Annealing der Primer: 58°C für 30 Sekunden
- 4) Elongationsschritt: 72 °C für 30 Sekunden
- 5) Finaler Elongationsschritt: 95 °C für 1 Minuten
- 6) Überprüfung der Reaktion auf Primer-Dimere, die die Auswertung verfälschen könnten: Rampe von 65 – 95 °C mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/ 5 Sekunden
- 7) Abkühlen der PCR-Reaktion auf 25 °C für 30 Sekunden

Die Schritte # 2 – 4 wurden während der PCR für 45 Zyklen wiederholt.

Tabelle 3.17 qRT-PCR Primerliste: Die in der Arbeit verwendeten Primer sind der Tabelle zu Entnehmen. Aufgelistet ist der Kurzname und die Sequenz jedes Primers, sowie eine sehr kurze Beschreibung. **For.:** Vorwärtsprimer, **Rev.:** Rückwärtsprimer. Die zu erwartenden Produktgrößen unter Verwendung der Primerpaare für TXNDC15 sind 164 bp, für TMX4 139 bp, TBP 160 bp, für RNAPol 133 bp und für GRP78 192 bp.

Kurzname	Sequenz von 5' nach 3'	Beschreibung
BAN838	5' GTGTACCTGGGTGAGGAGGA 3'	TXNDC15 For.
BAN839	5' CCGCTAGGCTCTGAACTCAC 3'	TXNDC15 Rev.
BAN1150	5' CCAAGGTGGCTATGACGAAA 3'	TMX4 For.
BAN1151	5' CCGGCTTCTCTAACGATGTC 3'	TMX4 Rev.
-	5' CGGAGAGTTCTGGGATTGT 3'	TBP For.
-	5' GGTTTCGTGGCTCTCTTATC 3'	TBP Rev.
-	5' GGAGATTGAGTCCAAGTTCA 3'	RNAPol For.
-	5' GCAGACACACCAGCATAGT 3'	RNAPol Rev.
-	5' TGAAACTGTGGGAGGTGTCA 3'	GRP78 For.
-	5' GCAGGAGGAATTCCAGTCAG 3'	GRP78 Rev.

3.11 Induktion von ER-Stress

Jurkat E6-1 Zellen wurden am Vortag wie in **Kapitel 3.4** beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden am Tag des Versuches abzentrifugiert und in 1 mL frisches DMEM-Medium überführt. Im Anschluss wurde ihnen 1 µL Tunicamycin (Stock 3 µg / µL), 1 µL Thapsigargin (Stock 1 mM) oder 1 µL DMSO hinzugegeben. Die Zellen wurden dann für weitere 4 Stunden im Inkubator kultiviert, bevor sie abzentrifugiert und in TRIzol® aufgenommen wurden. Der ER-Stress wurde anhand der mRNA-Menge eines bestimmten Marker-Proteins (GRP78) in der qRT-PCR bestimmt.

3.12 In Kapitel 3.1 - 3.11 verwendete Materialien und Geräte

Tabelle 3.18: In der Arbeit verwendete Chemikalien bzw. Verbrauchsmittel. Die Liste ist alphabetisch nach den verwendeten Verbrauchsmitteln/Chemikalien sortiert. Es sind zusätzlich der Hersteller und die Bestellnummer der Verbrauchsmittel/Chemikalien angegeben.

Substanz	Hersteller ; Bestellnummer
1 kb Plus DNA Ladder	ThermoFischer Scientific ; 10787018
β-Mercaptoethanol	Acros Organics ; 125472500
Acrylamid-Bisacrylamid	Sigma-Aldrich ; A7168
Agarose	Sigma-Aldrich ; A5054
Agarose broad range	Carl Roth ; T846.3
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma ; A3678
GTQ Agarose	Carl Roth ; 6352.4
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich ; A6003
Ampicillin	Sigma-Aldrich ; A9393
APS	Sigma-Aldrich ; 248614-56
Borsäure	Sigma-Aldrich ; B6768
Bromophenolblau	Eurobio ; 18069
Calciumchlorid	Merck Millipore ; 102382
cOmplete™ Proteinase-Inhibitor	Roche ; 05892791001
CMA (Concanamycin A)	Santa Cruz ; sc-202111
Deckgläschen (12 mm)	O. Kindler ; 02R1215-D
Deckgläschen (25 mm)	O. Kindler ; 02R2515-D
DMSO	Sigma-Aldrich ; D8418
DPBS	ThermoFischer Scientific ; 14190-094
DTT	Sigma-Aldrich ; D9779
Dual Color Protein Standard	Bio-Rad ; 1610374
Dynabeads® Human T Activator CD3/CD28	Life Technologies ; 11132D
EDTA	Sigma-Aldrich ; ED2SS
EGTA	Sigma-Aldrich ; E4378
Ethanol	Sigma-Aldrich-Aldrich ; 32205
Fetal Bovine Serum (FCS)	Life Technologies ; 10270106
FuGENE® HD	Promega ; E2312
Fura-2-AM	Invitrogen ; F1221
GelRed™	Biotium ; 41003
Glucose	Merck Millipore ; 102382
Glycin	Applichem ; R030
HCl 30%	Applichem ; A3190
Hefeextrakt	BD ; 212750
HEPES	Sigma-Aldrich ; H7523
Isopropanol	Sigma-Aldrich ; 19516
Kaliumchlorid	VWR ; 7447-40-7
Kanamycin	Sigma-Aldrich ; K0254
Gel Loading Dye, Blue (6x)	NEB ; B7021
Low DNA Mass Ladder	ThermoFischer Scientific ; 10068013
Magermilchpulver	Serva ; 42590.02
Magnesiumchlorid	Merck Millipore ; 105833025
MEM-Medium	ThermoFischer Scientific ; 31095-029

Tabelle 3.18 fortgesetzt

Substanz	Hersteller & Bestellnummer
Methanol	ThermoFischer Chemical ; M3950
MG-132	zur Verfügung gestellt von der AG Richard Zimmermann
Natriumacetat	Eurobio ; 017527
Natriumazid	Sigma-Aldrich-Aldrich ; S8032
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich-Aldrich ; S9888
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich-Aldrich ; S8045
NP-40	Sigma-Aldrich-Aldrich ; 74385
Nucleofector™ Kit V	Lonza; VCA-1003
Objektträger	Carl Roth ; 2105.1
Opti-MEM™	ThermoFischer Scientific ; 51985-026
PEG3350	Sigma-Aldrich ; P3640
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen ; 15140-122
peqGREEN	PEQILAB ; PEQL37-5000 (jetzt VWR)
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich ; P3655
ProLong® Diamond Antifade Mountant	ThermoFischer Scientific ; P36965
ProLong® Gold Antifade Mountant mit DAPI	ThermoFischer Scientific ; P36931
RPMI-1640 Medium	ThermoFischer Scientific ; 21875-034
SDS	Acrosorganics ; 327315000
TEA-HCl	Sigma-Aldrich ; T2265
TEMED	Sigma-Aldrich ; T9281
TetraSpeck™ Beads	ThermoFischer Scientific ; T7279
Thapsigargin	Invitrogen ; T7458
Tris-HCl	Carl Roth ; 9090.3
TritonX-100	Eurobio ; 18774
Trizma® (Tris Base)	Sigma-Aldrich ; T1503
TRIzol®	Life Technologies ; 15596018
Trypton	BD ; 211705
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	ThermoFischer Scientific ; 25300062
Tunicamycin	Sigma ; T7765
Tween 20	Sigma-Aldrich ; P1379

Tabelle 3.19: Für das Anfertigen der Arbeit verwendete Geräte. Die Liste ist alphabetisch nach den Herstellern der Geräte sortiert.

Gerät	Hersteller
Nucleofector™ II	Amaxa
Thermoschrank (37 °C)	Aqua Lytic
Folienschweißgerät Futura Junior	AUDION
Zellzähler Coulter Z2	Beckman Coulter Life Sciences
Heizblock	Bioer Technology
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad
Gelelektrophorese Mini-Protean® Tetra Cell	Bio-Rad
Stromquelle Power Pac™ HC	Bio-Rad
Sub-cell® Agarose Gel Elektrophorese Systems	Bio-Rad

Tabelle 3.19 fortgesetzt

Gerät	Hersteller
BioPhotometer®	Eppendorf
Multipipette® M4	Eppendorf
PCR-Mastercycler Personal 5332	Eppendorf
Pipette Research plus 0,1 - 2,5 µL	Eppendorf
Pipette Research plus 0,5 - 10 µL	Eppendorf
Pipette Research plus 100 - 1000 µL	Eppendorf
Pipette Research plus 2 - 20 µL	Eppendorf
Pipette Research plus 20 - 200 µL	Eppendorf
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
pH-Meter Accumet Basic	Fischer-Scientific
Kreis-Schüttler 3005	GFL
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph
Schüttler Unimax 1010 + Inkubator 1000	Heidolph
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich
Magnetrührer C-MAG HS4	IKA
Magnetrührer RCT basic	IKA
Vortexer/Schüttler MS3 basic	IKA
Inkubationsschüttler Minitron CH-4103	INFORS HT
PipetBoy2	Integra
VacuBoy	Integra
Feinwaage ALT160-4NM	Kern & Sohn GmbH
Transparentbad 012T + Wärmethermostat A100	LAUDA
Gefrierschränke (-20 °C)	Liebherr
Kühlschränke (4 °C)	Liebherr
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q® Reference A+	Merck Millipore
Ultra Low Temperatur Freezer (-80 °C)	New Brunswick Scientific (jetzt Eppendorf)
Zellzähler MOXI™ Z Mini	ORFLO Technologies
Heizblock Thriller®	Peqlab
Eismaschine AF 80	Scotsman Ice Systems
Zentrifuge Art. Nr. 10014	Sigma
Platereader GENios™ Pro	Tecan
Platereader Infinite M200 Pro	Tecan
Inkubator Heracell™ 150	ThermoFischer
Inkubator Heracell™ 150i	ThermoFischer
Sterilwerkbank Typ: KS12	ThermoFischer
Sterilwerkbank Typ: KS18	ThermoFischer
Thermomixer Univortemp	Universal Labortechnik GmbH & Co. KG
Osmometer VAPRO® Model 5600	Wescor Inc (jetzt ELITech Group)
Mikroskop Primo Vert	Zeiss

3.13 SPC Präparation, *in vitro* Transkription, Translation und Transport*

*Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Anke Ziska (AG Richard Zimmermann) in der Biochemie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

HeLa-Zellen

Adhärenente HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium mit GlutaMAX™, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte in einer 75 cm² Flasche. Das Passagieren der Kultur erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, im Anschluss in PBS mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA abgelöst. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Reaktion mit DMEM-Medium abgestoppt und ein Teil der abgelösten Zellen in frischem DMEM-Medium weiterkultiviert. HeLa-Zellen wurden in dieser Arbeit nur für die SPC-Präparation verwendet (siehe **Tab. 3.20**)

Tabelle 3.20: Für die SPC-Präparation verwendete Zelllinie. Angegeben sind die Bestellnummer und die Zellbank aus der die Zellen stammen.

Zelllinie	Zellbank ; Bestellnummer
HeLa	ATCC ; CCL-2

SPC-Präparation:

Für die Generation von semi-permeabilisierte Zellen (eng.: Semi-Permeable Cells; SPC) wurden am Vortag des Experiments $2 \cdot 10^6$ HeLa-Zellen im 8 ml Medium in eine 10 cm Schale ausgesät und für 34 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden am Folgetag in 500 µL PBS mit Trypsin für 5 Minuten abgelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 mL eiskaltem KHM-Puffer mit 15 µL Trypsininhibitor gestoppt. Als nächstes wurde die Zellzahl der Suspension mit dem Countess „Automated Cell Counter“ bestimmt. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten bei 4 °C und 2000 rpm abzentrifugiert (CS-6KR Zentrifuge). Diese Bedingung wurde auch für alle folgenden Zentrifugationsschritte verwendet. Das Zellpellet wurde in 6 mL KHM-Puffer mit 1,1 µL Digitonin/ $1 \cdot 10^6$ Zellen gelöst und für 5 Minuten auf Eis inkubiert um die Plasmamembran der Zellen zu permeabilisieren. Danach wurde dem Ansatz 4 mL eiskaltem KHM-Puffer zugegeben, erneut wie zuvor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um das Zytosol auszuwaschen wurde das Pellet in 10 mL kaltem HEPES-Puffer aufgenommen, für weiter 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Zum Verdau der endogenen DNA der HeLa-Zellen wurde das Zellpellet in 200 µL KHM-Puffer gelöst und mit 0,5 µL Ca²⁺-Lösung und 1 µL Nuklease-Lösung für 12

Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 μL EGTA-Lösung abgestoppt. Anschließend wurden 2 mL KHM-Puffer hinzugegeben und die Zellen erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1-2 mL KHM-Puffer aufgenommen. Von der Zellsuspension wurde eine Probe genommen und diese mittels Trypanblau eingefärbt und mit Hilfe des Countess „Automated Cell Counter“ gezählt. Das Trypanblau diente als Kontrolle einer ausreichenden Permeabilisierung der Zellen, da es in intakten Zellen nicht die Plasmamembran überqueren kann. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet so gelöst, dass sich eine Konzentration von 40.000 Zellen/ μL in KHM-Puffer einstellte. Die SPC's konnten direkt für den *in vitro* Transport eingesetzt werden oder bis zu einer Stunde auf Eis gelagert werden.

RM-Präparation:

Die Präparation der rauen Mikrosomen (RM) aus Hundepankreas fand nach der etablierten Methode durch (Walter & Blobel 1983; Watts et al. 1983) in der AG von Richard Zimmermann statt.

in vitro Transkription, Translation und Transport:

Diese Methode erlaubt es die Synthese eines beliebigen Proteins *in vitro* zu verfolgen. Dies ist besonders interessant für Proteine bei denen keine Detektion mittels Antikörper möglich ist. Die hierbei generierten radioaktiv markierten Proteine lassen sich über Autoradiographie direkt detektieren. Für die *in vitro* Transkription wurde in dieser Arbeit der pcDNA3-Vektor für TXNDC15 genutzt. Der Vektor pcDNA3 besitzt einen T7-Promotor der es erlaubt mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase aus der Plasmid-DNA eine lineare mRNA des Protein zu erzeugen.

in vitro Transkription:

Prämix A	30 μL
Vektor (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1 μL
CAP-Lsg.	1,5 μL
RNasin® (40 U/mL)	1,5 μL
T7-RNA-Polymerase	1 μL

	Ad 50 μL mit Aqua Dest

Der Ansatz wurde 3 Stunden bei 40 °C Inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die *in vitro* Translation wurde das Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega) verwendet. Um die Proteine radioaktiv zu markieren wurde dem Ansatz radioaktives Methionin beigegeben. Damit ein cotranslationaler Transport der *in vitro* synthetisierten Proteine über die ER-Membran möglich war, mussten dem Ansatz entweder raue Mikrosomen (RM) oder SPC's zugegeben werden. Der Reifungsprozess des Proteins kann durch die Autoradiographie im Anschluss sichtbar gemacht werden. Eine Signalpeptidabspaltung kann in manchen Fällen durch eine Verkleinerung des Molekulargewichts beobachtet werden. Indirekt kann auch auf einen Import des Proteins ins ER geschlossen werden, wenn eine N-Glykosylierung (Vergrößerung des Molekulargewichts) beobachtet wird. Eine N-Glykosylierung kann jedoch nur beobachtet werden, wenn das Protein N-Glykosylierungsstellen aufweist. Durch die Verwendung von Glykosylierungshemmern wie NYT kann die N-Glykosylierung bestätigt werden, falls eine Vergrößerung des Molekulargewichts dadurch unterdrückt werden kann.

in vitro Translation und Transport:

Retikulozytenlysat	12,5 µL
Aminosäuren (ohne Methionin)	0,5 µL
[S ³⁵]-Methionin (1000 Ci/mmol)	1 µL
RNasin (40 U/mL)	0,5 µL
mRNA (Transkript)	1 µL
Raue Mikrosomen (RM) oder SPC	1,5 µL (RM) oder 8 µL (SPC)
NYT	0,5 µL (Bei Bedarf)

	Ad 25 µL mit Aqua Dest

Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 30 °C inkubiert, und im Anschluss einer Sequestrierung unterzogen.

Die Sequestrierung des Proteins dient der genaueren Untersuchung der Membranintegration eines Proteins und kann bei membranständigen Proteinen Aufschluss über deren Orientierung in der Membran geben. Proteine die in das ER synthetisiert werden, sollten vor einem Proteinase K-Verdau durch die ER-Membran geschützt sein. Transmembranproteine sind hingegen nur teilweise geschützt. Ihr ER-luminaler Bereich ist vor der Proteinase K geschützt, wo hingegen der zytosolische Teil degradiert wird. Wird die ER-Membran durch eine Detergenz-Behandlung (TritonX-100) zerstört, sollte das gesamte Protein degradiert werden. Dazu wird der *in vitro* Transport auf 3 Ansätze aufgeteilt. Die Ansätze wurden wie folgt behandelt:

Sequestrierung 1. Ansatz:

Translations- und Transportansatz	5 µL
Saccharose-Lösung	5 µL

Sequestrierung 2. Ansatz:

Translations- und Transportansatz	5 µL
Proteinase K-Lösung	5 µL

Sequestrierung 3. Ansatz:

Translations- und Transportansatz	5 µL
Proteinase K-Lösung mit TritonX-100	5 µL

Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Dann wurden sie mit 2 µL PMSF-Lösung für 5 Minuten bei 4 °C behandelt um die Proteinase K zu inhibieren. Die Sequestrierung wurde im Anschluss mit Lämmli-Probenpuffer versehen, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt.

Da sich manche der getesteten HA-Konstrukte nicht mit Hilfe der zuvor hergestellten mRNA-Templates synthetisieren ließen wurde versucht diese mit dem TNT Reticulocyte Lysate System von Promega zu synthetisieren. Dieses System ermöglicht eine gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation des Proteins. Der Versuch wurde wie folgt angesetzt:

in vitro Transkription, Translation und Transport:

TNT Reticulocyte Lysate System	2,5 µL
Aminosäuren (ohne Methionin)	0,1 µL
[S ³⁵]-Methionin (1000 Ci/mmol)	0,4 µL
RNasin® (40 U/mL)	0,1 µL
DNA	0,1 – 0,2 µL
T7-Polymerase	0,1 µL
Raue Mikrosomen (RM)	0,3 µL
NYT	0,1 µL (Bei Bedarf)

	5 µL mit Aqua Dest

Der Ansatz wurde im Anschluss mit Laemmli-Probenpuffer versehen, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und über ein 10 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt.

Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine im SDS-PAGE Gel erfolgte mit Hilfe der Autoradiographie. Hierzu wurde das SDS-Gel für 15 Minuten in einer Entfärber-Lösung fixiert und danach für 30 Minuten in der Neutralisationslösung zur Dehydrierung inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt und für 1 Stunde bei 90 °C im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde dann für 1 Woche auf eine Storage Phosphor Screen-Platte gelegt bevor die Platte mit Hilfe des Typhoon TrioTM Laserscanner ausgelesen wurde. Die in diesem Versuchsteil

verwendeten Verbrauchsmittel und Gerätschaften sind in den **Tab. 3.21** und **Tab. 3.22** aufgelistet.

Prämix A:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
ATP, CTP, UTP	0,5 mM
BSA	0,1 mg/mL
DTT	10 mM
GTP	0,1 mM
Hepes/KOH	40 mM
Magnesiumacetat	6 mM
Spermidin	2 mM

CAP-Lösung:
(in 300 µL 10mM HEPES/KOH, pH 7,9)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
m ⁷ GpppG	5 U

MVP-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
HEPES/KOH, pH 7,5	20 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	2 mM
Saccharose	200 mM

KHM-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
HEPES/KOH, pH 7,2	20 mM
Kaliumacetat	110 mM
Magnesiumacetat	2 mM

Digitonin-Lösung:
(in DMSO)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Digitonin	40 mg/ml

HEPES-Puffer:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
HEPES/KOH, pH 7,2	90 mM
Kaliumacetat	50 mM

Ca²⁺-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
CaCl ₂	200 mM

Nuklease-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
S7-Nuklease	4000 U/mL

EGTA-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
EGTA	200 mM

Saccharose-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Saccharose	162,5 mM

Proteinase K-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Saccharose	162,5 mM
Proteinase K	340 µg/µL

PMSF-Lösung:
(in Ethanol)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
PMSF	100 mM

Entfärber-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Methanol	50 %(v/v)
Eisessig	10 %(v/v)

5% Sammelgel (~5 mL)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Acrylamid	0,9 mL
Bisacrylamid	0,24mL
Aqua Dest.	5,01 mL
1 M Tris/HCL pH 6,8	0,9 mL
SDS	72 µL
APS	45 µL
TEMED	5 µL

Proteinase K-Lösung mit TritonX-100:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Saccharose	162,5 mM
Proteinase K	340 µg/µL
TritonX-100	0,2% (w/v)

NYT-Lösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
NYT	5 mM

Neutralisationslösung:
(in Aqua Dest.)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Methanol	50 %(v/v)
Glycerin	1 %(v/v)

10% Trenngel (~15 mL)

<u>Bestandteile</u>	<u>Konzentration</u>
Acrylamid	3,75 mL
Bisacrylamid	1 mL
Aqua Dest.	4,05 mL
1,875 M Tris/HCL pH 8,8	6 mL
SDS	150 µL
APS	67,5 µL
TEMED	10,5 µL

Tabelle 3.21: In dem Kapitel 3.12 verwendete Verbrauchsmittel. Angegeben ist der Hersteller des jeweiligen Verbrauchsmittels. Die Liste ist alphabetisch nach den verwendeten Verbrauchsmitteln sortiert.

<u>Verbrauchsmittel</u>	<u>Hersteller</u>
[S35]-Methionin (1000 Ci/mmol)	Perkin-Elmer, Rpdgau-Jürgesheim, DEU
Acrylamid	Serva
Aminosäuren (ohne Methionin)	Promega
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva
Bisacrylamid	Serva
Bromophenolblau	Serva
BSA	NEB
Calciumchlorid	Serva
Digitonin	Calbiochem
DMEM + GlutaMax™	Invitrogen
DTT	Roche
Eisessig	Merck Millipore
FCS	Biochrom AG, Berlin, DEU
Glycerin	Merck Millipore
HEPES	Serva

Tabelle 3.13-2 fortgesetzt:

Verbrauchsmittel	Hersteller
Kaliumacetat	Riedel de Haën, Hannover, DEU
Kaliumchlorid	Merck Millipore
m ⁷ GpppG	Promega
Magnesiumacetat	Merck Millipore
Magnesiumchlorid	Serva
Methanol	Merck Millipore
Nukleotide (ATP,CTP,GTP,UTP)	Amersham Pharmacie Biotech, Freiburg, DEU
NYT	Eigenproduktion AG Richard Zimmermann
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (jetzt GE Healthcare)
PMSF	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Roche
Rabbit Reticulocyte Lysate System ; L4960	Promega
RNasin®	Promega
S7-Nuklease	Roche
Saccharose	Serva
SDS	Serva
T7-Polymerase	Promega
TEMED	Serva
TNT Reticulocyte Lysate System; L4610	Promega
TritonX-100	Serva
Trypsin (0,05 %) in PBS	PAA Laboratories (jetzt GE Healthcare)
Trypsininhibitor	MP Biomedicals, Illkirch, FRA

Tabelle 3.22: In dem Kapitel 3.12 verwendete Gerätschaften. Angegeben ist der jeweilige Hersteller des Geräts. Die Liste ist alphabetisch nach den Herstellern der verwendeten Gerätschaften sortiert.

