

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Charakterisierung der Funktionen und Regulationsmechanismen
des humanen Sec61 Komplexes auf zellulärer Ebene**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

vorgelegt von: Sven Lang

geb. am: 23.07.1982 in Lebach

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis und Ein- beziehungsweise Dreibuchstabencode der Aminosäuren	8
I Zusammenfassung/Abstract	11
II Einleitung	13
<i>II.1 Das ER: ein multifunktionales Organell</i>	13
<i>II.2 Proteintransport zum ER („targeting“)</i>	15
II.2.1 Die Signalsequenz – eine entscheidende Determinante der Zielsteuerung	15
II.2.1.1 SRP-abhängiger Proteintransport zur ER Membran (cotranslational)	17
II.2.1.2 SRP-unabhängiger Proteintransport zum ER (posttranslational)	19
II.2.1.3 Zielsteuerungsmechanismen der „tail-anchor“ Membranproteine	20
<i>II.3 Signalsequenzinsertion an der ER Membran</i>	25
II.3.1 (Spontane) Membraninsertion und -integration der „tail-anchor“ Proteine	25
II.3.2 Der Sec61 Komplex: Schlüsselkomponente der Membraninsertion	27
II.3.3 Die ER Translokase	31
II.3.3.1 Akzessorische Membranproteine des Translokons ohne J-Domäne	31
II.3.3.2 Akzessorische Membranproteine des Translokons mit J-Domäne	33
II.3.3.3 Luminale Komponenten des Translokons	35
<i>II.4 Termination des Proteintransports zum ER</i>	37
<i>II.5 Kalziumhomöostase des ER</i>	39
II.5.1 Kalziumeigenschaften	39
II.5.2 Kalziumpuffernde Chaperone des ER	40
II.5.3 Passive Kalziumkanäle („leak“ Kanäle)	40
II.5.4 Aktive Kalziumpumpen (SERCA)	41
II.5.5 Weitere Einflussfaktoren der ER Kalziumhomöostase (MAM und SOCE)	41
II.5.5.1 MAM: Mitochondrien-assoziierte ER Membran	42
II.5.5.2 SOCE: „store-operated calcium entry“	42
II.5.5.3 Elimination toxischer Kalziumsignale	43
<i>II.6 Zielsetzung der Arbeit</i>	44
III Material und Methoden	45
<i>III.1 Materialien</i>	45
III.1.1 Geräte, zugehörige Software und Verbrauchsmaterialien	45
III.1.2 Chemikalien und gekaufte sekundäre Antikörper	46
III.1.3 Enzyme	48
III.1.4 (Primäre) Antikörper	48
III.1.5 Oligonukleotide	50
III.1.5.1 Verwendete DNA-Oligonukleotide (Primer)	50

III.1.5.2	Verwendete RNA-Oligonukleotide (siRNA)	50
III.1.6	Plasmide	51
III.1.6.1	Plasmide zur Transfektion von Zelllinien	51
III.1.6.2	Plasmide und PCR-Produkte zur <i>in vitro</i> Synthese von Transportsubstraten.....	51
III.1.7	Raue Mikrosomen	52
III.1.8	Bakterienstämme	53
III.1.9	Zelllinien	53
III.2	<i>Analysemethoden/-grundlagen der Proteinbiochemie</i>	54
III.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
III.2.2	Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
III.2.3	Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue	56
III.2.4	Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membranen (Western Blot).....	57
III.2.5	Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	58
III.2.6	Autoradiographie durch „Phosphorimaging“	59
III.2.7	Densitometrie (quantitative Bestimmung der Signalstärke)	60
III.2.8	Proteinkonzentrationsbestimmungen.....	60
III.3	<i>Methoden der in vitro Proteinsynthese</i>	61
III.3.1	<i>In vitro</i> Transkription mit SP6/T7 RNA-Polymerase	61
III.3.2	<i>In vitro</i> Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden.....	62
III.3.3	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation im Retikulozytenlysat	63
III.4	<i>Analysemethoden/-grundlagen der in vitro Proteintranslokation</i>	65
III.4.1	Cotranslationale Translokation von Transportsubstraten in Membranvesikel.....	65
III.4.2	Posttranslationale Translokation von Modells substraten in Membranvesikel	65
III.4.3	Sequestrierung: Proteaseresistenztest eines Transportsubstrates	66
III.5	<i>Analysemethoden der Molekularbiologie und Nukleinsäurechemie</i>	68
III.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	68
III.5.2	Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung	69
III.5.3	Medien und Platten zur Anzucht von Bakterienstämmen.....	70
III.5.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen JM101 und DH5 α	71
III.5.5	Plasmid-DNA Extraktion aus transformierten <i>E. coli</i> -Zellen („Midipräp“)	72
III.5.6	Quantifizierung und Reinheit von DNA-Präparationen	