Geräte	Hersteller
Zentrifuge GS-6-KL (Bactifuge)	Beckmann Coulter Life Sciences
Thermomixer 5320	Eppendorf
Geltrockner	Fröbel Labortechnik
Wipptisch ROCKY	Fröbel Labortechnik
Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare
Fluoreszenz-Laserscanner Typhoon Trio™ 9410	GE Healthcare
ImageQuant™ Software TL 1D Version 5.1	GE Healthcare
Storage Phosphor Screen 20 x 25 cm Platte	GE Healthcare & Molecular Dynamics
Sterilwerkbank	Gelaire Laminar Flow
Zellzähler Countess™ Automated Cell Counter	ThermoFischer Scientific
Image Eraser SF (für Storage Phosphor Screen)	Molecular Dynamics

3.14 Signifikanz

Die Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe von OriginPro 8.5G (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) berechnet. Die zugrundeliegenden Populationen wurden zuerst mit Hilfe des Programms auf eine Normalverteilung untersucht. Der Großteil der Populationen zeigte jedoch keine Normalverteilung weshalb in dieser Arbeit der Mann-Whitney-U-Test verwendet wurde um die Signifikanzniveaus zu berechnen. Signifikanzniveaus: ns = nicht signifikant, * = 0,05, ** = 0,01 und *** = 0,001.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zum Projekt

Das Projekt entstammte einer groß angelegten, siRNA basierter Suche nach neuen potentiellen Regulatoren des Speicher gesteuerten Calciumeinstrom (SOCE). Die Details der durchgeführten Experimente zur Ermittlung solcher Regulatoren sind den Supplements der folgenden Publikation (Sharma et al. 2013) zu entnehmen. Bei der Suche wurden unter anderem diverse potentiell redoxaktive Proteine identifiziert; von denen eines in diesem Projekt genauer charakterisiert werden sollte. Bei einem der neuen potentiellen SOCE-Regulatoren handelte es sich um das Thioredoxin TXNDC15. Zu Beginn des Projekts wurden deswegen verschiedene gegen TXNDC15 gerichtete siRNA's bestellt und mittels qRT-PCR getestet, wobei jene siRNA weiter verwendet wurde, die die beste Herunterregulation von TXNDC15 auf mRNA Level in der qRT-PCR zeigte. Die Sequenzen der getesteten siRNA's entstammten der Publikation von (Sharma et al. 2013). Mit keiner der getesteten siRNA's wurde eine Herunterregulation der TXNDC15 mRNA auf mehr als 40% der mRNA der Kontrolle beobachtet. Ein Nachweis der Herunterregulation auf Proteinebene konnte nicht erbracht werden, da ein funktionierender Antikörper gegen TXNDC15 fehlte. Getaggte Konstrukte standen erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung. Ergebnisse, die mit der siRNA in Jurkat T-Zellen erbracht wurden, sind der **Abbildung 4.1 (A - D)** zu entnehmen. Dabei wurden Experimente zur Untersuchung des ER-Calcium und des „Store operated calcium entry“ (SOCE) durchgeführt. In **Abb. 4.1 (A)** wurde die initiale Speicherentleerung des ER durch Hemmung der SERCA-Pumpe mit Hilfe von Thapsigargin erreicht. Dies führt zu einem sichtbaren Anstieg des zytosolischen Calciums (erster Peak) und einer, zu diesen Zeitpunkt noch nicht sichtbaren, Aktivierung der plasmamembranständigen Orai-Kanäle durch STIM-Proteine. Erst durch Zugabe von extrazellulären Calcium wird die voraus gegangene Aktivierung der Orai-Kanäle sichtbar. Der hierbei beobachtete rapide Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration (zweiter Peak) wird auch als SOCE bezeichnet. Im Vergleich zur Kontrolle ließ sich eine erhöhte Menge an Calcium aus dem ER durch die Behandlung der Zellen mit siRNA gegen TXNDC15 freisetzen. Der darauffolgende SOCE war jedoch im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Da es sich bei TXNDC15 um ein redoxaktives Protein mit unbekannter Funktion handelt, wurden Zellen zusätzlich mit Wasserstoffperoxid

(H₂O₂) vor Thapsigargin (TG) -Gabe perfundiert. Wasserstoffperoxid ist in der Lage IP₃-Rezeptoren direkt zu aktivieren. Hierdurch entstand der in der **Abb. 4.1 (B)** beobachtet zusätzliche Peak vor dem TG-induzierten Peak. Der durch Wasserstoffperoxid induzierte Peak war bei siTXNDC15 behandelten und Kontrollzellen annähernd gleich groß. Durch die Zugabe von Thapsigargin wird der ER-Calciumspeicher nun restlos entleert. Der Thapsigargin induzierte Peak war bei Herunterregulation von TXNDC15 auch bei vorheriger Speicherentleerung durch Wasserstoffperoxid erhöht. Der SOCE der Kontrollzellen fiel jedoch im Vergleich zu den TXNDC15 siRNA behandelten Zellen erniedrigt aus. Dieser Trend ließ sich auch bei CD3⁺/CD28⁺ Bead-stimulierten Zellen wie in **Abb. 4.1 (C)** dargestellt beobachten. Durch die Bead-Stimulation kam es zu einer leichten Erhöhung der initialen Speicherentleerung und dem SOCE. Die Zusammenfassung der Daten sind der **Abb. 4.1 (D)** zu entnehmen.

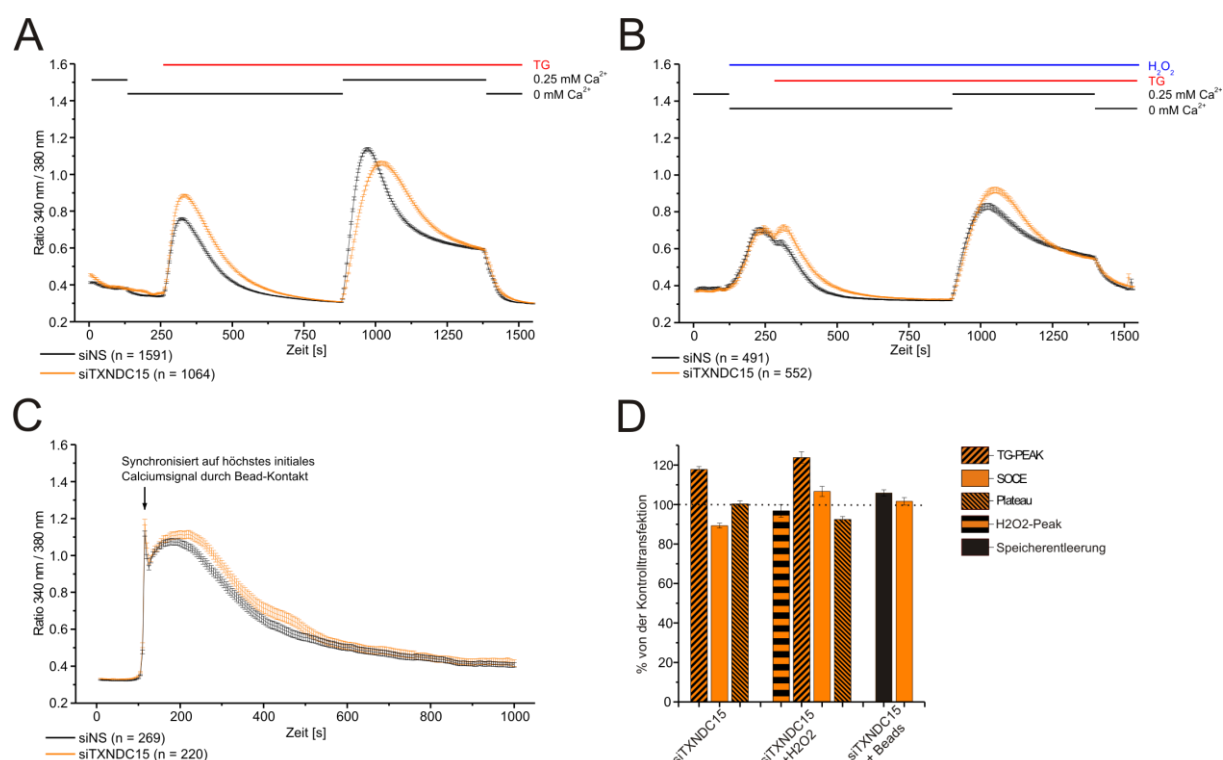


Abbildung 4.1: Der Effekt der gegen TXNDC15 gerichteten siRNA auf Calciumsignale in Jurkat T-Zellen. Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn mit 1,6 μ M siRNA entweder gegen TXNDC15 oder „non silencing“ RNA (nsRNAi) behandelt. In **(A)** ist der Einfluss der siRNA-Behandlung auf das TG-verursachte Calciumsignal in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. In **(B)** wird bei gleichem Versuchsaufbau wie in **(A)** der Effekt bei zusätzlicher H₂O₂-Applikation der Zellen aufgezeigt. Das Applikationsprotokoll der einzelnen Lösungen ist als Linienprofil über den Graphen angegeben. In **(C)** werden die Calciumsignale zwischen den beiden siRNA-behandelten Populationen bei CD3⁺/CD28⁺ Bead-Stimulation gezeigt. Es wurden nur Zellen ausgewertet, die einen einzigen Bead-Kontakt zeigten. Diese wurden dann auf den höchsten initialen Calcium-Peak synchronisiert. Dies war notwendig, da unterschiedlich schnelle Änderungen der Calciumsignale in Zellen nach Bead-Kontakt auftraten. In **(D)** sind die Daten der Abbildungen **(A, B, und C)** zusammengefasst und Änderungen relativ zur jeweiligen Kontrolle in Prozent angegeben. Im Balkendiagramm gibt die horizontal schwarz gestrichelte Linie die 100 %-Marke der jeweiligen Kontrolle an. Die Anzahl der zugrundeliegenden Zellen ist mit „n =“ angegeben und für jede Messreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Angegeben sind stets der Mittelwert und der „standard error of the mean“ (SEM).

Da die siRNA selbst mit der schlechten herunterregulation von TXNDC15 mRNA auf 40 % deutliche Effekte zeigte, wurde versucht eine effizientere siRNA gegen TXNDC15 zu synthetisieren. Hierzu wurde die Zielsequenz der TXNDC15-siRNA mittels NCBI Nucleotid Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) gegen die Datenbank verglichen. So sollte die genaue Position der Sequenz ermittelt werden, gegen die die siRNA gerichtet war. Es stellte sich jedoch heraus, dass die siRNA nicht nur gegen den kodierenden Bereich von TXNDC15 gerichtet war, sondern zusätzlich auch noch eine hohe Sequenzhomologie (84 %) zu einem Bereich in der 5'UTR von TMX4, einer weiteren Thio-reduktase, zeigte. Daraufhin wurden gelagerte qRT-PCR Proben (siTXNDC15 behandelte Jurkat-Zellen) auf eine TMX4-Herunterregulation hin untersucht. Es zeigte sich, dass die siRNA gegen TXNDC15 zusätzlich auch TMX4 effizient herunter reguliert hatte. Weitere potentielle „off-target“ Proteine wurden nicht untersucht. Die zuvor beschriebenen Daten müssen also unter dem Gesichtspunkt eines Doppelknockdown von TMX4 und TXNDC15 betrachtet werden, siehe **Abb. 4.2 (A)**. Um Effekte, die auf TXNDC15 zurückgingen, von jenen, die potentiell TMX4 vermittelt sind, zu trennen, wurden neue TXNDC15 und TMX4 spezifische siRNA-Mixe bestellt und getestet, siehe **Abbildung 4.2 (B)**. Die Endkonzentration der siRNA wurde von 1,6 μ M auf 400 nM reduziert, um potentielle „off-target“ Effekte zu minimieren, aber eine der alten siRNA vergleichbare Effizienz zu gewährleisten.

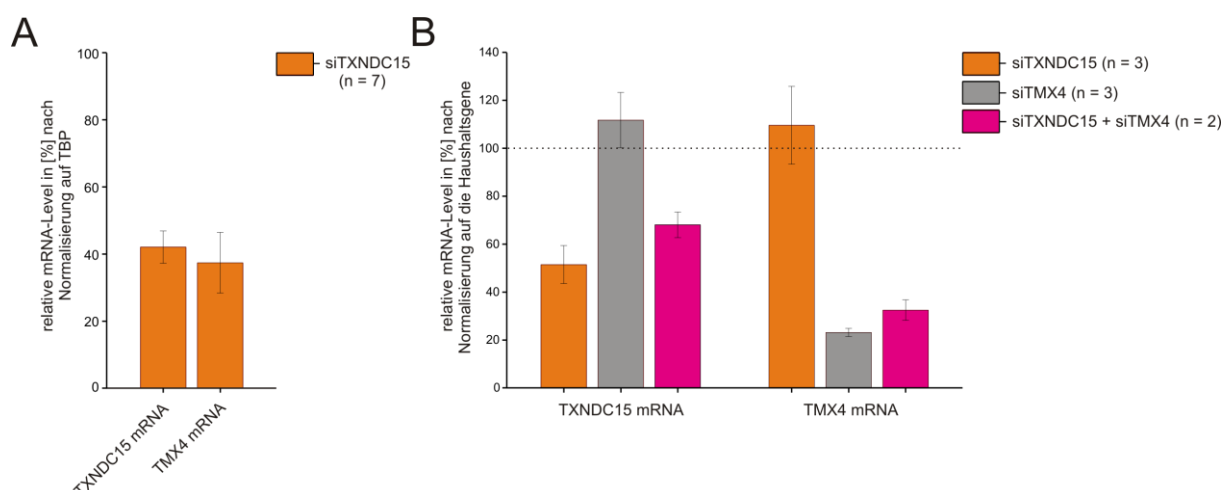


Abbildung 4.2: siRNA vermittelte Herunterregulation der mRNA von TXNDC15 oder TMX4. Jurkat T-Zellen wurden 24 Stunden vor Ernte der Zellen entweder mit 1,6 μ M **(A)** oder 400 nM siRNA **(B)** transfiziert. In **(A)** wurde gezeigt, dass eine Herunterregulation von TXNDC15 mit der ursprünglichen siRNA auch zu einem Knockdown von TMX4 führt. In **(B)** wurden neue siRNA's gegen TMX4 und TXNDC15 auf ihre Spezifität getestet. Ein Doppelknockdown der beiden Gene mit einer Mischung der neuen siRNA's wurde untersucht. Die Ergebnisse der q-PCR wurden auf das Referenzgen TBP oder die beiden Gene TBP & RNAPol normalisiert. Die normalisierten Daten wurden im Anschluss mit den Daten der Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden, verglichen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der Datensätze. Die Anzahl unabhängiger Transfektionen, die den Daten zugrunde liegen, ist mit "n = " angegeben. (Daten erhoben von Gertrud Schwär)

Die neuen siRNA's wurden separat und miteinander kombiniert transfiziert, wobei sich der ursprünglich beobachtete Calciumphänotyp in Jurkat T-Zellen weder im Einzel- noch im Doppelknockdown reproduzieren ließ. Siehe **Abb. 4.3 (A & B)**. Die Calciumfreisetzung durch TG scheint bei dem Doppelknockdown im Vergleich zur Kontrolle eher erniedrigt zu sein und nicht wie durch die alte siRNA erhöht. Der SOCE hingegen blieb bei allen Bedingung weitgehend unverändert.

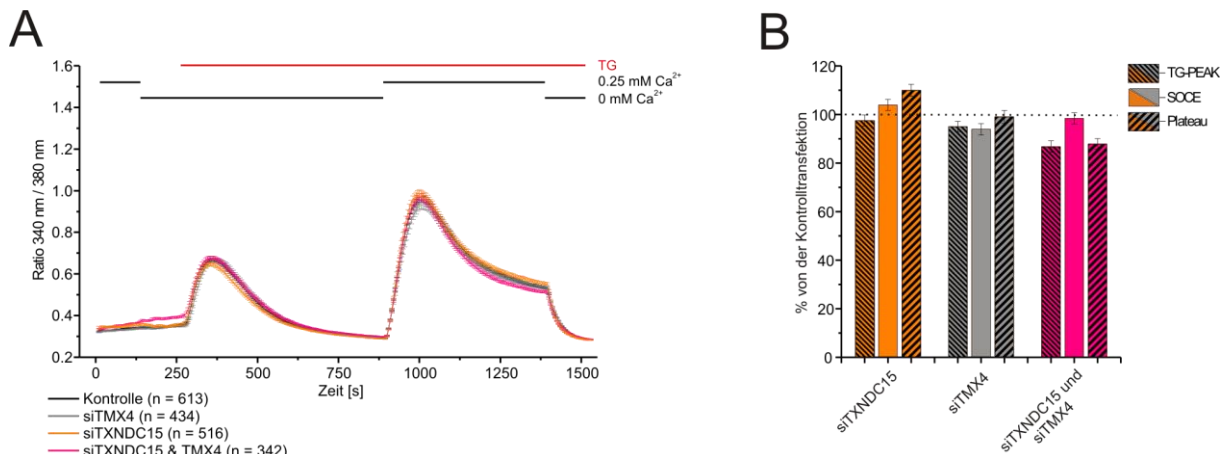


Abbildung 4.3: Der Effekt der siRNA gegen TXNDC15 und TMX4 auf die TG induzierten Calciumsignale in Jurkat T-Zellen. Zellen wurden 24 Stunden vor den Versuchen mit entsprechender siRNA (400 nM) behandelt. In (A) wurde der Einfluss der siRNA-Behandlung auf das Calciumsignal in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. In (B) sind die Daten der Abbildungen (A) zusammengefasst und Änderungen relativ zur jeweiligen Kontrolle in Prozent angegeben. Bei allen Bedingungen wurden nur geringfügige Änderungen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die Anzahl der zugrundeliegenden Zellen wurde mit "n=" angegeben und für jede Messreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Dem Doppelknockdown von TXNDC15 und TMX4 liegen jedoch nur zwei unabhängige Experimente zu Grunde. Die horizontal schwarz gestrichelte Linie gibt die 100 %-Marke der Kontrolle im Balkendiagramm an.

4.2 Nähere Charakterisierung von TXNDC15

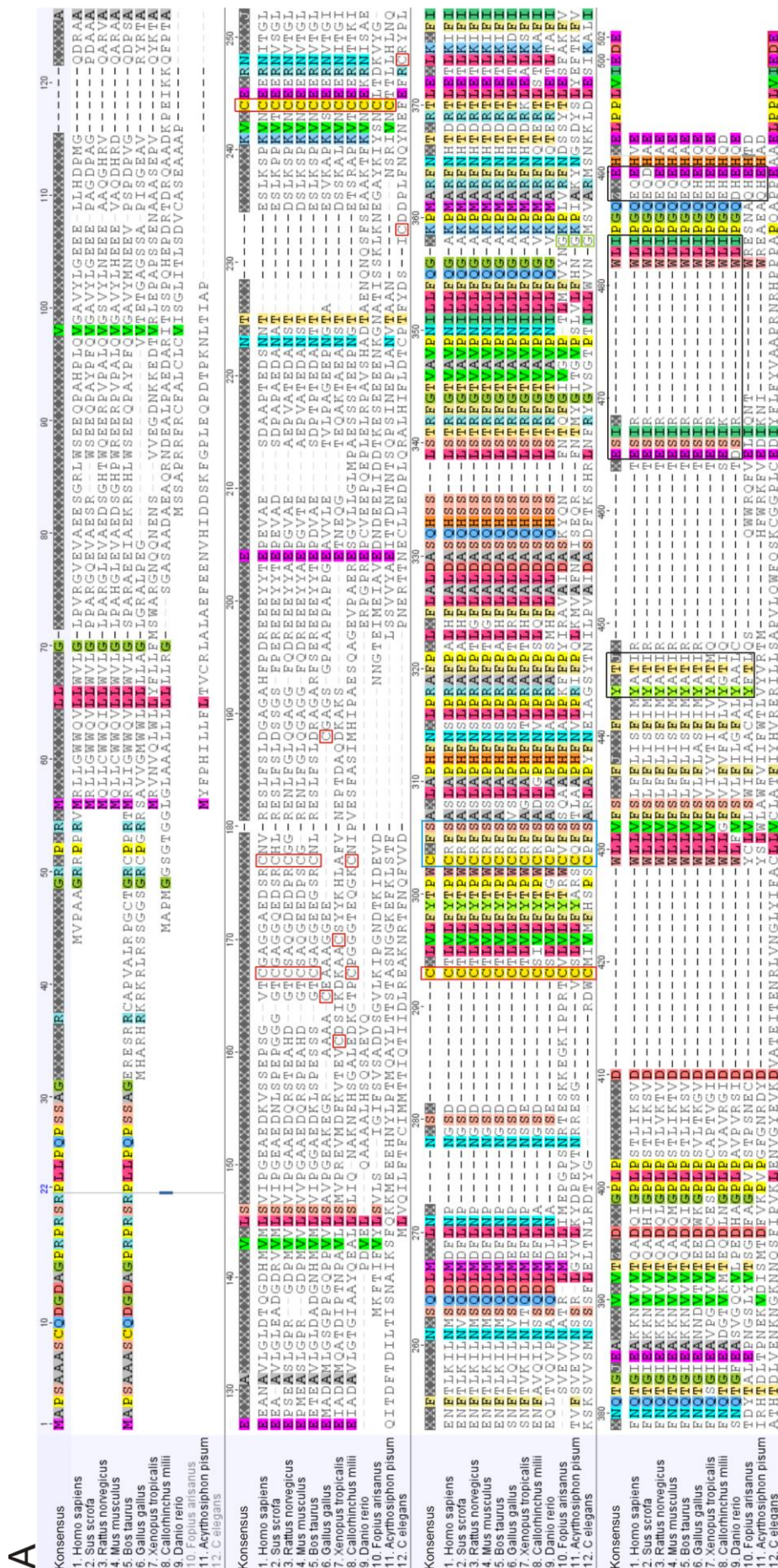
TXNDC15 ist ein bis heute weitgehend unerforschtes Protein und Literatur zu TXNDC15 ist rar. Da es keine experimentellen Ergebnisse zur Struktur von TXNDC15 gibt, wurde daher auf Programme zurückgegriffen, um potentiell wichtige Strukturen der humanen Sequenz zu identifizieren. Die Position des Signalpeptides wurde mit Hilfe der Software SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011) auf die Aminosäuren 1 - 32 bestimmt. Da es sich bei TXNDC15 um ein potentielles Membranprotein handelt, wurde mit Hilfe der Programme TMPred (Hofmann et. al 1993) und TMHMM 2.0 (Krogh et al. 2001) die Lage und Länge einer Transmembrandomäne vorhergesagt. Die Programme sagen eine Transmembrandomäne von Aminosäure 324 bis 342 voraus. Potentielle N-Glykosylierungsstellen wurde mittels NetNGlyc 1.0 Server (Gupta et al. 2004) ermittelt. Es wurden jedoch nur Asparagine (N) im Konsensusmotiv NX[S/T] (S/T = Serin oder Threonin, X = jede Aminosäure außer Prolin) berücksichtigt. Auf diesem Weg, wurden 7 potentielle N-

Glykosylierungsstellen gefunden: N167, N183, N189, N196, N208, N280, N295. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden N189, N196 und N208 glykosyliert, einzig N295 wird mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit glykosyliert. Vermeintliche O-Glykosylierungsstellen wurden mittels dem NetOGlyc 4.0 Server (Steentoft et al. 2013) gesucht. Es wurden Threonin 115 und Serin 256 als potentielle O-Glykosylierungsstellen vorhergesagt.

Versuche, eine 3D-Struktur von TXNDC15 zu erhalten, wurden mit dem I-Tasser Server (Zhang 2008; Roy et al. 2010; Yang et al. 2015; Yang & Zhang 2015) und dem RaptorX Server (Kallberg et al. 2012) unternommen. Eine potentiell zuverlässige 3D-Struktur des gesamten humanen Proteins (ohne Signalpeptid) ließ sich mit den Servern nicht modellieren. Daher wurde TXNDC15 aus verschiedenen Organismen verglichen um Bereiche zu identifizieren, die stark konserviert und eventuell modellierbar sind. Es stellte sich heraus, dass TXNDC15 von Valin 175 bis zum C-Terminus eine starke Konservierung zeigte (**Abb. 4.5 (A)**). Eine Modellierung der Thioredoxindomäne erfolgte von Valin 175 bis Glutamin 310 (**Abb. 4.4**). TXNDC15 zeigte zusätzlich an Position 177 und 210 stark konservierte Cysteine. Bei 8 von 12 untersuchten Arten finden sich zwei zusätzliche Cysteine im N-terminalen Bereich vor der Thioredoxindomäne (**Abb. 4.5 (A)**). Diese sind in einem konstanten Abstand von 8-9 Aminosäuren anzutreffen. Des Weiteren wurden humane Thioredoxine und TXNDC15 verglichen und auf die von (Collet & Messens 2010) beschriebenen stark konservierten Aminosäuren hin untersucht. Da diese Aminosäuren eine wichtige katalytische und strukturelle Funktion für Thioredoxine spielen, wurden diese in **Abb. 4.5 (B & C)** näher betrachtet.

```
MVPAAGRPRPRVMRLLGWWQVLLWVLGLPVRG - (Signalpeptid nicht Modelliert)
YEVAEESGRLWSEEQPAHPLQVGAVYLGEEELLHDPMGQDRAAEEANAVLGLDTQGDHVMVLSVIP
GEADKVSSEPSGVTCGAGGAEDSRCNVRESLFSLDGAGAHFPDREEEYYTEPEVAESDAAPTEDS
NNTESLKSPKVNCEERNITGLENFTLKILNMSQDLMDFLNPNGSDCTLVLFYTPWCRFSASLAPHF
NSLPRAFPALHFLALDASQHSSLSTRFGTVAVPNILLFQGAKPMARFNHTDRTLETCLKIFIFNQTG
IEAKKNVVVTQADQIGPLPSTLIKSVDWLLVFSLFFLISFIMYATIRTESIRWLIPGQE QEHVE
```

Abbildung 4.4: Humane Sequenz verwendet für RaptorX und I-Tasser Modelle des reifen Proteins bzw. der TRX-Domäne: Das Vollängen-Protein wurde versucht von Valin 33 bis zu Glutaminsäure 360 zu modellieren. Da dies nicht gelang, wurde nur die Thioredoxindomäne von Valin 175 bis Glutamin 310 modelliert.



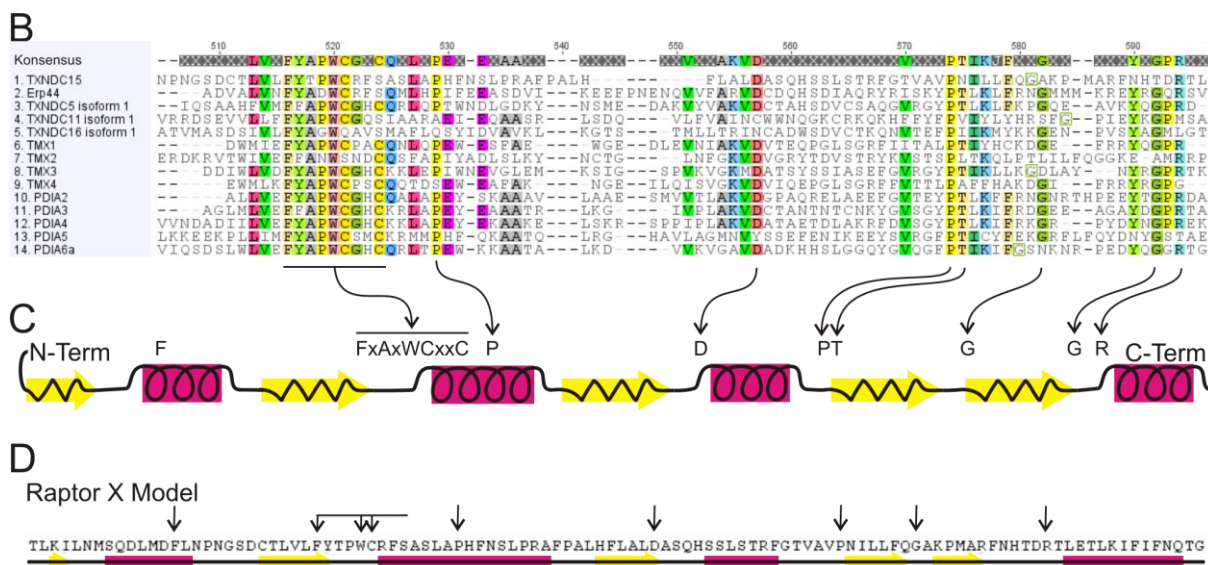


Abbildung 4.5: Alignment von TXNDC15 verschiedener Organismen und verschiedener humaner Thioredoxine. In (A) wurde ein ClustalW-Alignment der angegebenen Organismen mittels der in Geneious 8 eingebetteten „Multiple Align“-Funktion durchgeführt. Der Konsensus der Sequenzen ist oberhalb der Organismen angegeben und zeigt Aminosäuren, die in 75 % der Sequenzen identisch sind. Konservierte und im Text näher betrachtete Cysteine sind in roten Boxen angezeigt. Die blaue Box zeigt das aktive Zentrum und schwarze Boxen drei potentielle lokalisierungsrelevante Motive von TXNDC15. NCBI Reference Sequence: *Homo sapiens* (NP_078991.3), *Sus scrofa* (NP_001230547.1), *Rattus norvegicus* (NP_001020169.1), *Mus musculus* (NP_780359.2), *Bos Taurus* (XP_002689245.1), *Gallus gallus* (XP_414627.3), *Xenopus tropicalis* (XP_002935943.1), *Callorhinchus milii* (XP_007899497.1), *Danio rerio* (NP_001092245.1), *Fopius arisanus* (XP_011301741.1), *Acyrtosiphon pisum* (NP_001156653.1), *Caenorhabditis elegans* (NP_501568.3). In (B) werden einige humane Thioredoxine miteinander verglichen und nach für die Funktion von Thioredoxinen wichtigen und damit stark konservierten Resten geschaut. Die Position der stark konservierten Reste ist in (C) angegeben (modifiziert nach (Collet & Messens 2010)). Das Alignment wurde wie zuvor beschrieben in Geneious 8 durchgeführt. Die Konsensus-Sequenz wird aus Aminosäuren gebildet, die in 50 % der Sequenzen übereinstimmen. TXNDC15 zeigt jedoch einige Besonderheiten im Vergleich mit anderen humanen Thioredoxinen. NCBI Reference Sequence: TXNDC15 (NP_078991.3), Erp44 (NP_055866.1), TXNDC11 Isoform 1 (NP_001290376.1), PDIA2 (NP_006840.2), PDIA3 (NP_005304.3), PDIA4 (NP_004902.1), PDIA5 (NP_006801.1), PDIA6 Isoform a (NP_001269633.1), TMX1 (NP_110382.3), TMX2 (NP_001137484.1), TMX3 (NP_061895.3), TMX4 (NP_066979.2), TXNDC5 Isoform 1 (NP_110437.2), TXNDC16 Isoform 1 (NP_065835.2). (D) zeigt die Sekundärstruktur des RaptorX-Modells und Pfeile markieren die für Thioredoxine konservierten Reste in TXNDC15. Gelbe Pfeile stehen stellvertretend für β -Faltblätter und rote Boxen für α -Helices.

Um die Qualität der Proteinstrukturmodelle evaluieren zu können, wurden diese einerseits mit dem Qmean Server (Benkert et al. 2008; Benkert, Künzli, et al. 2009; Benkert, Schwede, et al. 2009; Benkert et al. 2011) und mit konservierten Struktureigenschaften bekannter Röntgenkristallstrukturen anderer Thioredoxine verglichen. I-Tasser selbst gibt die Qualität der Modelle in 2 verschiedenen Scores an. Der C-Score geht von [-5 bis 2] wobei ein höherer C-Score für ein besseres Modell steht. Ab einem C-Score von -1.5 kann von einem Modell mit korrekter globaler Topologie ausgegangen werden. Ein TM-Score von > 0.5 spricht ebenfalls für ein Modell mit korrekter Topologie. Da das I-Tasser Modell des volllängen TXNDC15 einen C-Score von -3.17 und ein TM-score von 0.36 ± 0.12 hatte, was für ein Modell von schlechter Qualität sprach, wurde dieses Modell nicht näher betrachtet. I-Tasser gelang es nicht, ein Alignment mit bekannten Strukturen der Protein Datenbank (PDB) außerhalb des Bereichs der TRX-Domäne durchzuführen.

Das I-Tasser Model der TRX-Domäne hingegen hatte einen C-Score von -1,00 und einen TM-Score von 0.56 +/- 0.14, wobei die drei besten Vorlagen für das Modell die Maus PDIA6 (PDB ID: 2DML), die humane PDIA6 (PDB ID: 1X5D) und die Hefe PDI (PDB ID: 2B5E) lieferten. Für das I-Tasser Model wurden mittels TM-align (eine Teilfunktion des I-Tasser Server) die Maus PDIA6 (PDB ID: 2DML), Maus ERdj5 (PDB ID: 3APQ) und Hefe PDI (PDB ID: 2B5E) als die besten drei analogen nativen Strukturen der Protein Datenbank identifiziert. Für das RaptorX Model wurde mittels COFACTOR (Roy et al. 2012) die humane PDIA6 (PDB ID: 1X5D), die Hefen Oxidoreduktase Mpd1p (PDB ID: 3ED3) und das Maus ERj5 Protein (PDB ID: 3APO) als Top drei analoge native Proteine aus der PDB identifiziert.

In **Abb. 4.6 (A)** sind die beiden Modelle (I-Tasser vs. RaptorX) der TRX-Domäne von TXNDC15 aus zwei Ansichten abgebildet. Insgesamt modellieren beide Programme die TRX-Domäne aus fünf β -Faltblatt und vier α -Helices. Das I-Tasser Model der TRX-Domäne schnitt bei Qmean mit einem globalen Score von 0,558 im Vergleich schlechter ab als das RaptorX-Model mit einem globalen Score von 0,794. Der globale Qmean-Score gibt die Zuverlässigkeit des Modells von 0 bis 1 an, wobei ein höherer Wert für ein zuverlässigeres Modell steht. Der von Qmean berechnete Fehler des Modells (in Angstrom) ist in **Abb. 4.6 (B)** einmal als Graph und einmal als farbkodiertes 3D-Modell abgebildet. In **Abb. 4.6 (C)** sind die Qmean Einzelwertungen aufgelistet, aus denen sich der globale Qmean Score berechnet. Das RaptorX Modell schließt bei Qmean bei allen Wertungen außer „solvation“ besser als das I-Tasser Modell ab.

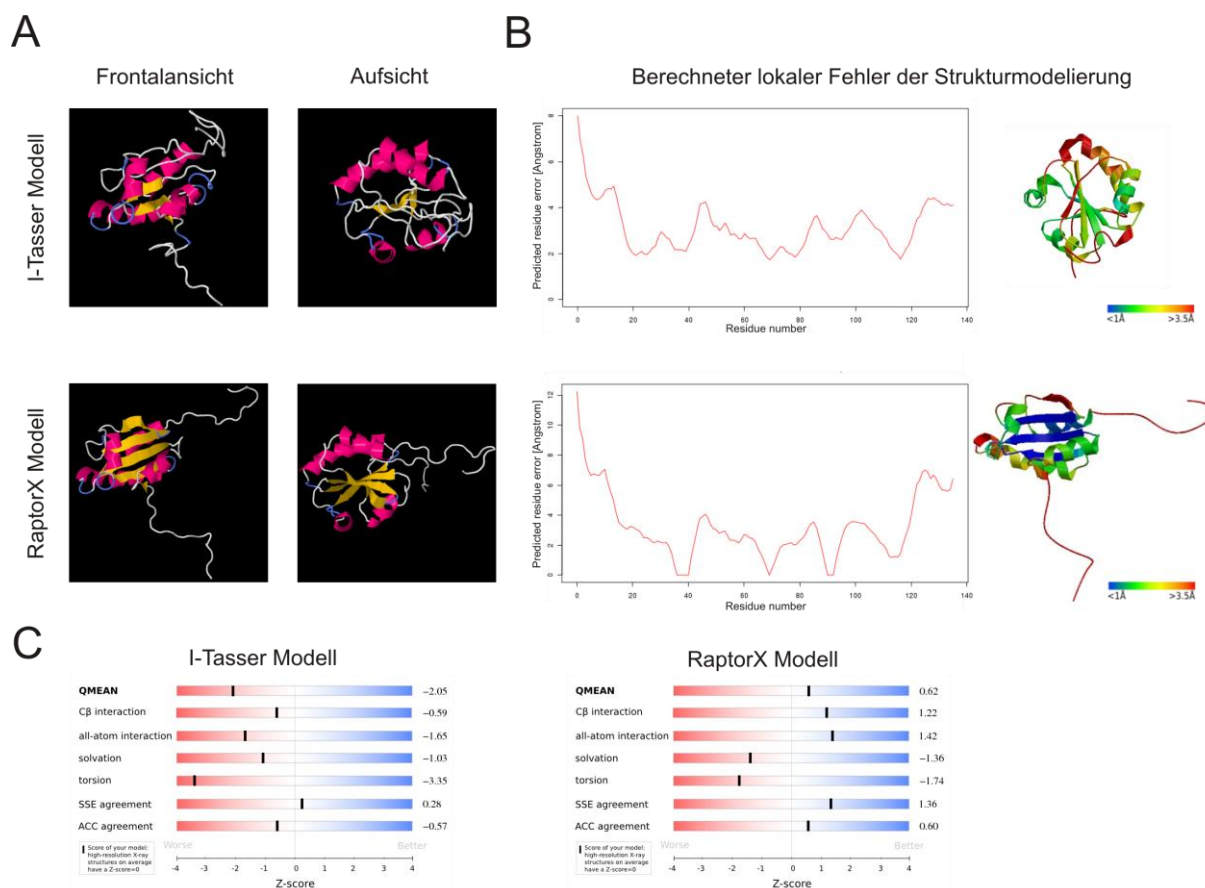


Abbildung 4.6: Modellierung der Thioredoxindomäne mittels I-Tasser und RaptorX. Die Modelle beziehen sich auf die Aminosäuren zwischen Valin 175 und und Glutamin 310 (Insgesamt 136 AS) der humanen Sequenz. **(A)** zeigt die beiden Modelle aus jeweils zwei Ansichten. Die Modelle wurden aus Jmol (<http://jmol.sourceforge.net/>) als JPEG exportiert. In **(B)** ist der mittels QMEAN berechnete lokale Fehler in Angstrom als Graph der beiden Modelle angegeben. Zusätzlich ist das entsprechende farbkodierte Modell rechts vom Graph angegeben. Die Farbe entspricht dem berechneten Fehler mit entsprechender Legende unterhalb der Figur. Die Qualität des Modells wird in **(C)** näher betrachtet. Für das RaptorX-Modell wurde ein globaler QMEAN-Score (Zuverlässigkeit des Modells von 0 - 1) von 0.794 und für das I-Tasser Modell ein globaler QMEAN-Score von 0.558 berechnet, der sich aus den einzelnen Z-Scores zusammensetzt. Die Z-Scores sind so normiert, dass der Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 beträgt. Der QMEAN Z-Score gibt eine Schätzung für die Qualität des Modells wieder, indem er das Modell mit experimentell belegten Referenzstrukturen ungefähr gleich großer Proteine (Model +/- 10%) vergleicht. Damit gibt er an, wie viele Standardabweichungen das evaluierte Modell von erwarteten Werten für experimentell belegte Proteinstrukturen abweicht. Die Werte wie „C β interaction“ und „all-atom-interaction“ beziehen sich auf spezifische Interaktionspotentiale der Sekundärstrukturen, „Torsion“ auf das Torsionspotential über 3 aufeinanderfolgende Aminosäuren hinweg und „solvation“ auf die Neigung einer bestimmten Aminosäure exponiert zu sein. „SSE_agree“ gibt die Übereinstimmung der vorhergesagten Sekundärstruktur von PSIPRED mit der durch DSSP berechneten Struktur des Modells wieder, und ACC_agree die Übereinstimmung der vorhergesagten relativen Lösungsmittelzugänglichkeit zwischen ACCpro und DSSP. Die Beschreibung der einzelnen Werte ist eine kurze Zusammenfassung der QMEAN Server Quick Help Funktion (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi?page=help>). Die Abbildungen **(B)** und **(C)** sind mit QMEAN erstellt worden.

Die membranständigen TMX1 - 4 und TXNDC15 unterscheiden sich im Wesentlichen im Mechanismus der ER-Retention durch ihre cytosolischen C-Termini von denen der luminalen ER-Proteine. Luminalen ER-Proteine werden nach Verlassen des ER's durch die Bindung an einen KDEL-Rezeptor zurück ins ER gebracht, vorausgesetzt sie tragen ein KDEL-Motiv oder eine Variante hiervon (Raykhel et al. 2007). Die membrangebundenen Proteine können direkt mit COP1 mittels Ihrer KKXX oder RXR Motive interagieren (Barlowe & Helenius 2016). Eine Auflistung der Motive der verschiedenen näher betrachteten Thioredoxine findet sich in **Abb. 4.7**.

Für TXNDC11 und TXNDC15 finden sich keine klassischen ER-Retentionsmotive im C-Term.

	1										10				15
Konsensus	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	K	X	X	L
1. TXNDC15	S	I	R	W	L	I	P	G	Q	E	Q	E	H	V	E
2. Erp44	P	S	E	Y	R	Y	T	L	L	R	D	R	D	E	L
3. PDIA2	P	E	P	P	A	N	S	T	M	G	S	K	E	E	L
4. PDIA3	Q	E	E	K	P	K	K	K	K	K	A	Q	E	D	L
5. PDIA4	I	E	E	H	A	T	K	L	S	R	T	K	E	E	L
6. PDIA5	R	E	G	D	H	E	R	L	G	K	K	K	E	E	L
7. PDIA6a	D	L	S	D	V	E	L	D	D	L	G	K	D	E	L
8. TMX1	I	R	Q	R	S	L	G	P	S	L	A	T	D	K	S
9. TMX2	S	T	P	T	T	V	S	D	G	E	N	K	K	D	K
10. TMX3	P	T	V	Q	E	P	K	D	V	L	E	K	K	K	D
11. TMX4	D	S	L	R	Q	R	K	S	Q	H	A	D	K	G	L
12. TXNDC5 isoform 1	D	S	L	H	R	F	V	L	S	Q	A	K	D	E	L
13. TXNDC11 isoform 1	S	A	T	L	V	S	E	R	N	K	E	N	R	T	D
14. TXNDC16 isoform 1	K	S	F	R	R	D	K	E	L	G	C	S	K	V	N

Abbildung 4.7: Alignment der 15 C-terminalen Aminosäuren verschiedener humaner Thioredoxine. Mit den Ausnahmen von TMX1 - 4 und TXNDC15 handelt es sich bei den anderen Thioredoxinen um lösliche ER-Proteine. Die membranständigen TMX1 - 4 und TXNDC15 unterscheiden sich durch Ihre cytosolischen C-Termini, welche lokalisationsrelevante Motive tragen können. Für die Thioredoxine wurden verschiedene ER-Retentionsmotive markiert. Für luminal ER-Proteine handelt es sich hierbei um KDEL-Motive, welche durch schwarze Boxen hervorgehoben wurden und bei Transmembranproteinen um die KKXX- (rote Boxen) oder den RXR-Motive (blaue Boxen). In TXNDC11 und TXNDC15 finden sich keine der klassischen Motive im C-Terminus.

4.3 Versuche zur Überexpression von TXNDC15

Eine Überexpression von getaggttem TXNDC15 sollte Einsicht über die Funktion und die Lokalisation des Proteins geben. Hierfür wurden ein C-terminal getaggttes GFP TXNDC15-Konstrukt, sowie nach dem Signalpeptid inserierte N-terminal getaggte mCherry- und HA-Konstrukte sowie ein TXNDC15 IRES GFP Konstrukt kloniert. All diese Konstrukte basieren auf dem pMax-GFP Vektor. Die ersten Versuche erfolgten mit dem TXNDC15-GFP Konstrukt und hierbei wurde eine drastische Inhibition der TG-induzierten Speicherentleerung (um ca. 50 %) sowie des SOCE (um ca. 60 %) beobachtet (**Abb. 4.9 (A, H & I)**). Da ein Protein-Tag die Biologie des Proteins verändern kann, war dies Anlass für die Klonierung von N-terminal getaggtten sowie IRES-GFP-Konstrukten, um die beobachteten Phänotypen zwischen den Konstrukten vergleichen zu können. In den folgenden Experimenten wurde das C-terminal getaggte TXNDC15-GFP-Konstrukt stets mit dem ungetaggtten TXNDC15-IRES-GFP-Konstrukt verglichen. So konnten transfizierte Zellen identifiziert werden ohne TXNDC15 über einen Tag in seiner Funktion bzw. Struktur zu stören. Versuche zur Überexpression mit dem IRES-GFP-Konstrukt zeigten keinen Effekt auf die TG induzierte Speicherentleerung, lediglich der SOCE war durch die Überexpression ca. 10 % im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert (**Abb. 4.9 (B, H & I)**). Aus diesen Experimenten ließ sich vermuten, dass eine Mislokalisierung oder eine veränderte Funktion des GFP-Fusionsproteins die signifikante Reduktion des SOCE verursacht. Um zu untersuchen, ob die katalytische Thioredoxindomäne für den Phänotyp des GFP-Fusionsproteins mitverantwortlich ist, wurde zunächst das potentiell aktive Cystein der TRX-Domäne (C220) zu Serin mutiert. In einer weiteren Mutante wurden 2 stark konservierte Cysteine mit unbekannter Funktion (C114 & C210) zu Serin mutiert. Diese Mutationen wurden sowohl im C-terminalen GFP-Fusionsprotein als auch im IRES-GFP-Konstruktes eingebracht. Siehe **Abb. 4.8** für die Position der Cysteine innerhalb der humanen TXNDC15-Sequenz.

MVPAAGRPRPRVMRLLGWWQVLLWVLGLPVRG - (Signalpeptid)

VEVAEESGRLWSEEQPAHPLQVGAVYLGEEELLHDPMGQDRAAEEANAVLGLDTQGDHVMVLSVIP
 GEAEKVSSEPSGVT **C**GAGGAEDSRCNVRESLFLSLDGAGAHFPDREEEYYTEPEVAESDAAPTEDS
 NNTESLKSPKVNCEERNITGLENFTLKLILNMSQDLMDFLNPNNGSD **C**TLVLFYTPW **C**RFASASLAPHF
 NSLPRAFPALHFLALDASQHSSLSTRFGTVAVPNILLFQGAKPMAFNFHTDRTLETLETKIFIFNQTG
 IEAKKNVVVTQADQIGPLPSTLIKSVDWLLVFSLFFLISFIMYATIRTESIRWLIPGQE QEHVE

Abbildung 4.8: Lokalisation der mutierten Cysteine in TXNDC15. **C:** Cystein 220 ist das Cystein des aktiven Zentrums. **C:** Cystein 210 liegt in der TRX-Domäne vor dem aktiven Zentrum und ist in allen in dieser Arbeit betrachteten Spezies stark konserviert. Es kann jedoch aufgrund seiner modellierten Position nicht mit dem aktiven Cystein interagieren. **C:** Cystein 114 scheint zusammen mit Cystein 124 in höheren Lebewesen konserviert zu sein, jedoch ist über dessen Funktion nichts bekannt. Der unterstrichene Bereich zeigt die Thio-redoxindomäne von TXNDC15 an.

Im C-terminal GFP getaggtten Konstrukt zeigte die alleinige Mutation des Cysteins 220 keine Unterschiede in Bezug auf die TG-induzierte Speicherentleerung, jedoch kam es durch diese Mutation zu einer Erholung des SOCE um 10 % im Vergleich zum WT-GFP-Konstrukt (**Abb. 4.9 (C, H & I)**). Im IRES-GFP-Konstrukt trat durch die C220S Mutation eine Erniedrigung der TG-induzierte Speicherentleerung von ca. 20 % auf. Der SOCE wies keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT-IRES-GFP-Konstrukt auf (**Abb. 4.9 (D, H & I)**). Eine Expression der direkt getaggtten GFP-Doppelmutante (C114S & C210S) zeigte im Vergleich zum direkt getaggtten WT-Konstrukt eine Erhöhung der Speicherentleerung von ca. 10 % und des SOCE von ca. 30 % (**Abb. 4.9 (E, H & I)**). Im IRES GFP Konstrukt führten die Mutationen sowohl zu einer leichten Erhöhung (< 10 %) der Speicherentleerung und des SOCE im Vergleich zum WT-IRES-GFP-Konstrukt (**Abb. 4.9 (F, H & I)**). Eine Deletion der katalytischen Domäne in dem C-terminal getaggtten TXNDC15-Konstrukt führte zu einer fast vollständigen Regeneration der Speicherentleerung und des SOCE (**Abb. 4.9 (G & I)**). Die Mutation des potentiellen aktiven Cystein (C220) und anderer stark konservierter Cysteine mit unbekannter Funktion (wie z.B. regulatorischer oder struktureller Natur) ändern an dem toxischen Effekt des GFP-Fusionsprotein nur wenig (≤ 30 % Erholung in Richtung der Kontrolltransfektion). Ein Verlust der Thio-redoxindomäne im GFP-Fusionsprotein hingegen führte zu einer deutlichen Verminderung des toxischen Effekt für T-Zellen und verdeutlicht dadurch eine Beteiligung der N-terminalen Domäne an diesem toxischen-Phänotyp.

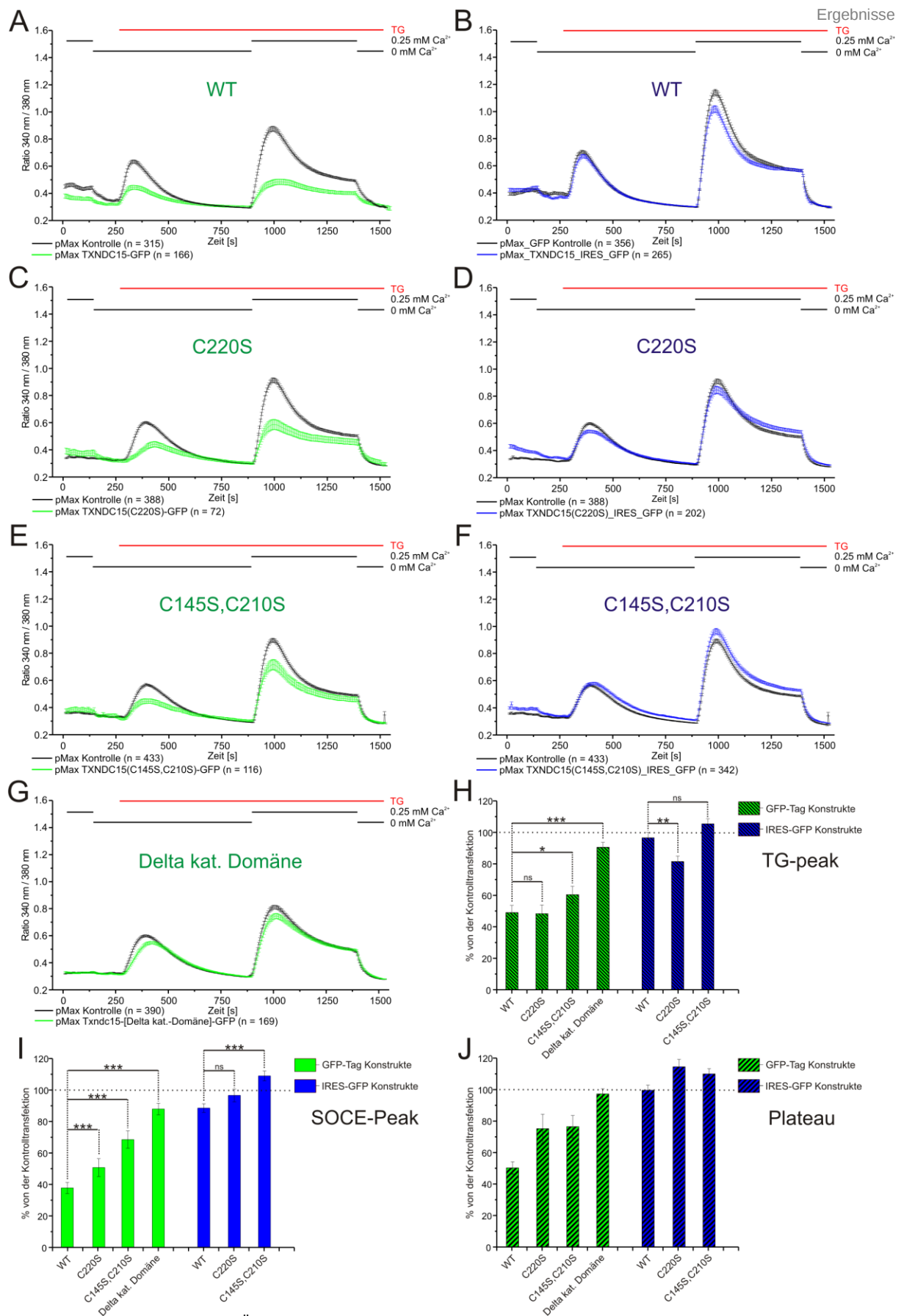


Abbildung 4.9: Der Einfluss der Überexpression von TXNDC15 auf Calciumsignale in Jurkat T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden 24 Stunden vor den Versuchen mit 1 µg der jeweiligen DNA transfiziert. Die Abbildungen (A – I) zeigen die Änderungen des Calcium-sensitiven Fura-2 Signals in Abhängigkeit der Zeit. Das Linienprofil über den Graphen gibt das Applikationsprotokoll der Lösungen an. In (A, C, E & G) ist der Einfluss der Konstrukte mit C-terminalen GFP und in (B, D & F) mit IRES GFP abgebildet. In (A & B) sind der Wildtyp, in (B & C) die C220S Mutante und in (D & E) die Doppelmutante C145S & C210S mit C-terminalen Tag bzw. als IRES-GFP-Konstrukt im direkten Vergleich zur Kontrolle aufgetragen. In (F) ist eine Mutante der der katalytische N-Terminus deletiert wurde überexpremiert. Änderungen relativ zur jeweiligen Kontrolle in Prozent angegeben. (H) fasst die TG-Peaks (I) die SOCE-Peaks und (J) die Plateaus aller Konstrukte, nach der Normalisierung auf die jeweilige Kontrolle, zusammen. Die Anzahl der zugrundeliegenden Zellen ist mit „n =“ angegeben und für jede Messreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Das Signifikanzniveau des Mann-Whitney-U-Test ist zwischen zwei Proben mit „ns“ = nicht signifikant; * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001 in den Graphen angegeben. Die horizontal schwarz gestrichelte Linie gibt 100 % der jeweiligen Kontrolle im Balkendiagramm an. Fehlerbalken zeigen den SEM einer Messreihe an.

Die Überexpression der N-terminal getaggten mCherry-Konstrukte führte in Jurkat T-Zellen zu einer Erniedrigung der Speichentleerung um ca. 30 % und des SOCE um ca. 20 % im Vergleich zu den Kontrollzellen (**Abb. 4.10 (A & C)**). Die Deletion des C-Terminus führte im mCherry-Konstrukt zur einer Regeneration der Speicherentleerung, änderte jedoch nichts an der Erniedrigung des SOCE im Vergleich zum WT-Konstrukt (**Abb. 4.10 (B & C)**). Diese Ergebnisse sprechen für eine stark veränderte Funktion oder Lokalisation des C-Terminus getaggten GFP-Konstrukt, im Vergleich zu den mCherry- oder IRES-GFP-Konstrukten. Zusammen zeigen jedoch alle WT-Konstrukte in der Überexpression einen verringerten SOCE (um 60 % für das GFP-Konstrukt, 20 % für das mCherry- oder 10 % für das IRES-GFP-Konstrukt) im Vergleich zu den Kontrolltransfektion.

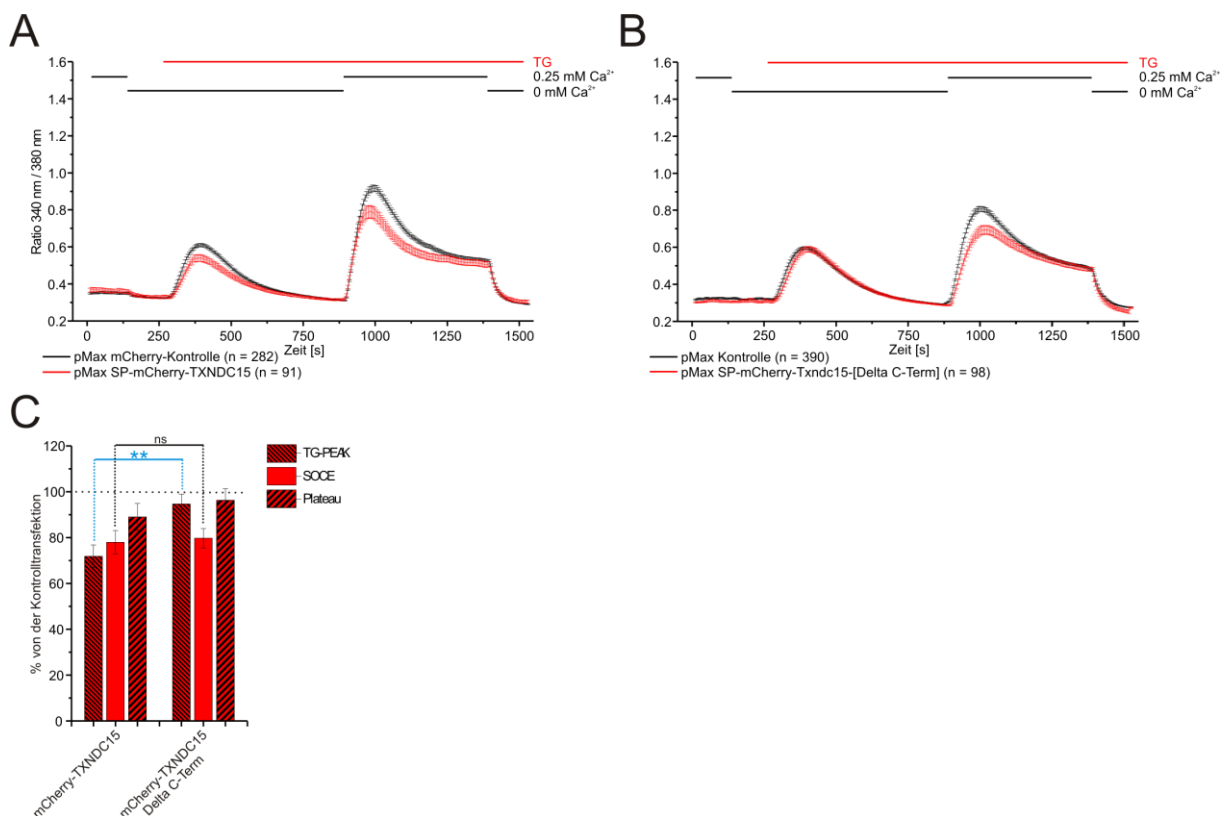


Abbildung 4.10: Der Einfluss der Überexpression von TXNDC15 auf Calciumsignale in Jurkat T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden 24 Stunden vor den Versuchen mit 1 μg der jeweiligen DNA transfiziert. Die Abbildungen (A & B) zeigen die Änderungen des Calcium-sensitiven Fura-2 Signals in Abhängigkeit der Zeit. Das Linienprofil über den Graphen gibt das Applikationsprotokoll der Lösungen an. In (A) ist der Einfluss der WT-Konstrukte mit N-terminalen mCherry und in (B) das N-terminale getaggte mCherry-Konstrukt mit der Deletion des C-Term von TXNDC15 gezeigt. In (C) sind die Daten der Abbildungen (A & B) zusammengefasst und Änderungen relativ zur jeweiligen Kontrolle in Prozent angegeben. Die Anzahl der zugrundeliegenden Zellen ist mit „n = “ angegeben und für jede Messreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Das Signifikanzniveau des Mann-Whitney-U-Test ist zwischen zwei Proben mit „ns“ = nicht signifikant; * = 0,05; ** = 0,01; *** = 0,001 in den Graphen angegeben. Hellblaue Linien vergleichen den TG-Peak und schwarze Linien den SOCE zweier Proben im Mann-Whitney U-Test miteinander. Die horizontal schwarz gestrichelte Linie gibt 100 % der jeweiligen Kontrolle im Balkendiagramm an. Fehlerbalken zeigen den SEM einer Messreihe an.

Um potentielle Effekte, die eventuell erst unter oxidativen Bedingung auftreten, sichtbar zu machen, wurden Zellen bei Überexpression von TXNDC15 während des Calcium Imaging zusätzlich mit Wasserstoffperoxid perfundiert (siehe Analogen Versuch im **Kapitel 4.1**). Im Falle einer Überexpression von ungetaggttem TXNDC15 wurden jedoch keine wesentlichen Unterschiede im SOCE im Vergleich zur Kontrolle nach der Behandlung mit Wasserstoffperoxid festgestellt (**Abb. 4.11 (A & B)**). Ein Verringerung des SOCE durch die TXNDC15-Überexpression, wie sie zuvor ohne Wasserstoffperoxid bei allen WT-Konstrukten beobachtet wurde, ließ sich hier nicht erkennen. Da diese Diskrepanz durch eine Wasserstoffperoxidbehandlung verschwand, könnte dies auf einen veränderten Redoxzustand von Orai1 in TXNDC15 überexpremierenden Zellen hindeuten.

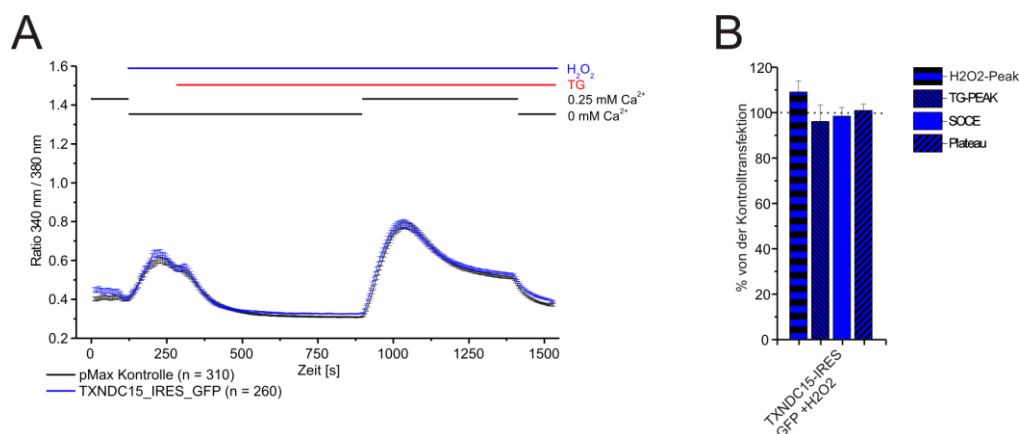


Abbildung 4.11: Der Einfluss der Überexpression von TXNDC15 und H₂O₂ auf Calciumsignale in Jurkat T-Zellen. Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn mit 1 µg des pMax-TXNDC15-IRES-GFP- oder pMax-GFP-Vektors (Kontrolle) transfiziert. In **(A)** ist die Änderung des Calciumsignals in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Die Applikation der Lösungen sind als Linienprofil über den Graphen angegeben. In **(B)** sind die Daten der Abbildungen **(A)** zusammengefasst und Änderungen relativ zur Kontrolle in Prozent angegeben. Im Balkendiagramm gibt die horizontal schwarz gestrichelte Linie 100 % der Kontrolle an. Die Anzahl der zugrundeliegenden Zellen ist mit „n =“ angegeben, für jede Messreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und Fehlerbalken geben den SEM an.

Viele Thioredoxine sind ER-residente Proteine. Daher sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob sich eine Hochregulation von TXNDC15 durch die Verursachung von ER-Stress beobachten lässt. Zum anderen sollte der ER-Stress in TXNDC15-GFP exprimierenden Zellen näher untersucht werden. Dies sollte Aufschluss über die zuvor beobachtete Reduktion des SOCE durch das C-terminal getaggte GFP-Konstrukt geben. Hierzu wurden die Mengen an mRNA von GRP78 (einem ER-Chaperon und Stressmarker) in ungestressten mit denen von TXNDC15 überexpremierenden Zellen verglichen. Eine Überexpression von ungetaggttem TXNDC15 (pMax TXNDC15 IRES GFP) oder dem „pMax-GFP“ Leervektor hat

keinen ER-Stress (gemessen an der GRP78 Expression) zur Folge (**Abb. 4.12 (A)**). Auch ließ sich keine Hochregulation der TXNDC15-mRNA durch die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin oder Thapsigargin nach 4 Stunden beobachten (**Abb. 4.12 (A)**). GRP78 zeigte hingegen bei gleicher Behandlung eine deutliche Hochregulation auf mRNA-Ebene (**Abb. 4.12 (B)**). Eine Überexpression von TXNDC15-IRES-GFP-Konstruktes hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Hochregulation von GRP78 nach Thapsigargin- oder Tunicamycingabe. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung von TXNDC15 an der Regulation des ER-Stresses wie der „Unfolded Protein Response“ (UPR). Hingegen verursachte eine Überexpression des direkt C-terminal getaggten TXNDC15-GFP-Konstruktes in Jurkat E6-1 Zellen eine Hochregulation von GRP78 um das Zweifache des Ausgangswerts, jedoch deutlich unter den Werten, die mit Thapsigargin oder Tunicamycin erreicht wurden (**Abb. 4.12 (D)**). Eine Expression des Kontrollvektors (**Abb. 4.12 (D)**) oder des TXNDC15-IRES-GFP-Konstrukts (**Abb. 4.12 (B)**) hatten hingegen keinen ER-Stress zur Folge. Auch wenn der Versuch zur ER-Stressinduktion durch die Expression des TXNDC15-GFP-Konstrukts auf qRT-PCR-Ebene nur einmal durchgeführt wurde, gingen aus den Expressionsniveaus von TXNDC15 aus unbehandelten Zellen (**Abb. 4.12 (C)**) sowie von GRP78 aus pMax-GFP-Zellen (**Abb. 4.12 (D)**) ähnliche Werte hervor wie in den vergleichbaren Kontrollzellen aus Versuchen zur ER-Stressinduktion mittels Tunicamycin und Thapsigargin (**Abb. 4.12 (A & B)**). Zu den in (**Abb. 4.12 (C & D)**) dargestellten Werten lässt sich aufgrund der fehlenden Wiederholungen jedoch keine Statistik berechnen. Das Zusammenführen der Populationen von drei Transfektion wurde durch die geringe Ausbeute an TXNDC15-GFP exprimierenden Jurkat-Zellen (5% GFP-positiv) notwendig im Vergleich zur Kontrolltransfektion (80% GFP-positiv) (**Abb. 4.3-3 (E)**).

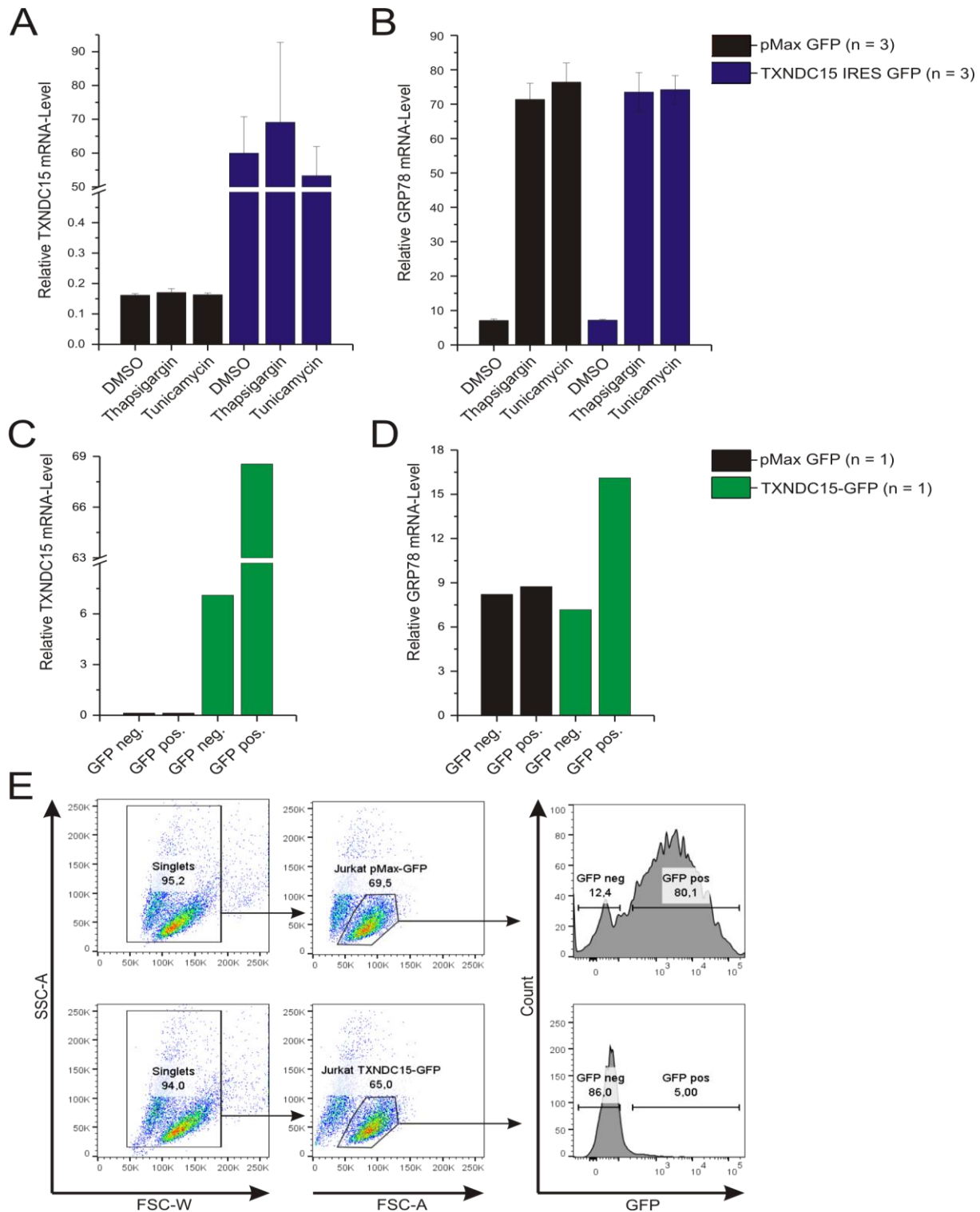


Abbildung 4.12: Der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Expression von GRP78- und TXNDC15-mRNA. Jurkat E6-1 Zellen wurden 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn mit 1 µg des pMax-TXNDC15-IRES-GFP-, pMax-GFP-TXNDC15-, oder pMax-GFP-Vektors (Kontrolle) transfiziert. Zellen wurden entweder mit Tunicamycin, Thapsigargin oder mit gleichen Volumen DMSO behandelt. Die DMSO-behandelte Population diente als Kontrolle. **(A)** zeigte eine unveränderte Expression von TXNDC15 nach ER-Stressstimulation via Thapsigargin oder Tunicamycin. Im selben Versuch wurde hier auch der Erfolg einer Überexpression von TXNDC15 in den entsprechenden Zellen kontrolliert. In **(B)** wurde die Hochregulation von GRP78 Expression, einem ER-Stressmarker, als Folge der Tunicamycin- oder Thapsigarginbehandlung beobachtet. Angegeben ist der Mittelwert und SEM. Für Daten in **(C)** und **(D)** wurden die Jurkat-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit einem FACS entsprechend ihrer Fluoreszenz im FITC-Kanal sortiert **(E)**. Mit dem FACS wurden zuerst Dubletten ausgeschlossen und im Anschluss lebende Zellen ausgewählt unter Zuhilfenahme der FSC-Werte vs. dem SSC-Wert. Die so gewählten Zellen wurden dann anhand ihres GFP-Fluoreszenzsignals im FITC-Kanal in eine GFP-positive und GFP-negative Population getrennt. Die Zellen aus drei Transfektionen wurden nach dem FACS gestütztem Sortieren zusammengelegt, um eine ausreichende Menge an mRNA für die qRT-PCR zu erhalten, daher ist n = 1. **(C)** zeigt die Expression von TXNDC15 und **(D)** die Expression von GRP78 in verschiedenen Populationen.

4.4 Glykosylierung von TXNDC15

Es wurden zwei unterschiedliche HA-Konstrukte und mCherry-Konstrukte zur Untersuchung der Synthese, Glykosylierung und der potentiellen Degradation untersucht. Die Konstrukte unterscheiden sich geringfügig in der Position des Tags und der Verwendung kurzer Linkersequenzen zwischen Tag und Protein. In das HA-TXNDC15-Konstrukt wurde direkt nach der potentiellen Signalpeptidschnittstelle der HA-Tag kloniert und enthält keinen Linker. Das HA-TXNDC15-Konstrukt mit Linker wurde von Lars Ellgaard zur Verfügung gestellt und besitzt einen HA-Tag, der fünf Aminosäuren nach der Signalpeptidschnittstelle eingefügt ist (siehe **Abb. 3.1**). Der HA-Tag in diesem Konstrukt ist beidseitig flankiert von einer kurzen Linkersequenz: EEASYPYDVDPYASAE (der **HA-Tag** ist in Fettbuchstaben gezeigt). Dies führt zu einer kurzen artifiziellen Sequenzwiederholungen vor und nach dem HA-Tag. Im ersten Experiment wurden die Glykosylierungsmuster der Konstrukte untersucht. Die HA-getaggten Konstrukte zeigen ähnliche Bandenmuster nach Endo H und PNGase F Behandlung, jedoch bestehen Unterschiede in der Intensität einzelner Banden (**Abb. 4.13 (A & C)**). In der Theorie sollte nach Signalpeptidabspaltung des HA-Konstrukts ohne Linker ein Molekulargewicht von 37.31 kDa und das mit Linker von 37.88 kDa aufweisen. Falls kein Signalpeptid abgespalten wird besitzen beide Konstrukte ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 41 kDa. Beobachtet wird jedoch ein Molekulargewicht beider Konstrukte von ca. 50 kDa vor Signalpeptidabspaltung und zwischen 37 kDa und 50 kDa nach Abspaltung (**Abb. 4.13 (A & C)**). Die glykosylierte Form von TXNDC15 läuft zwischen 50 und 75 kDa und scheint ausschließlich Endo H sensitiv zu sein. Es lässt sich jedoch eine kleine Größendifferenz zwischen Endo H und PNGase F-Behandlung feststellen (**Abb. 4.13 (A)**). Ein Unterschied nach der PNGase F und Deglykosylierungs-Mix Behandlung der Proteine ist bei keinem der Konstrukte zu beobachten (**Abb. 4.13 (C)**). Eine O-Glykosylierung von TXNDC15 konnte auf diesem Weg nicht beobachtet werden. Ein Kochen der Proben in 4 mM DTT haltigen Protein-Denaturierungs-Puffer zeigte keinen Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins im Vergleich zum nativen Protein (**Abb. 4.13 (C)**). Dies schloss SDS-resistente Proteinkomplexe als Anlass für ein verändertes Laufverhalten bezüglich der Molekulargröße im SDS-Gel weitgehend aus. Auch wurde die Endo H-Sensitivität nicht durch vorheriges Denaturieren verbessert (**Abb. 4.14**). Glykosylierungsstellen schienen damit für Proteine leicht zugänglich zu sein.

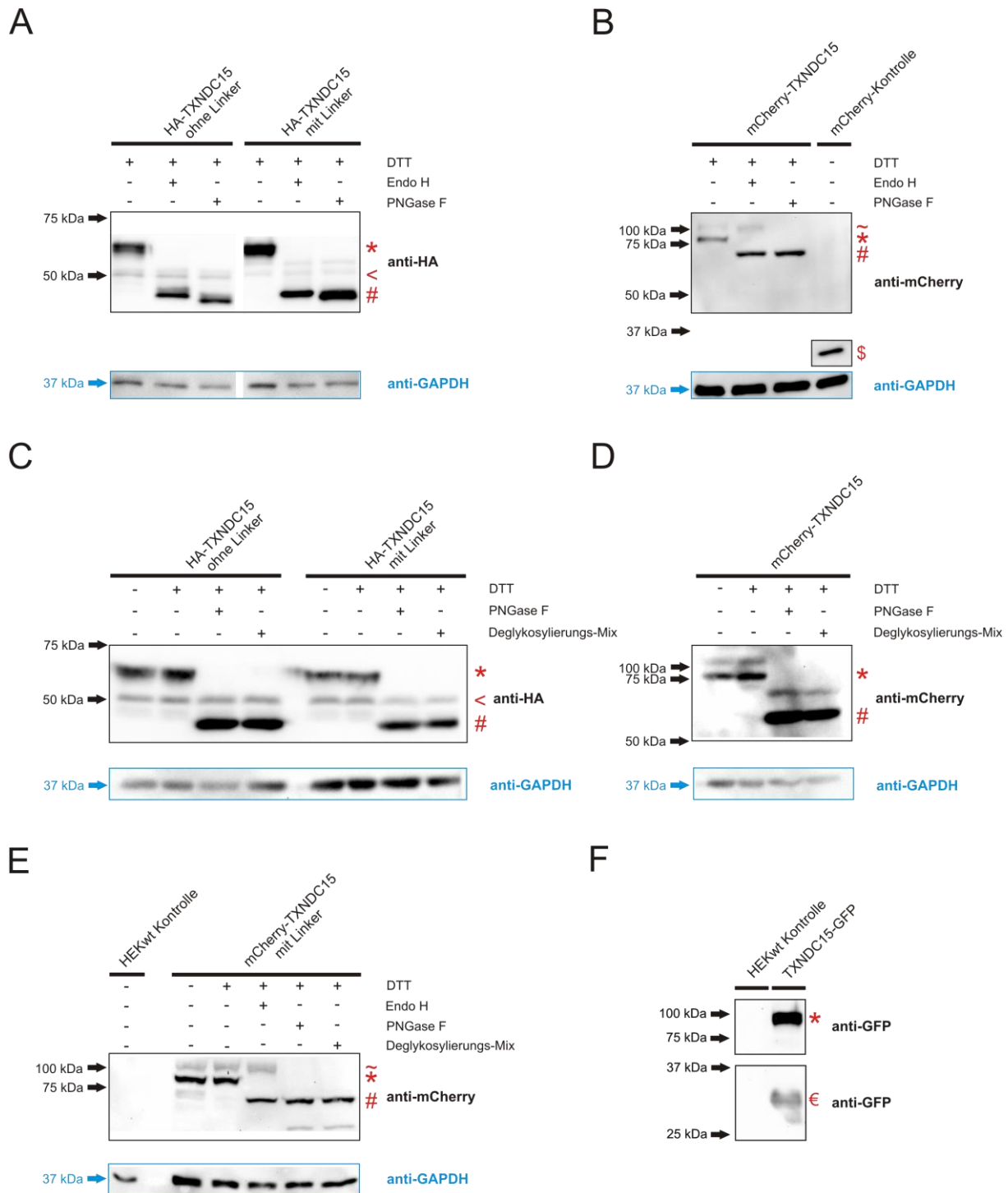


Abbildung 4.13: Proteinbiochemie zur Untersuchung des Glykosylierungsmusters des N-terminal getaggtm TXNDC15. HEKwt-Zellen wurden 24 Stunden vor der Ernte der zellulären Proteine mit jeweils 1 µg DNA transfiziert. Zum Nachweis des HA-Tags diente α-HA-Antikörper und für mCherry-Konstrukte ein entsprechender α-mCherry-Antikörper. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis endogenen GAPDH, welches in einer hellblauen Box abgebildet ist. In Abbildung (A) wurden die N-Glykosylierungen der beiden HA-getaggtm TXNDC15-Konstrukte und in (B) die N-Glykosylierungsmuster des mCherry-Konstrukts verglichen. Dazu wurden Proben entweder mit Endo H oder PNGase F behandelt und mit unbehandelten Proben verglichen. Der Deglykosylierungs-Mix entfernt zusätzlich zur N-Glykosylierung auch viele O-Glykosylierungen, weshalb Proben mit unbehandelten Kontrollen und PNGase F behandelten Proben verglichen wurden. Die Ergebnisse der Behandlung der HA-Konstrukte (C) und die Ergebnisse des mCherry Konstrukts sind (D) zu entnehmen. Für (E) wurde zwischen Signalpeptid und mCherry ein Linker eingefügt, der aus der nativen TXNDC15 Sequenz besteht. Auch für dieses Konstrukt wurde das N- bzw. O-Glykosylierungsmuster untersucht. In (F) wird ein exemplarischer Blot von dem C-terminal getaggtm TXNDC15-GFP-Konstrukt vs. untransfizierte Zellen gezeigt. Die Lysate dieses Blots wurden keiner speziellen Behandlung unterzogen. „*“ zeigt reifes glykosyliertes Protein, „~“ zeigt das Vorläuferprotein (noch nicht abgespaltenem Signalpeptid), „#“ Protein nach Signalpeptidabspaltung und ohne Glykosylierung, „\$“ zeigt mCherry als „nicht-Fusionsprotein“, „~“ deutet auf eine Endo H resistente Fraktion hin und „€“ deutet auf eine GFP-Fraktion hin die als Abbauprodukt aus dem GFP-TXNDC15-Fusionsprotein hervorgeht. Bei den HEKwt Kontrollen handelt es sich um untransfizierte Kontrollen.

Das theoretische Molekulargewicht von mCherry-TXNDC15 beträgt mit Signalpeptid 66,59 kDa. Das Molekulargewicht ohne Signalpeptid ist schwer zu schätzen, da die SP-Schnittstelle durch das Einfügen von mCherry verändert wurde und eventuell anders als der WT prozessiert wird. Das theoretische Molekulargewicht von mCherry-TXNDC15 mit Linker beträgt 63,78 kDa ohne Signalpeptid und 67,45 kDa mit Signalpeptid. Im Westernblot zeigten die mCherry-Konstrukte ein Molekulargewicht zwischen 75 kDa und 100 kDa (**Abb. 4.13 (B, D & E)**). Die Behandlung mit Endo H, PNGase F und dem Protein-Deglykosylierungs-Mix führte zu einer Reduktion des beobachteten Molekulargewichts auf deutlich unter die 75 kDa (**Abb. 4.13 (B, D & E)**). Somit ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Endo H, PNGase F und Deglykosylierungs-Mix der behandelten Zelllysate beobachten. Dies deutete weder auf eine komplexe N-Glykosylierung noch eine O-Glykosylierung von TXNDC15 hin. Die mCherry-TXNDC15 Konstrukte zeigten jedoch eine schwache Endo H resistente Fraktion, die bei ca. 100 kDa lief (**Abb. 4.13 (B & D)**). Diese Bande verschwand durch die Behandlung mit PNGase F oder dem Deglykosylierungs-Mix, jedoch zeigte sich eine neue Bande deutlich unter der 75 kDa Marke. Das TXNDC15-GFP Konstrukt zeigt als einziges Konstrukt eine klare Fraktion an GFP-positivem Signal welche vermutlich durch die Degradation des Fusionsproteins hervorgegangen ist.

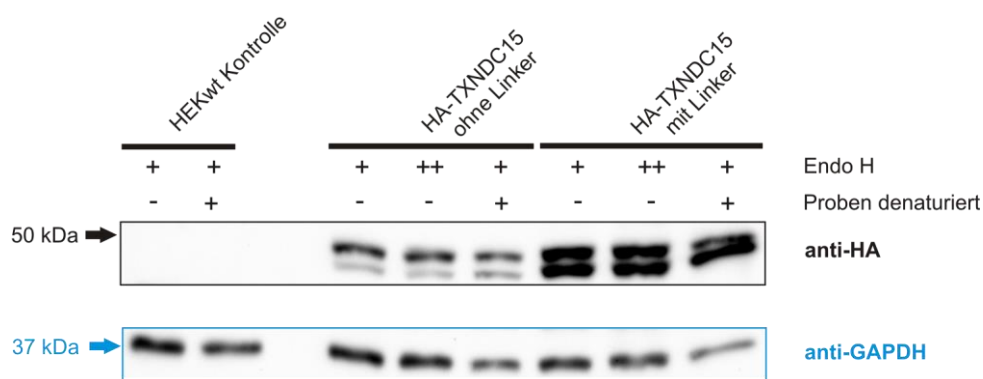


Abbildung 4.14: Nähere Betrachtung der Endo H Sensitivität der HA-getaggten Konstrukte. Proben wurden im nativen Zustand mit Endo H, im nativen Zustand unter Zugabe doppelter Menge an Endo H oder im denaturierten Zustand mit Endo H behandelt. „Proben Denaturiert“ beschreibt, dass die Proben zuvor im Denaturierungspuffer (4 mM DDT) für 10 Minuten gekocht wurden. Als Nachweis diente ein α -HA Antikörper und als Ladungskontrolle wurde das endogene GAPDH über einen Antikörper detektiert. Die Primärantikörper wurden über einen passenden, an eine Peroxidase gekoppelten, sekundären Antikörper nachgewiesen.

Diverse Westernblots zeigten, dass das HA-TXNDC15 Konstrukt mit Linker oft intensivere Banden als das HA-Konstrukt ohne Linker aufwies. Ob dies an einer verstärkten Proteinsynthese des einen Konstruktes (z.B. bedingt durch die verschiedenen Vektoren, in denen die Konstrukte kloniert wurden) oder der verstärkten Proteindegradation des anderen Konstruktes lag, wurde als nächstes untersucht. Hierzu wurden Zellen 16 Stunden vor der Ernte mit Concanamycin A (CMA) behandelt, um die lysosomale Degradation zu hemmen. CMA verhindert über eine Hemmung der H^+ -ATPase die Ansäuerung der Lysosomen. Da lysosomale Proteine auf einen sauren pH angewiesen sind, verlieren sie hierdurch ihre natürliche Funktion. Diese Behandlung führte bei den mCherry-TXNDC15 und HA-TXNDC15 mit Linker-Konstrukt zu einer Zunahme der beobachteten Proteinmenge auf 135 % im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Bei HA-TXNDC15 ohne Linker stieg das Signal des reifen Proteins um mehr als das Doppelte der Kontrolle auf ca. 235 % an (**Abb. 4.15 (A, B & D)**). Die Vorläuferbande (Protein vor der Signalpeptidabspaltung und Glykosylierung) desselben HA-Konstrukts verzeichnet jedoch nur eine Zunahme der Gesamtproteinmenge vergleichbar mit dem des mCherry-TXNDC15 oder dem HA-Konstrukt mit Linker. Zur Untersuchung der proteasomalen Degradation von HA-getagtem TXNDC15 wurde ein Inhibitor des Proteasoms (MG-132) verwendet. Dieser wurde zwei Stunden nach der Transfektion zu den Zellen gegeben und diese wurden dann für weitere 6 Stunden inkubiert, bevor sie geerntet wurden. Dies war notwendig, da MG132 ein Aktivator der UPR (unfolded protein response) ist (Nakajima et al. 2011). Unter MG132-Behandlung ist eine deutliche Abnahme des reifen glykosylierten Proteins bei gleichzeitiger Zunahme des Vorläuferproteins zu beobachten. (**Abb. 4.15 (C)**). Es wird bei beiden Konstrukten zudem reifes, aber unglykosyliertes Protein sichtbar.

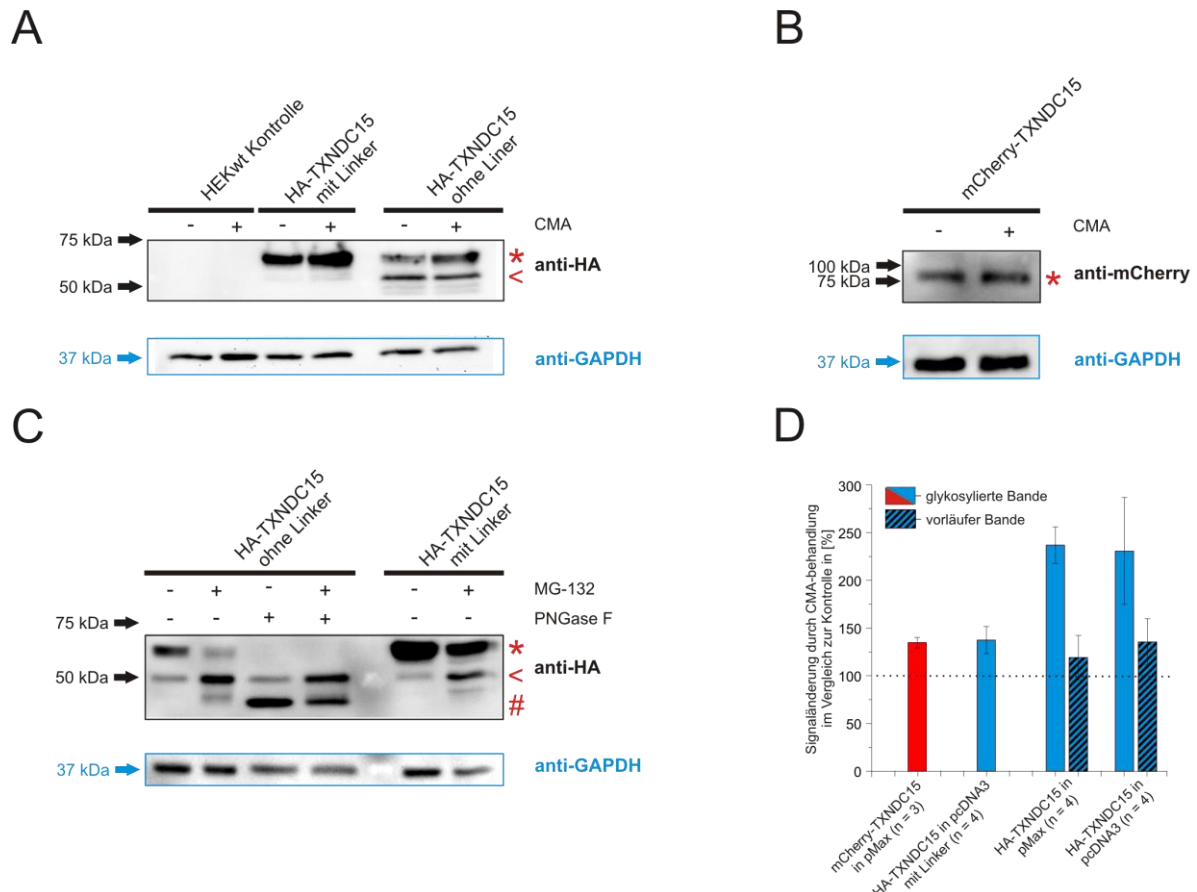


Abbildung 4.15: Proteinbiochemie zur Untersuchung der Glykosylierungsmuster und Degradation von mCherry und HA getaggttem TXNDC15. HEKwt-Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit 1 µg DNA transfiziert. Als Nachweis der Konstrukte diente entweder ein α-HA oder α-mCherry Antikörper. Als Proteinladungskontrolle wurde endogenes GAPDH über einen Antikörper nachgewiesen. In den Abbildungen (A) und (B) wurde der Einfluss einer CMA-Behandlung (Hemmung der lysosomalen Degradation von Proteinen) auf die Bandenmuster der überexprimierten Proteine abgebildet. In (C) wurde der Einfluss einer Behandlung der Zellen mittels Proteasomhemmer MG-132 auf HA getaggttes TXNDC15 untersucht. Die Ergebnisse zu den in (A & B) beschriebenen Versuchen sind in (D) abgebildet. Angegeben ist der Mittelwert und die Standardabweichung; „*“ zeigt reifes glykosyliertes Protein, „<“ zeigt das Vorläuferprotein, und „#“ Protein nach Signalpeptidabspaltung und ohne Glykosylierung

Da Tags in der Nähe der Signalpeptidabspaltungsstelle Gefahr laufen, den korrekten Import des Proteins in das ER zu stören, wurde in *in vitro* Translationsversuchen das Verhalten der Konstrukte untersucht. Das HA-TXNDC15-Konstrukt ohne Linker verhielt sich wie erwartet. In **Abb. 4.16 (A)** ist zu erkennen, dass Protein vom zuvor aus pcDNA3 HA-TXNDC15 ohne Linker hergestellten Transkript gebildet wurde. Durch die Zugabe von semi-permeabilisierten Zellen (SPC) wurde das Protein gereift und glykosyliert. Eine Behandlung der Zellen mit dem kompetitiven Glykosylierungshemmer NYT führte zum Verschwinden der Bande des reifen glykosylierten Proteins. Eine klare Vorläuferbande war jedoch nicht zu finden, stattdessen entsteht ein Schleier, der keiner eindeutigen Proteingröße zugeordnet werden kann. Durch die Behandlung der Ansätze mit Proteinase K konnte gezeigt werden, dass TXNDC15 durch den ER-Import vor einem Proteinase K-bedingten Verdau geschützt war. Die Bestätigung lieferte die zusätzliche Gabe des

membranpermeabilisierenden Triton-X, wonach jegliche Banden aufgrund des Proteinase K-bedingten Verdaus verschwanden. In Versuchen mit rauen Mikrosomen ließ sich eine Reifung von HA-TXNDC15 mit Linker ebenfalls beobachten (**Abb. 4.16 (C)**). Im Gegensatz zu den SPC's fand sich durch die Behandlung mit NYT eine Vorläuferbande, die auf eine erfolgreiche Signalpeptidabspaltung hindeutete. Das HA-TXNDC15-Konstrukt mit Linker wurde hingegen weder von SPC's noch von rauen Mikrosomen gut translatiert und gereift, siehe (**Abb. 4.16 (B & C)**). Es sind daher nur schwache Banden zu erkennen. Der Vorläufer des HA-Konstruktes mit Linker scheint 5 kDa über dem Molekulargewicht des HA Konstrukts ohne Linker zu laufen (**Abb. 4.16 (C)**). Die glykosylierte Form scheint hingegen ein ähnliches Molekulargewicht zu haben.

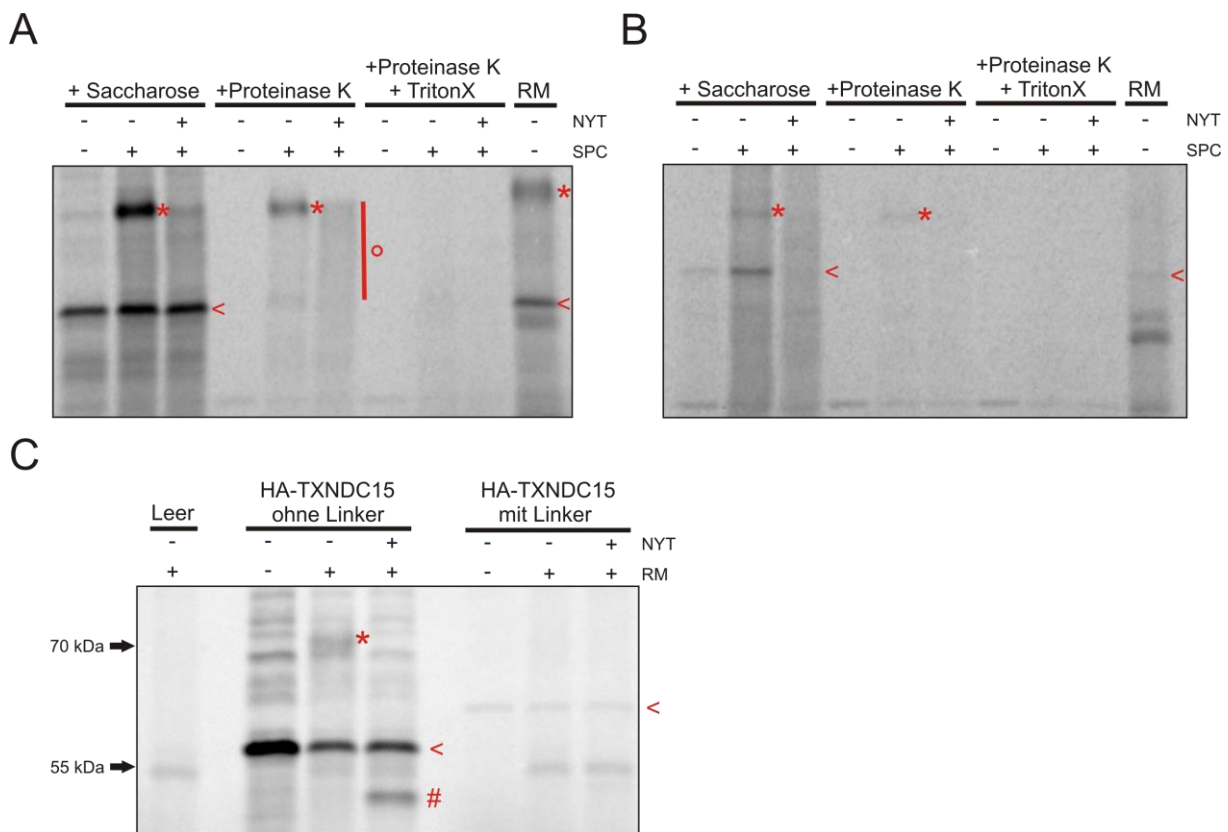


Abbildung 4.16: *in vitro* Translation, Transkription und Transport des N-terminal HA-getaggtm TXNDC15 ohne Linker.

In Abbildung (A) wurden Digitonin permeabilisierte HeLa-Zellen (SPC) genutzt, um eine *in vitro* Translation und einen ER-Import von HA-TXNDC15 ohne Linker durchzuführen. NYT dient als kompetitiver Glykosylierungshemmer. Saccharose behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle für die Proteinsynthese. Proteinase K wurde zugegeben, um nicht ins ER importiertes Protein zu zerstören und somit importiertes Protein sichtbar zu machen. Die Bedingung mit Proteinase K + Triton X gilt als Negativkontrolle, da hier das ER permeabilisiert wird, um jegliches Protein zu degradieren. Zur Kontrolle des beobachteten Bandenmusters wurde auch ein Transport in rauen Mikrosomen durchgeführt. (B) zeigt denselben Versuch wie (A) nur, dass diesmal das HA-TXNDC15-Konstrukt mit linker verwendet wurde. In (C) wurden raue Mikrosomen für die Synthese und den Import von Protein genutzt. Es wird sowohl eine Signalpeptidabspaltung und eine Glykosylierung für das HA-TXNDC15 Konstrukt ohne Linker beobachtet. Für das HA-TXNDC15 Konstrukt mit Linker wurde keine Reifung des Proteins beobachtet. Die Bande ganz links (leer) zeigt eine Leerkontrolle, in der keine DNA zugegeben wurde. „*“ zeigt reifes glykosyliertes Protein, „o“ zeigt teilweise deglykosyliertes Protein, „<“ zeigt Vorläuferprotein (mit Signalpeptid), und „#“ Protein nach Signalpeptidabspaltung und ohne Glykosylierung.

4.5 Lokalisation von TXNDC15

Zur genaueren Lokalisation von TXNDC15 wurden die verschiedenen getaggtten Konstrukte auf subzellulärer Ebene betrachtet. Hierfür wurde hauptsächlich eine kombinierte Überexpression des TXNDC15-Konstrukts mit einem fluoreszenten Organellmarker durchgeführt. Um die Kolokalisation dieser beiden Konstrukte quantifizieren zu können, wurden Manders-Koeffizienten berechnet, wobei bei Werten der Koeffizienzen von unter 0,6 von keiner Kolokalisation der transfizierten Konstrukte ausgegangen wurde. Der Manders-Koeffizient M1 beschreibt die Fraktion des Markers, die mit dem TXNDC15-Konstrukt kolokalisiert. M2 beschreibt in diesem Fall die Fraktion des TXNDC15-Konstruktes, die mit dem jeweiligen Marker kolokalisiert. Die Koeffizienten gehen von 0 – 1, wobei eine perfekte Kolokalisation bei „1“ vorliegt und „0“ das Fehlen einer Kolokalisation beschreibt.

Das HA-TXNDC15 Konstrukt mit Linker wurde uns von Herrn Prof. Dr. Lars Ellgaard mit der Information überlassen, dass dieses Protein-Konstrukt im ER retiniert wird. Eine Expression des Konstruktes in HEKwt-Zellen zeigte eine netzähnliche Verteilung des Proteins. Dies deutet stark auf ein ER-Epressionsmuster hin (siehe **Abb. 4.17**), sodass keine Kolokalisationsversuche mit diesem Konstrukt durchgeführt wurden. Das TXNDC15-GFP-Konstrukt zeigte in Versuchen ebenfalls eine ER-Lokalisierung in HEKwt-Zellen. Hierfür wurden keine zusätzlichen Marker verwendet, da das TXNDC15-GFP-Konstrukt ein netzähnliches Muster aufwies wie es typisch für das ER ist. In Jurkat E6-1-Zellen wurde eine Kolokalisation mit dem ER-tagRFPT-Konstrukt durchgeführt (**Abb. 4.18 (A)**). Der Manders-Koeffizient zeigte mit Werten für M1 von 0,825 und M2 von 0,908 eine starke Kolokalisation. Sowohl das mCherry-Konstrukt mit Linker als auch das HA-Konstrukt ohne Linker zeigten starke Abweichungen von diesem Muster.

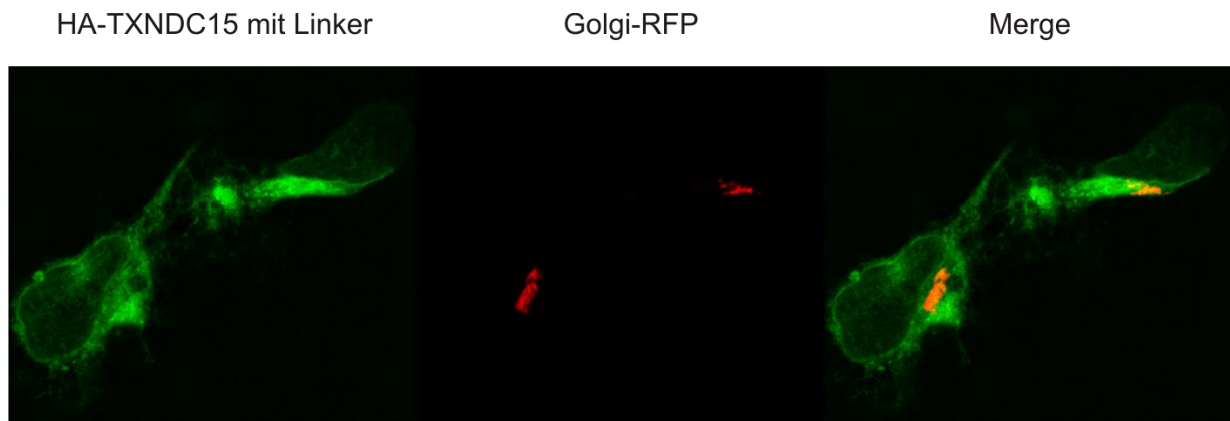


Abbildung 4.17: Lokalisierung des HA-TXNDC15-Konstrukte mit Linker in HEKwt-Zellen. Zellen wurden 24 Stunden vor der PFA-Fixierung mit dem HA-TXNDC15 mit Linker Konstrukt sowie dem Golgi-RFP Marker transfiziert (insgesamt 1 µg DNA). Im Anschluss wurden sie permeabilisiert und mit einem α-HA Alexa488-gekoppelten Antikörper gefärbt. Die exemplarische LSM-Aufnahme besteht aus einer Maximumintensitätsprojektion aus drei aufeinanderfolgenden Ebenen des Z-Stacks der Zellen.

Das mCherry-Konstrukt mit Linker wurde sowohl in HEKwt- und Jurkat E6-1-Zellen in kleinen vesikulären Strukturen beobachtet. Bei einer gleichzeitigen Expression von mCherry-TXNDC15 mit Linker und dem lysosomalen Marker (LAMP1-GFP) in Jurkat E6-1 Zellen zeigte sich eine gute Kolokalisation ($M1 = 0,629$ und $M2 = 0,801$) (**Abb. 4.18 (B)**). Hingegen zeigte das mCherry-TXNDC15 mit Linker und der Marker für späte Endosomen (RAB7-GFP) keine klare Kolokalisation ($M1 = 0,360$ und $M2 = 0,320$) (**Abb. 4.18 (C)**). Auch wenn die Kolokalisation von RAB7-GFP mit mCherry TXNDC15 gering ausfiel, so sind immer wieder vereinzelt RAB7-GFP und TXNDC15-mCherry positive Vesikel zu beobachten. Späte Endosomen sind entscheidend für die Bildung reifer Lysosomen. Das HA-TXNDC15 Konstrukt mit Linker zeigte eine ER-Lokalisation (**Abb. 4.17**), wo hingegen das Konstrukt ohne Linker eine Golgi-Lokalisation in Jurkat E6-1 Zellen mit $M1$ von $0,835$ und $M2$ von $0,741$ zeigte (**Abb. 4.18 (D)**). Eine Kolokalisation mit Clathrin konnte in Jurkat-Zellen nicht beobachtet werden (**Abb. 4.18 (E)**).

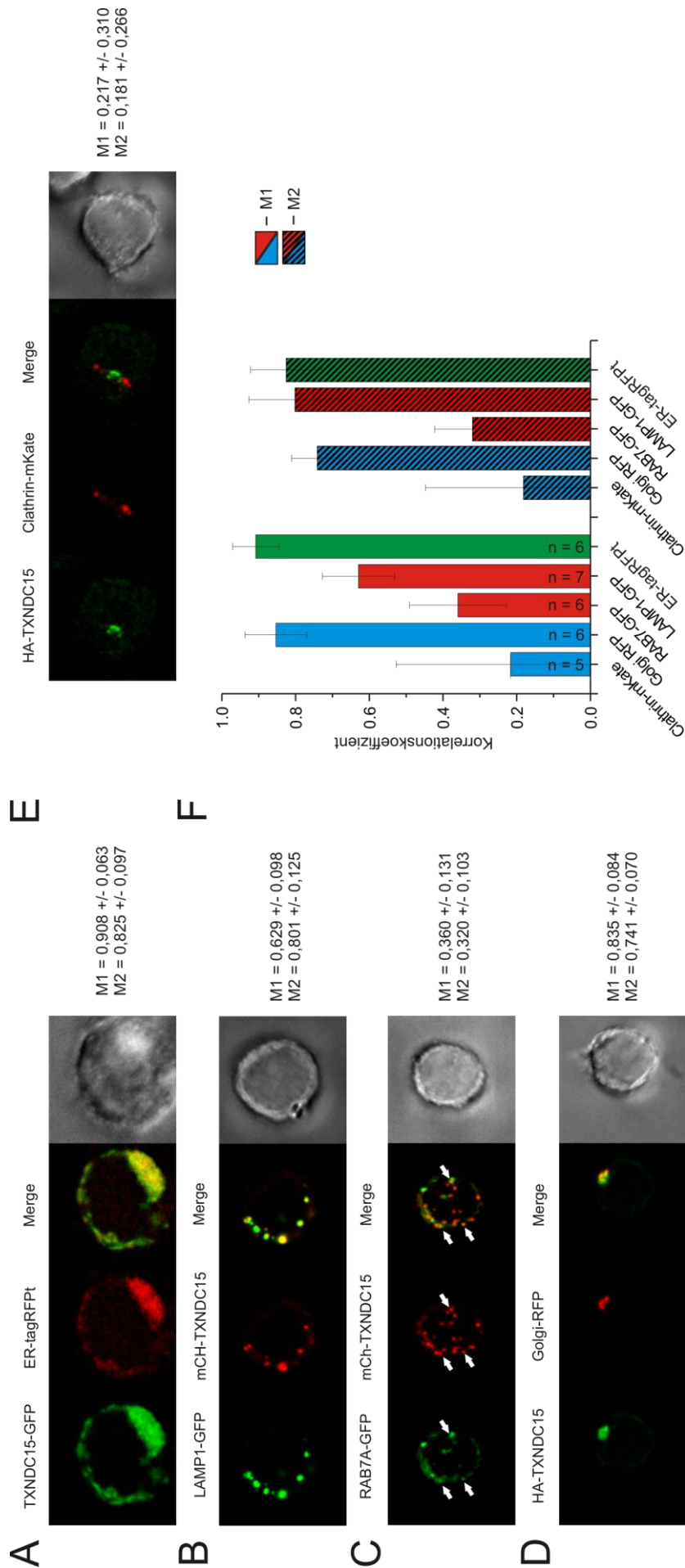


Abbildung 4.18: Lokalisierung verschiedener TXNDC15-Konstrukte in Jurkat T-Zellen. Zellen wurden 24 Stunden vor der PFA-Fixierung transfiziert. Exemplarische LSM-Aufnahmen bestehen aus einer Maximumintensitätsprojektion aus drei aufeinanderfolgenden Ebenen des Z-Stacks einer Zelle. In **(A)** wurde die Lokalisation des TXNDC15-GFP-Konstruktes mit einem ER-tagRFPt Marker verglichen. In **(B & C)** wurde das mCherry-TXNDC15-Konstrukt mit Linker gegen einen lysosomalen (LAMP1-GFP) und einen späten endosomalen (RAB7-GFP) Marker verglichen. Trotz keiner signifikanten Kollokalisierung von mCherry-TXNDC15 mit RAB7-GFP wurden vereinzelt Rab7A-GFP und mCherry-TXNDC15 positive Vesikel beobachtet (weiße Pfeile in **(C)**). In **(D)** und **(E)** wurde die Lokalisierung des HA-TXNDC15-Konstruktes ohne Linker genauer betrachtet. In **(E)** zeigte sich eine deutliche Kollokalisierung mit dem Golgi-RFP-Marker, jedoch wurde keine Kollokalisierung des HA-Konstruktes mit einem Clathrin-mKate-Konstrukt beobachtet **(D)**. Für die Berechnung der Kollokalisierung von ER-tagRFPt mit TXNDC15-GFP **(A & F)** wurde in Bezug auf das Setzen des Schwellenwerts für „echtes Signal“ im JaCop-Plugin nur der Mittelwert der Pixelintensität plus das 2-Fache der Standardabweichungen abgezogen. In **(F)** sind stets der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der analysierten Zellen ist mit „n“ angegeben. Der Manders-Koeffizient M1 beschreibt die Fraktion des Markers die mit dem TXNDC15-Konstrukt kollokalisiert und M2 die Fraktion des TXNDC15-Konstruktes, die mit dem jeweiligen Marker kollokalisiert.

In HEKwt-Zellen zeigte die stärkste Kolokalisation der Golgi-RFP Marker und HA-TXNDC15 ohne Linker mit Manders-Koeffizienten von $M1 = 0,841$ und $M2 = 0,689$ (**Abb. 4.19 (A)**). Die zweitbeste Kolokalisation zeigte Clathrin-mKate, das als Hüllprotein des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) fungiert mit Manders-Koeffizienten von $M1 = 0,609$ und $M2 = 0,473$ (**Abb. 4.19 (B)**). Die jeweiligen $M2$ -Koeffizienten fielen trotz deutlicher Kolokalisation dieser Marker mit TXNDC15 ($M1$ -Koeffizient) niedriger als die dazugehörigen $M1$ -Koeffizienten aus. Dies lässt sich dadurch erklären, dass HA-TXNDC15 in HEKwt-Zellen nicht nur mit einem Marker (für Golgi oder TGN) gut kolokalisierte. So zeigte immer nur ein Teil der TXNDC15-Gesamtheit mit dem jeweiligen Marker eine Kolokalisation (niedriger $M2$ -Koeffizient). Eine Kolokalisation mit den Markern für frühe Endosomen (RAB5-GFP), späte Endosomen (RAB7-GFP), recycling Endosomen (RAB11-GFP) oder Lysosomen (LAMP1-GFP) wurde nicht beobachtet (**Abb. 4.19 (C, D, E & F)**). Zum Nachweis von HA-TXNDC15 an der Zelloberfläche wurden unpermeabilisierte Zellen mit dem anti-HA Alexa488 gekoppeltem-Antikörper gefärbt und mit dem intrazellulären mCherry getaggtem TXNDC15-Konstrukt mit Linker verglichen (**Abb. 4.19 (G)**). Hierbei wird beobachtet, dass der „anti-HA Alexa488“-Antikörper die Oberfläche der Zelle stark anfärbt. Zusätzlich ist in diesem Versuch die vesikuläre Expression des mCherry-TXNDC15-Konstruktes mit Linker in HEKwt-Zellen zu beobachten wie sie schon in Jurkat-Zellen gezeigt werden konnte.

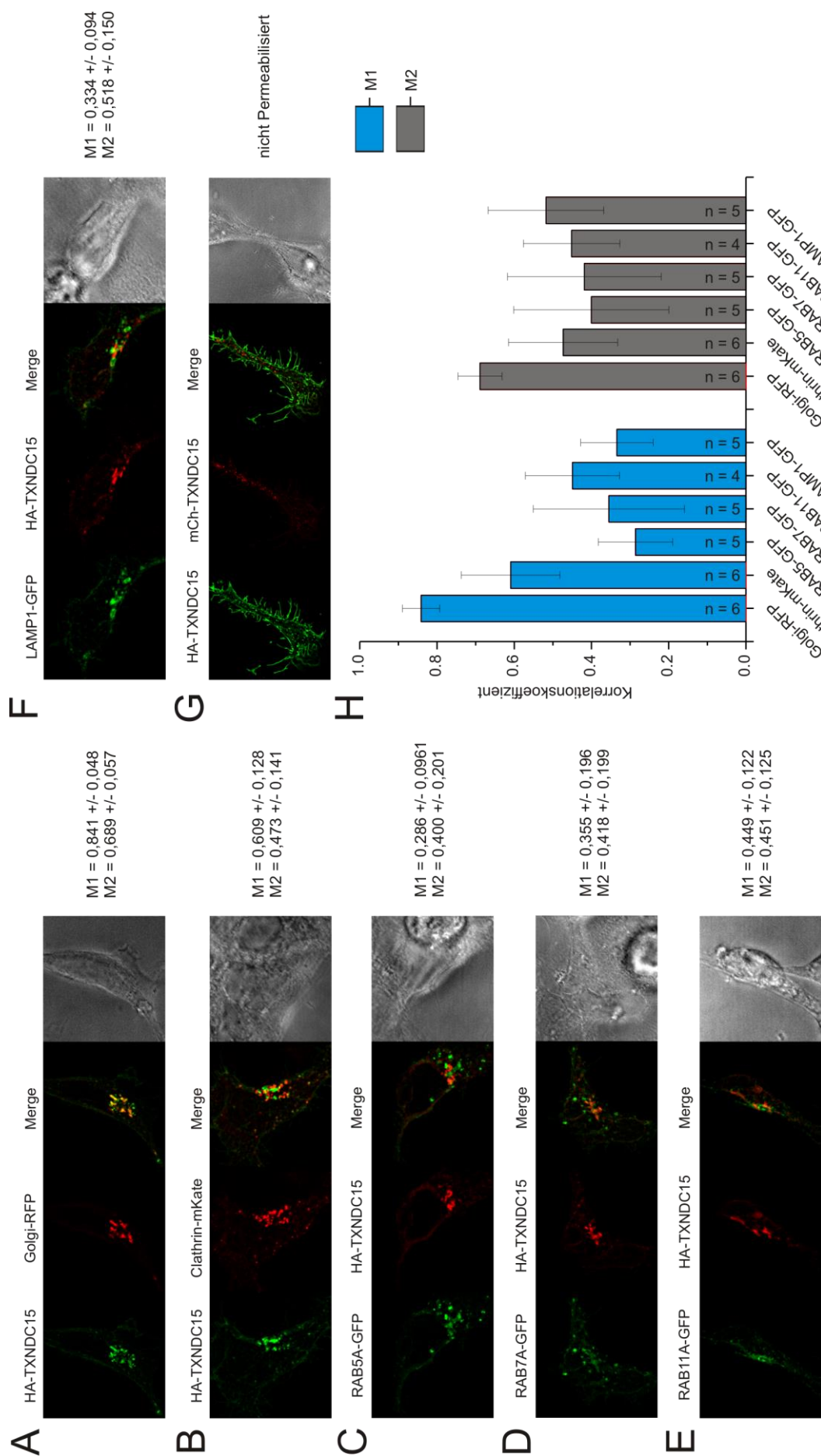


Abbildung 4.19: Genaue Lokalisierung des HA-TXNDC15 Konstrukt ohne Linker in großen HEKwt-Zellen. Die Zellen wurden 24 h vor der PFA-Fixierung transfiziert. Im Anschluss wurden sie permeabilisiert und mit einem α -HA-Alexa488-gekoppelten Antikörper gefärbt. Exemplarische LSM-Aufnahmen bestehen aus einer Maximintensitätsprojektion aus drei aufeinanderfolgenden Ebenen des Z-Stacks einer Zelle. In (A - F) wurde die Lokalisation des HA-Konstruktes in permeabilisierten Zellen mit Golgi-RFP (A), Clathrin-mKate (B), mit einem frühen endosomalen Marker (RAB5-GFP) (C), einem späten endosomalen Marker (RAB7-GFP) (D), einem Marker für recycling Endosomen (RAB11-GFP) (E) und einem lysosomalen Marker (LAMP1-GFP) (F) verglichen. In (G) wurde auf eine Oberflächenexpression von HA-TXNDC15 getestet, indem unpermeabilisierte Zellen mit dem α -HA-Alexa488-Antikörper behandelt wurden. Es zeigte sich eine starke Oberflächenfärbung, die sich deutlich vom intrazellulären Signal des mCherry-TXNDC15-Konstruktes unterscheidet. Für die Statistik in (H) sind stets der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der analysierten Zellen ist mit „n“ angegeben. Der Manders-Koeffizient M1 beschreibt die Fraktion des Markers, die mit dem HA-TXNDC15 kolokalisiert und M2 die Fraktion von HA-TXNDC15, die mit dem Marker kolokalisiert.

5 Diskussion

5.1 Vorversuche zum Projekt

Die Ergebnisse der Vorversuche zu TXNDC15 sind in ihrer Interpretation kritisch zu betrachten. Ein Effekt wie etwa die Reduzierung des SOCE oder eine Vergrößerung des ER-Calciums nach Thapsigargin-Stimulation, die mit der aus dem Screen stammenden siRNA-Sequenz beobachtet wurde, könnte sowohl auf einen Knockdown von TXNDC15, TMX4 oder eines nicht näher betrachteten Proteins zurückzuführen sein. Daher wurden diese Versuche mit einer spezifischen siRNA gegen TXNDC15 oder TMX4 reproduziert. Dabei wurde aber zugleich eine Änderungen der siRNA Konzentration von 1,6 μM der alten siRNA auf 400 nM des 4-fach-Mixes der neuen siRNA gegen TMX4 oder TXNDC15 vorgenommen, um die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Herunterregulation „Off-target Effekte“ zu minimieren. Die neue siRNA gegen TXNDC15 (4-fach-Mix) zeigte bei der niedrigeren Konzentration eine ähnlich gute Effizienz wie die alte siRNA für die Reduktion des TXNDC15 Transkripts auf qRT-PCR-Ebene. Die mit der alten siRNA beobachteten Effekte auf Jurkat T-Zellen konnten jedoch nicht mit einer spezifischen siRNA gegen TXNDC15 oder TMX4 reproduziert werden. Auch ein Doppelknockdown beider Proteine konnte diesen Effekt nicht reproduzieren. Es ist daher anzunehmen, dass der zuvor beschrieben Effekt auf ein weiteres Protein oder eine Kombination unbekannter herunterregulierter Proteine zurückzuführen ist.

5.2 Charakterisierung und Einordnung von TXNDC15

* Angaben zu Aminosäuren beziehen sich immer auf die humane TXNDC15-Sequenz z.B.: (W219) = Tryptophan 219

Im Gegensatz zu vielen anderen Thioredoxinen zeigt TXNDC15 nur eine einzige Thioredoxindomäne mit einem atypischen aktiven Zentrum. Das aktive Zentrum stellt klassischer Weise das CXXC-Motiv dar, wobei die Aminosäuren an den Positionen zwischen den beiden Cysteinen die Reduktionskraft der Thioredoxine bestimmen (Chivers et al. 1996). Häufig ist hier ein CGPC-Motiv anzutreffen (Pan & Bardwell 2006). TXNDC15 besitzt jedoch ein CRFS Motiv. Bei dem CXXS Motiv handelt es sich im Gegensatz zu einem SXXC Motiv um ein redoxaktives Motiv (Chivers et al. 1996; Sturley et al. 1995). Thioredoxine besitzen jedoch noch weitere stark konservierte Reste (Eklund et al. 1991). Vor den reaktiven Cysteinen finden sich ein stark konserviertes Alanin und Tryptophan. Das Tryptophan ist wichtig für die thermodynamische Stabilität des Thioredoxins (Garcia-Pino et al. 2009) und das vorangehende Alanin beeinflusst über van der Waals Wechselwirkung die Position des folgenden Tryptophans (Eklund et al. 1991; Collet & Messens 2010). In TXNDC15 findet sich das Tryptophan (W219), jedoch sitzt an der Position des kleinen Alanins ein Threonin (T217). Unter den konservierten Aminosäuren befinden sich auch zwei Proline. Ein Prolin folgt kurz nach dem aktiven Zentrum in der α -Helix 2 (P228), das für die Stabilität der TRX-Struktur, aber nicht für die Redoxeigenschaften wichtig ist (de Lamotte-Guéry et al. 1997; Chakrabarti et al. 1999). Ein weiteres für die Redoxeigenschaften wichtiges Prolin (P263) findet sich immer gegenüber dem aktiven Zentrum vor dem β -Faltblatt 4 (Gleason 1992). Neben diesem Prolin befindet sich ein konserviertes Threonin (Collet & Messens 2010), das TXNDC15 jedoch nicht erhalten blieb. Für die Struktur wichtige Phenylalanine finden sich in der α -Helix 1 und dem β -Faltblatt 2 (Collet & Messens 2010). Diese formen zusammen eine interne hydrophobe Region, welche auch in TXNDC15 (F257 & F215) oder Erp44 zu finden ist (**Abb.5.1 (A & B)**). Bei genauer Betrachtung des RaptorX-Modells von TXNDC15 weist dieses noch 2 weitere Phenylalanine auf, die an dieser hydrophoben Region beteiligt sein könnten (F202 & F268). Thioredoxine zeigen zudem konservierte und strukturell wichtige Glycine, die das β -Faltblatt 5 flankieren (Collet & Messens 2010). Diese Glycine ermöglichen aufgrund ihrer geringen Größe starke Biegungen der Tertiärstruktur (Yan & Sun 1997). In TXNDC15 ist nur das N-terminale Glycin (G270) vor β -Faltblatt 5 konserviert, jedoch zeigen fast alle anderen betrachteten humanen Thioredoxine beide Glycine. Bei Arginin (R282) in TXNDC15 könnte es sich um eine weitere für Thioredoxine konservierte wichtige

Aminosäure handeln. Dieses Arginin besitzt aufgrund seiner Position im Protein die Möglichkeit mit den aktiven Cysteinen zu interagieren und beeinflusst möglicherweise den pK_A Wert des aktiven Zentrums (Lappi et al. 2004).

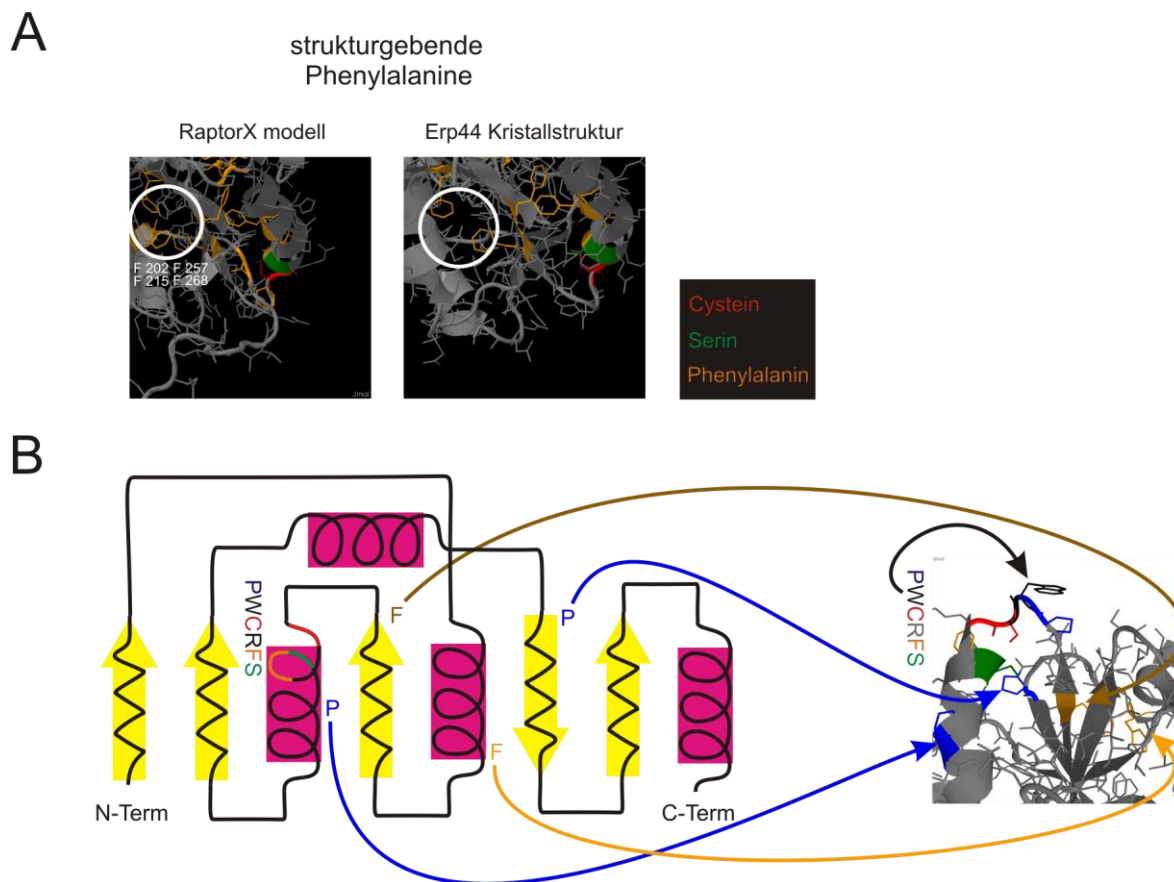


Abbildung 5.1: Nähere Betrachtung des Raptor X-Modell und Vergleich mit der Röntgenkristallstruktur von ERp44. In (A) werden strukturgebende Phenylalanine näher betrachtet und zwischen Modell und der Röntgenkristallstruktur von ERp44 verglichen. Für Thioerodoxine konservierte wichtige Aminosäuren wurden im Modell näher betrachtet (B). Hierzu zählen das Phenylalanin (F) in α -Helix 1 und das Phenylalanin in β -Faltblatt 2, die zusammen einen hydrophoben Bereich schaffen, der strukturgebend in Thioerodoxinen ist. Das Prolin (P) in β -Faltblatt 4 liegt gegenüber dem aktiven Zentrum und trägt somit, zusammen mit dem Tryptophan (W), welches unmittelbar vor dem aktiven Zentrum liegt, zur hydrophoben Umgebung des aktiven Zentrums bei. Das Prolin in der α -Helix 2 knickt die Helixstruktur leicht. Die Helices und Faltblätter werden beginnend vom N-Terminus aus mit α -Helix 1/ β -Faltblatt 1 separat voneinander in Richtung C-Terminus durchnummeriert.

Zusammengenommen zeigt TXNDC15 eine weitgehend klassische Thioerodoxindomäne, mit vielen der für Thioerodoxine wichtigen und konservierten Reste. Eine Besonderheit jedoch stellt das aktive Zentrum von TXNDC15 dar. Wegen seines CRFS-Motivs, das ERp44 ebenfalls zeigt, stellt sich die Frage nach der Funktion von TXNDC15. Mit dem CXXS-Motiv sind Proteine zwar nicht in der Lage Oxidations- und Reduktionsreaktionen durchzuführen, sie können allerdings die Isomerisierung von Disulfiden katalysieren und bei der korrekten Faltung von Proteinen helfen (Sturley et al. 1995; Meyer et al. 2009). Für ERp44 konnte gezeigt werden, dass es an einer Thiol-vermittelten ER-Retention von Proteinen beteiligt ist

(Anelli et al. 2003; Sannino et al. 2014). Eine mögliche TXNDC15 vermittelte Retention von Proteinen im Golgi ist ebenfalls denkbar. Interessanterweise findet sich das CRFS-Motiv in leicht abgeänderter Form bei Monothiol-Glutaredoxinen wieder. Diese zeigen ein CGFS-Motiv als aktives Zentrum, teils mehrere Glutaredoxin Domänen und manche sogar Thioredoxindomänen ohne aktives Zentrum (z.B. humanes GLRX3) (Herrero & De La Torre-Ruiz 2007). Monothiol-Glutaredoxine mit dem CXFS-Motiv sind unter anderem an der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt (Rodríguez-Manzanique et al. 2002; Haunhorst et al. 2010; Haunhorst et al. 2013). Eine Beteiligung von TXNDC15 an der Eisen-Schwefel-Clusterbildung ist denkbar, kann aber zu diesem Zeitpunkt nicht bestätigt werden. Glutaredoxine unterscheiden sich von Thioredoxinen auch dadurch, dass sie aus dem oxidierten Zustand über reduziertes Glutathion in ihren reduzierten Zustand zurückkehren. Bei Thioredoxinen wird die Reduktion über Thioredoxinreduktasen bewerkstelligt (Pan & Bardwell 2006). Jedoch gilt dies nicht für alle Thioredoxine. Für pflanzliche Monothiol- oder Dithiol-Thioredoxine der Gruppe h konnte gezeigt werden, dass diese über Glutathion reduziert werden können (Gelhaye et al. 2003). Manche dieser Thioredoxine aus der Gruppe h weisen eine N-terminale Verlängerung vor der Thioredoxindomäne mit einem konservierten Cystein auf (Cha et al. 2008). Diese Struktur erinnert stark an TXNDC15, das ebenfalls in dem nicht modellierbaren N-terminalen Bereich vor der Thioredoxindomäne ein stark konserviertes Cystein (C177) zeigt. Für das pflanzliche Dithiol-Thioredoxin PtTRXh4 wurde ein solches drittes Cystein identifiziert, welches am katalytischen Zyklus des Proteins beteiligt ist (Cha et al. 2008). Für das aktive Zentrum von PtTRXh4 (WCPGC) wird postuliert, dass die Position des Tryptophans ein Reduzieren des Enzyms durch Thioredoxinreduktasen verhindert (Cha et al. 2008) wie es für die meisten Thioredoxine üblich ist. Es ist also ebenfalls auf Glutathion angewiesen. Für Thioredoxine wurde beschrieben, dass an der -2 Position vor dem Tryptophan des aktiven Zentrums eine kleine Aminosäure wie Alanin essentiell für die räumliche Positionierung des folgenden Thryptophans ist (Eklund et al. 1991; Collet & Messens 2010). Für TXNDC15 wird anstelle des kleinen und stark konservierten Alanins ein großes Threonin beobachtet. Es ist daher denkbar, dass es sich bei TXNDC15 um ein atypisches Thioredoxin handelt, da eine Interaktion von Thioredoxinreduktasen mit dem katalytischen Zentrum durch eine untypische Positionierung des Tryptophans möglicherweise verhindert wird und TXNDC15 für seinen katalytischen

Zyklus ebenfalls auf Gluthathion angewiesen wäre. Dies gilt es jedoch noch experimentell zu prüfen.

Mit Ausnahme von TXNDC11 und TXNDC15 zeigen alle in der Arbeit betrachteten humanen Thioredoxine ein klassisches C-terminales ER-Retentionsmotiv (KDEL, KKXX, oder RXR) oder eine Variante hiervon. Obwohl TXNDC11 kein solches Motiv trägt, konnte gezeigt werden, dass es sich bei TXNDC11 um ein ER-residentes Protein handelt (Timms et al. 2016), welches im Zuge von ER-Stress hochreguliert wird und am ERAD (ER Assoziierte Degradation) beteiligt ist (Timms et al. 2016). Bei genauer Betrachtung von TXNDC15 finden sich jedoch mindestens 4 potentielle lokalisationsrelevante Motive im kurzen C-Terminus. Ein YXXØ-Motiv, ein „Di-Leucin“-Motiv [D/E]XXXL[L/I], ein „Di-Acidic“-Motiv [D/E]X[D/E], und ein ØXØXØ-Motiv (D,E,I,L,Y = entsprechend dem Aminosäuren Einbuchstabencode, Ø = hydrophobe Aminosäure, X = beliebige Aminosäure). Bei diesen Motiven handelt es sich um Motive mit verschiedenen Funktionen. Das YXXØ-Motiv ist ein Internalisierungsmotiv von Proteinen in der Plasmamembran und unter gewissen Bedingungen (siehe unten) auch ein lysosomales Lokalisierungsmotiv (Rohrer et al. 1996; Bonifacino & Traub 2003; Lee et al. 2008). Dasselbe trifft auf das [D/E]XXXL[L/I] Motiv zu (Geisler et al. 1998; Bonifacino & Traub 2003; Pandey 2009). Das [D/E]X[D/E]-Motiv (Sato & Nakano 2007) sowie das ØXØXØ-Motiv (Otsu et al. 2013) stellen COPII-Bindemotive dar, die den Export von Proteinen aus dem ER zum Golgi hin vermitteln. Diese Motive sind meist in Proteinen anzutreffen, die nicht im ER retiniert werden. Für die YXXØ- und [D/E]XXXL[L/I]-Motive gelten noch Besonderheiten, die für Ihre Funktion von Wichtigkeit sind. Das YXXØ-Motiv funktioniert optimal als lysosomales Lokalisierungsmotiv, wenn ein Abstand von 6 – 13 Aminosäuren zur Transmembrandomäne gewährleistet ist (Rohrer et al. 1996; Braulke & Bonifacino 2009). Die Internalisierung aus der Plasmamembran wird durch eine Veränderung der Position des Motivs nicht beeinträchtigt (Rohrer et al. 1996). Auch begünstigt ein Glycin vor dem Tyrosin die lysosomale Lokalisierung des Proteins (Braulke & Bonifacino 2009). Beide Gegebenheiten werden von TXNDC15 nicht erfüllt. Für das [D/E]XXXL[L/I]-Motiv sollte der Abstand der sauren Aminosäure [D/E] von mindestens 6 Aminosäuren zur Transmembrandomäne bestehen (Geisler et al. 1998). Dies wird von TXNDC15 nicht erfüllt und es findet sich in der Motivsequenz von TXNDC15 (**ESIRWLI**) eine zusätzliche Aminosäure. Es gibt allerdings auch Motive (z.B.: **STQPLL** aus Interleukin-6), die sich über eine Serinphosphorylierung

an- und abschalten lassen (Dittrich et al. 1996; Geisler et al. 1998). Ein ähnliches Motiv findet sich auch in TXNDC15 (**SIRWLI**). Für eine optimale Phosphorylierung des Serins wird jedoch ein minimaler Abstand von 7 Aminosäuren zur Transmembrandomäne beobachtet (Geisler et al. 1998). Auch hier erfüllt TXNDC15 nicht den minimalen Abstand zur Transmembrandomäne. Ob die „Di-Leucin“ Motive dennoch als solche funktionell sind, bleibt zu untersuchen. Das [D/E]X[D/E]-Motiv findet sich in TXNDC15 in der Form von (**EQE**) und das ØXØXØ-Motiv (**IRWLI**) liegt in unabgewandelter Form vor.

5.3 Zusammenführung der Überexpressionsdaten

Von den in TXNDC15 beobachteten lokalisationsrelevanten Motiven würde man nicht von einer ER-Lokalisation von TXNDC15 ausgehen. C-terminal GFP-getaggtetes TXNDC15 wird jedoch im ER lokalisiert. Zellen, die dieses Konstrukt exprimieren, zeigen erhöhte ER-Stresslevel im Vergleich zu Zellen, die nur GFP exprimieren. Das C-Term getaggte GFP Konstrukt zeigt im Calcium Imaging auch den stärksten toxischen Phänotyp (Reduktion des TG-peak und des SOCE). Durch die Überexpression von C-terminal getaggteten TXNDC15 mit einer Deletion des gesamten katalytischen Bereichs kam es nur zu einer geringfügigen Reduktion (< 10%) des SOCE oder des TG-Peak. Dies bedeutet vermutlich, dass eine von TXNDC15 vermittelte Reaktion/Interaktion den toxischen Effekt verursacht und dieser nicht auf einer alleinigen Überexpression beruht. Die Toxizität könnte also entweder darauf beruhen, dass der C-terminale Tag die Lokalisation des Proteins verändert oder dessen natürliche Funktion stark beeinträchtigt. Die Mutation des putativen aktiven Cysteins (C220) ändert an dem toxischen Effekt des direkt getaggteten Konstrukts nur wenig. Erst die Mutation anderer, möglicherweise struktur- oder regulationsrelevanter Cysteine (C114 und C210) mindert die Reduktion des TG-Peak oder SOCE durch die Überexpression signifikant. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Chaperonfunktion mancher der Thioredoxine, die unabhängig von ihrer katalytischen Redoxreaktion ist (Kern et al. 2003; Shao et al. 2000). Beruht der toxische Effekt von C-terminal getaggtetem TXNDC15 also auf einer möglichen Chaperonfunktion, würde eine Mutation des redoxrelevanten Cysteins keinen Effekt haben. Eine Mutation strukturelevanter Cysteine könnte jedoch einen gravierenderen Einfluss auf eine mögliche Chaperonfunktion haben. Fungiert

TXNDC15 also als ER-Chaparon, hätte sich eine Hochregulation bei ER-Stressinduktion zeigen können, denn die Expression einiger ER-Chaparone wie GRP78 oder des Thioredoxin ERp44 kann durch Tunicamycin oder Thapsigarginbehandlung induziert werden (Anelli et al. 2002; Yoo et al. 2012). Eine Hochregulation von TXNDC15 lässt sich in Zellen jedoch nicht durch eine Behandlung mit Tunicamycin oder Thapsigargin beobachten. Allerdings ist zu beachten, dass auch im Fall des ER-residenten TMX4 eine Behandlung von HeLa-Zellen mit Tunicamycin oder Thapsigargin keine Induktion der TMX4-Transkription auslöst (Sugiura et al. 2010). Auch das ER-residente TMX3 zeigte keine mRNA Hochregulation durch Tunicamycin- oder DTT-Behandlung in HeLa Zellen (Haugstetter et al. 2005). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei TXNDC15 um ein ER-residentes Protein handelt, jedoch lässt sich eine Beteiligung von TXNDC15 an der „Unfolded Protein Response“ (UPR) weitgehend ausschließen.

Im Gegensatz zum C-terminal GFP-getaggten Konstrukt hatte die Überexpression der TXNDC15 IRES GFP oder der N-terminal getaggten mCherry-Variante wenig Einfluss auf den SOCE oder den ER-Calciumspeicher, vermutlich bedingt durch die gravierenden Unterschiede in der Lokalisation der getaggtten Konstrukte. Das C-terminal GFP-getaggtten Konstrukt verblieb im ER, wobei sich der Großteil der anderen Konstrukte entweder im Golgi und TGN (HA-TXNDC15 ohne Linker) oder den Lysosomen (mCherry-Konstrukte) fand. Lokalisationsunterschiede zwischen den N-terminal getaggtten Konstrukten könnten durch potentiell gestörten Interaktionen von TXNDC15 mit Proteinen oder Lipiden verursacht worden sein. Die Funktion der N-terminalen Region von TXNDC15 ist noch unbekannt. Möglicherweise vermittelt sie eine Interaktion von TXNDC15 mit anderen Faktoren (Proteine/Lipide); in diesem Fall würde ein kleiner HA-Tag wahrscheinlich weniger stören als der relativ große mCherry-Tag. Diese Annahme ist vor allem von Interesse, da für Golgi-Proteine mehrere Retentionsmechanismen diskutiert werden, die unter anderem auf der Wechselwirkung von Proteinen untereinander oder mit Lipiden basiert (Banfield 2011). Weitere Möglichkeiten zu Golgi Retention stellen die Länge der Transmembrandomäne oder das Vorhandensein bestimmter Lokisationsmotive im Protein dar (Banfield 2011). Da es für die Golgi-Retention kein einheitliches Muster zu geben scheint, ist es zu diesem Zeitpunkt schwierig, für TXNDC15 einen solchen Retentionsmechanismus vorherzusagen. Auch wenn viele Thioredoxine eine ER-

Lokalisation aufweisen, wäre eine Nicht-ER-Lokalisation nicht ungewöhnlich (Turano et al. 2002). Die Monothiol-Glutaredoxine GRX6 und GRX7 sind als cis-Golgi Proteine beschrieben worden mit ihrem aktiven Zentrum im Golgi Lumen (Mesecke et al. 2008). Das HA-getaggte TXNDC15 Konstrukt ohne Linker zeigt größtenteils eine Golgi Lokalisierung in HEKwt bzw. Jurkat E6-1 Zellen und eine ER luminal Orientierung des katalytischen N-Terminus in *in vitro* Transportexperimenten. Warum jedoch das mCherry-getaggte Konstrukt nicht in den Golgi, sondern in die Lysosomen lokalisiert, bleibt unbekannt. Es lassen sich zwei mögliche Optionen diskutieren. Einerseits könnte es sein, dass das HA-Konstrukt in den Lysosomen weitgehend degradiert wird oder das mCherry-Konstrukt fehllokalisiert. Eine mögliche lysosomale Degradation eines „kleinen“ V5-His6-tag wird in der folgenden Arbeit diskutiert: (Kollmann et al. 2005). Eine Degradation des HA-Tags kann nicht ausgeschlossen werden und eine lysosomale Lokalisation des HA-getaggen TXNDC15 würde somit verborgen bleiben. Dafür spricht, dass das HA-TXNDC15-Konstrukt ohne Linker im Westernblot durch eine Behandlung der Zellen mit dem lysosomalen Protonenpumpenhemmer CMA einen Anstieg an Proteinmenge im Vergleich zum mCherry-TXNDC15-Konstrukt verzeichnet. Dies könnte bedeuten, dass das TXNDC15 lysosomal stabil ist, aber der HA-Tag, der an TXNDC15 gekoppelt ist, degradiert wird. Es wäre daher denkbar, dass TXNDC15 kein reines Golgi-Protein ist, sondern im sekretorischen Weg zwischen Membran, Golgi und Lysosomen verkehrt. Die Hypothese wird durch das Vorhandensein klassischer Plasmamembraninternalisierungsmotive in TXNDC15 unterstützt. Weiterhin ließ sich HA getaggt TXNDC15 sowohl mit Markern für den Golgi und Clathrin umhüllten Vesikeln colokalisieren, ist aber auch auf der Plasmamembran von HEKwt-Zellen zu finden. Dass Thioredoxine teilweise zwischen Kompartimenten wechseln, zeigt ERp44, welches zwischen ER und Golgi pendelt (Sannino et al. 2014). ERp44 kann jedoch in bestimmten Zellen auch eine Oberflächenlokalisierung zeigen (Sannino et al. 2014). Ob es sich bei der in HEKwt-Zellen beobachteten Oberflächenlokalisierung von HA-getaggen TXNDC15 also um einen Artefakt der Überexpression oder einer Zelltyp-spezifischen Expression handelt, bleibt zurzeit ungeklärt. Möglicherweise kommt es aufgrund einer Überexpression des Proteins dazu, dass die Menge an TXNDC15 einen Golgi-Retentionsmechanismus überlastet und über den TGN in die Plasmamembran gelangt.

Für eine mCherry-induzierte Fehllokalisation von Fusionsproteinen findet sich in der Literatur folgendes Beispiel. Wird an das luminale Ende des Golgi-residenten Proteins GalT ein mCherry gekoppelt, so zeigt dieses eine lysosomale Lokalisation (Costantini et al. 2015). Auch handelt es sich bei mCherry um ein pH-stabiles Protein (Huang et al. 2014), das in den Lysosomen aufgrund einer nur langsamen Degradation akkumulieren kann. Für einige rote Fluorophore wurde diese Eigenschaft, in den Lysosomen zu akkumulieren, beschrieben (Katayama et al. 2008). GFP hingegen wird lysosomal schnell degradiert und kann unter bestimmten Umständen sogar Proteinaggregate formen (Katayama et al. 2008). Ein N-terminal GFP-getaggtetes GalT zeigt eine ER-Lokalisation aufgrund einer unnatürlichen Oligomerisierung der Fusionsproteine und einer damit einhergehenden Retention im ER (Costantini et al. 2015). Die Oligomerisierung von Fusionsproteinen könnte damit auch diverse off-target-Effekte innerhalb des ER herbeiführen (Costantini et al. 2015). Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung für die ER-stressauslösende Wirkung von C-terminal GFP-getaggttem TXNDC15. Für eine Oligomer-bedingte Toxizität spricht, dass sich der TG-Peak und der SOCE erholen, wenn man die ER-luminale Domäne des TXNDC15-GFP Fusionsproteins deletiert. Aufgrund der Deletion verbleibt nur noch ein kleines Fragment des Proteins im Lumen des ER, welches dann möglicherweise weniger ER-Stress als das volllängen-GFP-Konstrukt oder die Cystein-Mutanten verursacht. Unterstützt wird diese Theorie auch davon, dass bei GFP getaggttem TXNDC15 als einziges ein Abbauprodukt (monomeres GFP) des Fusionsproteins im Blot sichtbar war. Viele terminal fehlgefaltete Proteine des ER werden dem ERAD zugeführt und degradiert.

Die Lokalisationsunterschiede zwischen den beiden HA-getaggtten Konstrukten lassen sich nicht eindeutig erklären. Das HA-Konstrukt mit Linker ließ sich in *in vitro* Experimenten nur schlecht translatieren. Das Konstrukt ohne Linker war hingegen gut zu translatieren und zeigte eine Signalpeptidabspaltung, Glykosylierung und den Import über die ER-Membran. Es wird daher angenommen, dass sich das Protein weitgehend wie der Wildtyp verhält. Dieser Versuchsteil unterstützte die bioinformatische Annahme, dass es sich bei TXNDC15 um ein Typ 1-Transmembranprotein handelt. Die Behandlung der rauen Mikrosomen mit Proteinase K verursachte keine sichtbare Größenveränderung von TXNDC15 im Gel. Dies bestätigt, dass TXNDC15 durch die ER-Membran größtenteils geschützt wurde. Eine Abspaltung des kleinen C-Terminus von ca. 18 Aminosäuren Länge durch die

Proteinase K wäre eventuell aufgrund der geringen Größenveränderung im Gel nicht sichtbar gewesen. TXNDC15 wird jedoch nicht gänzlich ins ER importiert, da N-terminal getaggttes HA-TXNDC15 in der Plasmamembran von unpermeabilisierten HEKwt-Zellen über eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden konnte. Warum sich nur eines der HA-Konstrukte gut translatieren ließ, konnte nicht geklärt werden. Allerdings wurde in beiden Konstrukten durch Sequenzierung das Vorhandensein des T7-Promotors nachgewiesen, der essentiell für das Gelingen der *in vitro* Translation ist. In HEKwt- und Jurkat E6-1-Zellen exprimierten beide Konstrukte ähnlich gut und sind sowohl in immunhistochemischen sowie in Western Blot Experimenten durch Antikörper nachweisbar. Für mCherry-Fusionsproteine wurde der Effekt von Linkern auf die Lokalisation des Fusionsproteins untersucht (Huang et al. 2014). Verschiedene Linker führten hier zu veränderter Lokalisation und Spaltung des Proteins. Ein Lokalisationsunterschied durch eine veränderte Spaltung bzw. Prozessierung der beiden HA-Konstrukte ist daher denkbar. Die **Abb. 5.2** fasst die Ergebnisse bezüglich Lokalisationsunterschiede der TXNDC15-Konstrukte zusammen.

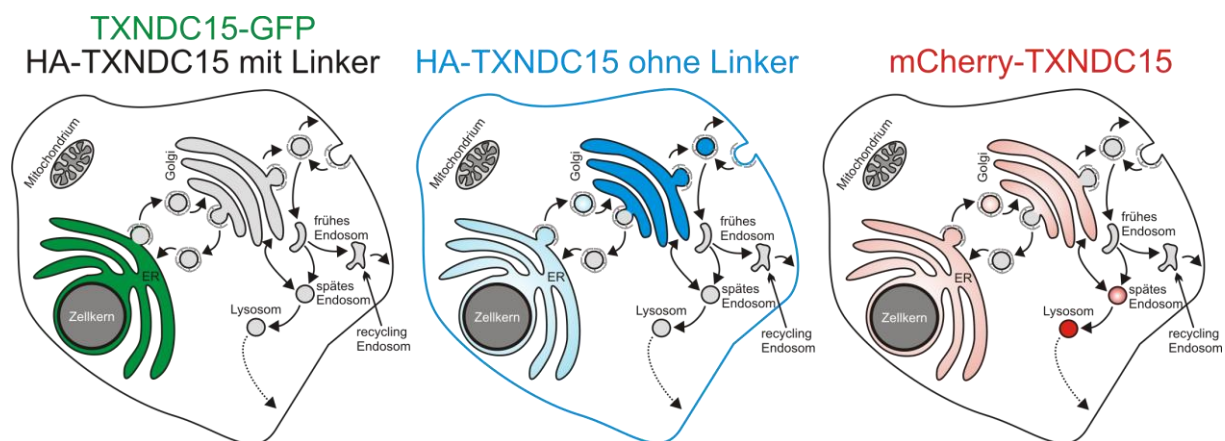


Abbildung 5.2: Zusammenfassung der beobachteten Lokalisation der Konstrukte. Die in Jurkat E6-1- und HEKwt-Zellen beobachtete Lokalisation des C-terminal GFP-getaggtten TXNDC15, N-terminal HA-getaggtten TXNDC15 mit/ohne Linker und des N-terminal mCherry-getaggtten TXNDC15 mit Linker. Für das HA-TXNDC15 Konstrukt ohne Linker zeigte sich in Jurkat E6-1-Zellen jedoch eine reine Golgi-Lokalisation, wohingegen in HEKwt-Zellen noch zusätzlich eine TGN- und Plasmamembran-Lokalisation beobachtet wurde.

Trotz der deutlichen Unterschiede in der Lokalisation zeigen alle im Calcium-Imaging getesteten WT-Konstrukte eine Reduktion des SOCE (C-terminal GFP getaggtetes TXNDDC15 von 60%, TXNDC15 IRES-GFP von 10% und N-terminal mCherry getaggtetes TXNDC15 von 20%) im Vergleich zur Kontrolle. Dies könnte auf eine Veränderung des Redoxmilieus innerhalb der Zellen durch die TXNDC15-Überexpression deuten. Da Orai1-Kanäle durch eine Oxidation inhibiert werden (Bogeski et al. 2010), könnte dies als indirektes Indiz für eine oxidative Veränderung des Redoxzustandes in den Zellen sprechen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die zuvor beschriebene Erniedrigung des SOCE nicht beobachtet wurde wenn TXNDC15 IRES GFP überexpmierende Zellen zuvor mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden. Ob dies jedoch an einer direkten Interaktion von TXNDC15 mit ORAI1 oder an einer indirekten Beeinflussung durch eine Veränderung des zellulären Redoxmilieus liegt muss noch untersucht werden.

5.4 Glykosylierungsmuster verschiedener Konstrukte in HEKwt-Zellen

Verschieden Konstrukte führten zu verschiedenen Ergebnissen in Bezug auf die Calciumsignale, Lokalisation und ER-Stress. In HEKwt-Zellen ist die Glykosylierung von der Lokalisation des getaggtten Proteins unabhängig. TXNDC15 zeigt trotz deutlich veränderter Lokalisation der getaggtten Proteine immer eine mannosereiche N-Glykosylierung. Obwohl bei vielen Proteinen, die das ER verlassen, die mannosereiche Glykosylierung im Golgi zu einer komplexen Glykosylierung modifiziert wird, muss dies nicht zwangsläufig geschehen (An et al. 2012). Warum diese bei TXNDC15-Konstrukten, die das ER verlassen, nicht stattfindet, bleibt unbeantwortet. Aus dem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass ein Import von TXNDC15 unabhängig vom Tag ins ER stattfindet, da sonst eine N-Glykosylierung nicht erfolgen könnte. Alle Konstrukte zeigen zudem Anzeichen für die Glykosylierung mehrerer N-Glykosylierungsstellen. Dies ist an der Größe der Verschiebung der Proteinbanden nach der Behandlung mit PNGase F oder Endo H im Westernblot zu erkennen. Die Größendifferenz zwischen unbehandeltem und behandeltem Protein beträgt ca. 20 kDa, was für die N-Glykosylierung von bis zu 6 Stellen sprechen könnte, da ein N-Glykan im Durchschnitt 1,5 bis 3 kDa Masse besitzt (Freeze & Kranz 2010). In Versuchen zur *in vitro* Translation führte eine Behandlung der SPC's mit dem Glykosylierungshemmer NYT zu einem

Proteinschleier und nicht zu deutlichen Banden, wie dies selbst bei einer einfachen Glykosylierung zu erwarten wäre (glykosylierte + unglykosylierte Bande). Dies wird durch NYT als kompetitiver Glykosylierungshemmer verursacht, da unterschiedlich häufig glykosylierte Fraktionen entstehen können. Wie viele der sieben potentiellen N-Glykosylierungsstellen tatsächlich glykosyliert werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Eine O-Glykosylierung, wie sie im Golgi stattfinden kann (Röttger et al. 1998; Gill et al. 2011), wurde bei keinem der Konstrukte in HEKwt-Zellen beobachtet. Ob TXNDC15 jedoch in anderen Zelltypen eine komplexe N-Glykosylierung oder gar eine O-Glykosylierung aufweist, kann nicht ausgeschlossen werden, da Glykosylierungsmuster von Proteinen zwischen Zelltypen variieren können (Dörr et al. 2016). Eine veränderte Lokalisation des Proteins hatte jedoch keine Änderung der Glykosylierungsmuster in dieser Arbeit zur Folge.

5.5 Möglicher Ausblick

Für dieses Projekt sollte als nächstes ein funktionierender Antikörper produziert werden, um damit die Lokalisation und das Glykosylierungsmuster des endogenen TXNDC15 zu überprüfen. Zusätzlich sollten mehrere TXNDC15-Knockout-Zelllinien mit Hilfe des CRISPR/Cas9 System generiert werden, um damit die Funktion von TXNDC15 zu untersuchen. Diese Knockoutzellen sollten auf Veränderungen ihres Eisen- oder Iod-Stoffwechsels untersucht werden. Eine Beteiligung an dem zellulären Eisenstoffwechsel stellt eine mögliche Funktion von TXNDC15 dar, da Monothiol-Glutaredoxine mit einem CXFS-Motiv an der Eisen-Schwefel-Clusterbildung beteiligt sind. Für eine Untersuchung der Veränderung der Iod-Aufnahme könnte sich die FRTL-Zelllinie aus der Ratte (ATCC; CRL-1468), die humanen Zelllinien 8305C (DMSZ; ACC 133) oder B-CPAP (DMSZ; ACC 273) eignen. Eine mögliche Beteiligung an dem Iodstoffwechsel erklärt sich durch die hohe Expressionsrate von TXNDC15 in der Schilddrüse. Bei einem Vergleich der mRNA Expressionslevel über das BIOGPS Internetportal (Wu et al. 2009; Wu et al. 2013) weist TXNDC15, wie auch die DUOX1 oder DUOX2, sehr hohe Expressionslevel in der Schilddrüse im Vergleich zu anderen Geweben auf (betrachteter Datensatz: GeneAtlas U133A (Su et al. 2004)). Die DUOX Enzyme sind wichtig für die Bildung von Schilddrüsenhormonen und zeigen daher eine entsprechend hohe Expression in der

Schilddrüse (Wang et al. 2005; Carvalho & Dupuy 2013). Die Thioreduktase (EFP1) wurde bereits als ein Interaktionspartner der DUOX beschrieben (Wang et al. 2005). Ein Großteil der DUOX befindet sich im inaktiven Zustand im ER, muss jedoch, um aktiv werden zu können, über den Golgi zur Membran transportiert werden (Wang et al. 2005). Eine Beteiligung von TXNDC15 an der Reifung der DUOX-Proteine oder dem Transport zur Membran wäre denkbar.

6 Literaturverzeichnis

- Akopian, D. et al., 2013. *Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine.*, Available at: http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biochem-072711-164732?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed\http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-072711-164732?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pu.
- An, H.J. et al., 2012. Extensive Determination of Glycan Heterogeneity Reveals an Unusual Abundance of High Mannose Glycans in Enriched Plasma Membranes of Human Embryonic Stem Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4), pp.M111.010660–M111.010660. Available at: <http://www.mcponline.org/cgi/doi/10.1074/mcp.M111.010660> [Accessed August 11, 2016].
- Anelli, T. et al., 2002. ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *The EMBO journal*, 21(4), pp.835–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847130> [Accessed August 12, 2016].
- Anelli, T. et al., 2003. Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: The role of ERp44. *EMBO Journal*, 22(19), pp.5015–5022.
- Asehnoune, K. et al., 2005. Involvement of PKC α/β in TLR4 and TLR2 dependent activation of NF- κ B. *Cellular Signalling*, 17(3), pp.385–394.
- Banfield, D.K., 2011. Mechanisms of Protein Retention in the Golgi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), pp.a005264–a005264. Available at: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a005264> [Accessed August 10, 2016].
- Barlowe, C. & Helenius, A., 2016. Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway. *Annual review of cell and developmental biology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298089> [Accessed October 6, 2016].
- Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T., 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(3), pp.343–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3031035&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2016].
- Benkert, P., Künzli, M. & Schwede, T., 2009. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic acids research*, 37(Web Server issue), pp.W510–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2703985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 18, 2016].
- Benkert, P., Schwede, T. & Tosatto, S.C., 2009. QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. *BMC structural biology*, 9, p.35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2709111&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 8, 2016].
- Benkert, P., Tosatto, S.C.E. & Schomburg, D., 2008. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, 71(1), pp.261–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932912> [Accessed May 6, 2016].
- Benyair, R., Ogen-Shtern, N. & Lederkremer, G.Z., 2015. Glycan regulation of ER-associated degradation through compartmentalization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 41, pp.99–109.
- Bogeski, I. et al., 2010. Differential Redox Regulation of ORAI Ion Channels: A Mechanism to Tune Cellular Calcium Signaling. *Science Signaling*, 3(115).
- Böhm, J. et al., 2013. Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *American journal of human genetics*, 92(2), pp.271–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23332920> [Accessed September 21, 2016].
- Bolte, S. & Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224(Pt 3), pp.213–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210054> [Accessed November 17, 2014].
- Bonifacino, J.S. & Traub, L.M., 2003. Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes*. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), pp.395–447. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800> [Accessed August 12, 2016].
- Braulke, T. & Bonifacino, J.S., 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), pp.605–614. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.016>.
- Buchanan, B.B. & Balmer, Y., 2005. REDOX REGULATION: A Broadening Horizon. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), pp.187–220. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144246> [Accessed August 23, 2016].
- Carvalho, D.P. & Dupuy, C., 2013. Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *European thyroid journal*, 2(3), pp.160–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847449> [Accessed July 20, 2016].
- Cha, S.K. et al., 2008. An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(34), pp.23062–23072.
- Chakrabarti, A. et al., 1999. Thermodynamics of replacing an alpha-helical Pro residue in the P40S mutant of Escherichia coli thioredoxin. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 8(11), pp.2455–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10595549> [Accessed August 11, 2016].
- Chivers, P.T., Laboisnière, M.C. & Raines, R.T., 1996. The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell. *The EMBO journal*, 15(11), pp.2659–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8654363> [Accessed August 11, 2016].

- Collet, J.-F. & Messens, J., 2010. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants & redox signaling*, 13(8), pp.1205–1216.
- Costantini, L.M. et al., 2015. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. *Nature Communications*, 6, p.7670. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms8670> [Accessed August 10, 2016].
- Dittrich, E. et al., 1996. A Di-leucine Motif and an Upstream Serine in the Interleukin-6 (IL-6) Signal Transducer gp130 Mediate Ligand-induced Endocytosis and Down-regulation of the IL-6 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), pp.5487–5494. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.271.10.5487> [Accessed August 12, 2016].
- Dörr, K. et al., 2016. Cell type–specific glycosylation of Orai1 modulates store-operated Ca²⁺ entry. *Science Signaling*, 9(418).
- Eklund, H., Gleason, F.K. & Holmgren, A., 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 11(1), pp.13–28. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/prot.340110103> [Accessed August 11, 2016].
- Fernandes, A.P. et al., 2005. A Novel Monothiol Glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli Can Serve as a Substrate for Thioredoxin Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), pp.24544–24552. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M500678200> [Accessed August 24, 2016].
- Feske, S. et al., 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), pp.179–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582901> [Accessed August 26, 2016].
- Feske, S., Skolnik, E.Y. & Prakriya, M., 2012. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 12(7), pp.532–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699833> [Accessed September 21, 2016].
- Freeze, H.H. & Kranz, C., 2010. Endoglycosidase and glycoamidase release of N-linked glycans. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.], Chapter 17, p.Unit 17.13A. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20069534> [Accessed August 19, 2016].
- Garcia-Pino, A. et al., 2009. Coupling of Domain Swapping to Kinetic Stability in a Thioredoxin Mutant. *Journal of Molecular Biology*, 385(5), pp.1590–1599.
- Geisler, C. et al., 1998. Leucine-based Receptor Sorting Motifs Are Dependent on the Spacing Relative to the Plasma Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), pp.21316–21323. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.33.21316> [Accessed August 12, 2016].
- Gelhay, E., Rouhier, N. & Jacquot, J.P., 2003. Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Letters*, 555(3), pp.443–448.
- Gill, D.J., Clausen, H. & Bard, F., 2011. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends in Cell Biology*, 21(3), pp.149–158.
- Gleason, F.K., 1992. Mutation of conserved residues in Escherichia coli thioredoxin: effects on stability and function. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 1(5), pp.609–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304360> [Accessed August 11, 2016].
- Grosse, J. et al., 2007. An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), pp.3540–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965774> [Accessed August 26, 2016].
- Gupta, R., Jung, E. & Brunak, S., 2004. *NetNGlyc: Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.*, Available at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>.
- Gwack, Y. et al., 2007. Signalling to transcription: Store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium*, 42(2), pp.145–156.
- Haugstetter, J., Blicher, T. & Ellgaard, L., 2005. Identification and Characterization of a Novel Thioredoxin-related Transmembrane Protein of the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp.8371–8380. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M413924200> [Accessed August 12, 2016].
- Haunhorst, P. et al., 2010. Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(2), pp.372–376. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.016>.
- Haunhorst, P. et al., 2013. Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation. *Molecular biology of the cell*, 24(12), pp.1895–903. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3681695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Herrero, E. & De La Torre-Ruiz, M.A., 2007. Monothiol glutaredoxins: A common domain for multiple functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12), pp.1518–1530.
- Hitoshi, N., Ken-ichi, Y. & Jun-ichi, M., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), pp.193–199.
- Hoshino, T. et al., 2003. Redox-active protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(9), pp.1075–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816738> [Accessed August 23, 2016].
- Hotta, M. et al., 1998. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *The Journal of experimental medicine*, 188(8), pp.1445–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9782121> [Accessed August 23, 2016].
- Huang, L. et al., 2014. Potential pitfalls and solutions for use of fluorescent fusion proteins to study the lysosome. *PloS one*, 9(2), p.e88893. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586430> [Accessed August 10, 2016].
- Kallberg, M. et al., 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7(8),

- pp.1511–1522. Available at: <http://www.nature.com/nprot/journal/v7/n8/pdf/nprot.2012.085.pdf>. <Go to ISI>://000306845200007
- Katayama, H. et al., 2008. GFP-like Proteins Stably Accumulate in Lysosomes. *CELL STRUCTURE AND FUNCTION*, 33, pp.1–12.
- Kern, R. et al., 2003. Chaperone properties of Escherichia coli thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 371, pp.965–972.
- Kollmann, K. et al., 2005. Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *PROTEOMICS*, 5(15), pp.3966–3978. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200401247> [Accessed August 10, 2016].
- Krogh, A. et al., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), pp.567–80. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600943158> [Accessed July 9, 2014].
- Lakkaraju, A.K.K. et al., 2008. SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. *Cell*, 133(3), pp.440–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18455985> [Accessed August 19, 2016].
- de Lamotte-Guéry, F. et al., 1997. Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha2 helix of Escherichia coli thioredoxin. *Protein engineering*, 10(12), pp.1425–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9543004> [Accessed August 11, 2016].
- Lappi, A.K. et al., 2004. A Conserved Arginine Plays a Role in the Catalytic Cycle of the Protein Disulphide Isomerases. *Journal of Molecular Biology*, 335(1), pp.283–295.
- Lee, I. et al., 2008. Binding of cargo sorting signals to AP-1 enhances its association with ADP ribosylation factor 1-GTP. *The Journal of cell biology*, 180(3), pp.467–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250197> [Accessed August 12, 2016].
- Lee, K.-Y. et al., 2005. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF-kappaB activation. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5718), pp.114–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802604> [Accessed August 26, 2016].
- Liou, J. et al., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current biology: CB*, 15(13), pp.1235–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16005298> [Accessed August 26, 2016].
- Markello, T. et al., 2015. York platelet syndrome is a CRAC channelopathy due to gain-of-function mutations in STIM1. *Molecular genetics and metabolism*, 114(3), pp.474–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25577287> [Accessed September 21, 2016].
- Masutani, H., Ueda, S. & Yodoi, J., 2005. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 12, pp.991–998. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4401625> [Accessed August 23, 2016].
- Matsui, M. et al., 1996. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Developmental biology*, 178(1), pp.179–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812119> [Accessed August 23, 2016].
- Mercer, J.C. et al., 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of biological chemistry*, 281(34), pp.24979–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807233> [Accessed September 21, 2016].
- Mesecke, N. et al., 2008. A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Molecular biology of the cell*, 19(6), pp.2673–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400945> [Accessed July 22, 2016].
- Meyer, Y. et al., 2009. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annual Review of Genetics*, 43(1), pp.335–367. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-102108-134201> [Accessed August 23, 2016].
- Miederer, A.-M. et al., 2015. A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 6, p.6899. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms7899> [Accessed June 8, 2016].
- Misceo, D. et al., 2014. A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome. *Human mutation*, 35(5), pp.556–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24619930> [Accessed September 21, 2016].
- Nakajima, S. et al., 2011. Inhibition of NF- κ B by MG132 through ER stress-mediated induction of LAP and LIP,
- Nufer, O. et al., 2002. Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *Journal of cell science*, 115(Pt 3), pp.619–628.
- Oliver, J.D. et al., 1999. ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Molecular biology of the cell*, 10(8), pp.2573–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436013> [Accessed August 18, 2016].
- Otsu, W. et al., 2013. A New Class of Endoplasmic Reticulum Export Signal X X for Transmembrane Proteins and Its Selective Interaction with Sec24C. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), pp.18521–18532. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.443325> [Accessed July 20, 2016].
- Pan, J.L. & Bardwell, J.C. a., 2006. The origami of thioredoxin-like folds. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 15(10), pp.2217–2227.
- Pandey, K.N., 2009. Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14, pp.5339–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482617> [Accessed August 12, 2016].
- Park, C.Y. et al., 2009. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), pp.876–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19249086> [Accessed August 26, 2016].
- Peinelt, C. et al., 2006. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature cell biology*, 8(7), pp.771–3.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16733527> [Accessed September 21, 2016].
- Petersen, T.N. et al., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10), pp.785–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701> [Accessed July 10, 2014].
- Picard, C. et al., 2009. *STIM1* Mutation Associated with a Syndrome of Immunodeficiency and Autoimmunity. *New England Journal of Medicine*, 360(19), pp.1971–1980. Available at: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0900082> [Accessed September 21, 2016].
- Prakriya, M. et al., 2006. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), pp.230–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921383> [Accessed September 21, 2016].
- Prins, D. et al., 2011. Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO reports*, 12(11), pp.1182–1188. Available at: <http://embor.embopress.org/cgi/doi/10.1038/embor.2011.173> [Accessed August 26, 2016].
- Raykhel, I. et al., 2007. A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *The Journal of Cell Biology*, 179(6).
- Rodríguez-Manzaneeque, M.T. et al., 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(12), pp.8180–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567543> [Accessed August 26, 2016].
- Rodríguez-Manzaneeque, M.T. et al., 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Molecular biology of the cell*, 13(4), pp.1109–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950925> [Accessed July 22, 2016].
- Rohrer, J. et al., 1996. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *The Journal of cell biology*, 132(4), pp.565–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647888> [Accessed August 12, 2016].
- Röttger, S. et al., 1998. Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *Journal of cell science*, 111 (Pt 1), pp.45–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394011>.
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, 5(4), pp.725–738.
- Roy, A., Yang, J. & Zhang, Y., 2012. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic acids research*, 40(Web Server issue), pp.W471–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22570420> [Accessed August 10, 2016].
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J. & Gilmore, R., 2009. Cotranslational and Posttranslational N-Glycosylation of Polypeptides by Distinct Mammalian OST Isoforms. *Cell*, 136(2), pp.272–283.
- Sannino, S. et al., 2014. Progressive quality control of secretory proteins in the early secretory compartment by ERp44. *Journal of cell science*, 127(Pt 19), pp.4260–9. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/127/19/4260.long>.
- Sato, K. & Nakano, A., 2007. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters*, 581(11), pp.2076–2082.
- Sato, N. et al., 1995. Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(7), pp.3194–203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7897207> [Accessed August 23, 2016].
- Schenk, H. et al., 1994. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), pp.1672–1676. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.5.1672> [Accessed August 23, 2016].
- Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), pp.676–82. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019> [Accessed July 9, 2014].
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089> [Accessed July 9, 2014].
- Shao, F. et al., 2000. DsbG, a Protein Disulfide Isomerase with Chaperone Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), pp.13349–13352. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.18.13349> [Accessed August 10, 2016].
- Shao, S. & Hegde, R.S., 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp.25–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4163802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sharma, S. et al., 2013. An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry. *Nature*, 499(7457), pp.238–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23792561> [Accessed September 17, 2013].
- Shaw, P.J. et al., 2013. Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(15), pp.2637–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052215> [Accessed August 26, 2016].
- Shi, Z.Z. et al., 2000. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), pp.5101–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805773> [Accessed August 23, 2016].
- Stathopulos, P.B. et al., 2006. Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *The Journal of biological chemistry*, 281(47), pp.35855–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17020874> [Accessed September 21, 2016].
- Steentoft, C. et al., 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *The EMBO*

- journal, 32(10), pp.1478–88. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 25, 2016].
- Stevenson, J., Huang, E.Y. & Olzmann, J.A., 2016. Endoplasmic Reticulum – Associated Degradation and Lipid Homeostasis. *Annual review of nutrition*, (May), pp.1–32.
- Sturley, S.L., Sturley, S.L. & Raines, R.T., 1995. The Essential Function of Protein-disulfide Isomerase Is to Unscramble Non-native Disulfide Bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(47), pp.28006–28009. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.270.47.28006> [Accessed August 11, 2016].
- Su, A.I. et al., 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp.6062–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075390> [Accessed July 20, 2016].
- Sugiura, Y. et al., 2010. Novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), pp.7135–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056998> [Accessed June 13, 2016].
- Tannous, A. et al., 2015. N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Seminars in cell & developmental biology*, 41, pp.79–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534658> [Accessed August 18, 2016].
- Taylor, C.W. & Tovey, S.C., 2010. IP3 Receptors: Toward Understanding Their Activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), pp.a004010–a004010. Available at: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a004010> [Accessed August 26, 2016].
- Timms, R.T. et al., 2016. Genetic dissection of mammalian ERAD through comparative haploid and CRISPR forward genetic screens. *Nature communications*, 7, p.11786. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283361> [Accessed July 19, 2016].
- Turano, C. et al., 2002. Proteins of the PDI family: Unpredicted non-ER locations and functions. *Journal of Cellular Physiology*, 193(2), pp.154–163.
- Walter, P. & Blobel, G., 1983. Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods in enzymology*, 96, pp.84–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6656655> [Accessed September 12, 2016].
- Wang, D. et al., 2005. Identification of a Novel Partner of Duox: EFP1, A THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), pp.3096–3103. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M407709200> [Accessed July 19, 2016].
- Watts, C., Wickner, W. & Zimmermann, R., 1983. M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(10), pp.2809–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6344069> [Accessed September 12, 2016].
- Wu, C. et al., 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome biology*, 10(11), p.R130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19919682> [Accessed July 20, 2016].
- Wu, C., Macleod, I. & Su, A.I., 2013. BioGPS and MyGene.info: organizing online, gene-centric information. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), pp.D561–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175613> [Accessed July 20, 2016].
- Yan, B.X. & Sun, Y.Q., 1997. Glycine Residues Provide Flexibility for Enzyme Active Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 272(6), pp.3190–3194. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.6.3190> [Accessed August 11, 2016].
- Yang, J. et al., 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), pp.7–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yang, J. & Zhang, Y., 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*, 43(W1), pp.W174–181. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/long/43/W1/W174>.
- Yeromin, A. V et al., 2006. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443(7108), pp.226–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921385> [Accessed September 21, 2016].
- Yoo, S.-A. et al., 2012. A novel pathogenic role of the ER chaperone GRP78/BiP in rheumatoid arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(4), pp.871–886. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20111783> [Accessed August 12, 2016].
- Zeidan, Q. & Hart, G.W., 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *Journal of cell science*, 123(Pt 1), pp.13–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20016062> [Accessed August 19, 2016].
- Zhang, Y., 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 9(1), p.40. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/40>.
- Zheng, L. et al., 2008. Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(1), pp.240–246.
- Zheng, Y. & Shen, X., 2005. H₂O₂ directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells. *Redox report: communications in free radical research*, 10(1), pp.29–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829109> [Accessed October 10, 2016].

7 Publikationen und Danksagung

7.1 Bisherige Publikationen

I Straub, F Mohr, J Stab, [M Konrad](#), SE Philipp, J Oberwinkler, and M Schaefer. 2013. "Citrus Fruit and Fabacea Secondary Metabolites Potently and Selectively Block TRPM3." *British journal of pharmacology* 168(8): 1835–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190005>

Straub, Isabelle, Ute Krugel, Florian Mohr, Jens Teichert, Oleksandr Rizun, [Maik Konrad](#), Johannes Oberwinkler, and Michael Schaefer. 2013. "Flavanones That Selectively Inhibit TRPM3 Attenuate Thermal Nociception In Vivo." *Molecular pharmacology* 84(5): 736–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24006495>

A Drews, F Mohr, O Rizun, T F Wagner, S Dembla, S Rudolph, S Lambert, [M Konrad](#), SE Philipp, M Behrendt, S Marchais-Oberwinkler, DF Covey, and J Oberwinkler. 2014. "Structural Requirements of Steroidal Agonists of Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) Cation Channels." *British journal of pharmacology* 171(4): 1019–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24251620>

Tóth, Balázs I, [Maik Konrad](#), Debapriya Ghosh, Florian Mohr, Christian R Halaszovich, Michael G Leitner, Joris Vriens, Johannes Oberwinkler, and Thomas Voets. 2015. "Regulation of the Transient Receptor Potential Channel TRPM3 by Phosphoinositides." *The Journal of general physiology* 146(1): 51–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26123194>

Michael G Leitner, Niklas Michel, Marc Behrendt, Marlen Dierich, Sandeep Dembla, Bettina U Wilke, [Maik Konrad](#), Moritz Lindner, Johannes Oberwinkler and Dominik Oliver. 2016. „Direct modulation of TRPM4 and TRPM3 channels by the phospholipase C inhibitor U73122." *British journal of pharmacology* 173(16): 2555–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27328745>

7.2 Danksagung

Als aller erstes möchte ich meinen Betreuern und Kollegen danken, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

- Mein ganz besonderer Dank gebührt Barbara Niemeyer und Markus Hoth, die mich in Ihrer Abteilung aufgenommen haben und stets unterstützt haben.
- Auch möchte ich mich bei meinen „Leidensgenossen“ Ivan Bogeski und Xin Zhang für die Unterstützung auf dem Gebiet der Thioredoxinforschung bedanken.
- Ein besonderer Dank gilt natürlich auch der Arbeitsgruppe Niemeyer, bestehend aus: Kathrin Dörr, Anna-Maria Miederer, Sarah Kircher, Dalia Alansary, Gertrud Schwär und Nadine Schönwiese.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Büro, da sie in allen Lebenslagen für mich da waren. Für all die moralische Unterstützung, für die aufbauenden Worte wenn es mal schlecht lief und für die Worte, die mich auf den Boden der Tatsachen zurückholten, wenn es mal gut lief.

- Hier gebührt mein Dank Kim Friedmann, Adrian Angenendt, Arne Knörck, aber auch Kathrin Dörr und Petra Fries.

Auch bei Isabel Schirra möchte ich mich für die Unterstützung und ihr Verständnis, für meine wechselnden Launen während der Anfertigung der Doktorarbeit, bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Großeltern und Geschwistern bedanken, die immer für mich da waren und die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin.

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

1. Das entfernen eines vorzeitigen Start-Methionins in den Konstrukten: „pMax TXNDC15 IRES GFP“, „pMax HA-TXNDC15 IRES GFP“ und „pMax HA-TXNDC15“ (Kapitel 3.1) wurde von Nadine Schönwiese unter meiner Anleitung durchgeführt.
2. Die in Kapitel 3.9 beschriebene Methode (Durchflusszytometrie) sowie deren Auswertung erfolgte unter der Anleitung von Arne Knörk.
3. Die Durchführung der qRT-PCR (Kapitel 3.10) und die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse meiner Proben erfolgte durch Gertrud Schwär
4. Die in Kapitel 3.13 beschriebenen Methoden (SPC Präparation, *in vitro* Transkription, Translation und Transport) sowie deren Auswertung erfolgte unter der Anleitung von Anke Ziska
5. Die Herstellung der Calcium-Imaging-Lösungen erfolgte durch Gertrud Schwär und Petra Fries.
6. Die Kultivierung und das Passagieren der Jurkat E6-1- und HEKwt-Zellen erfolgte durch Cora Hoxha, Gertrud Schwär, Nadine Schönwies, Petra Fries und Sandra Janku.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten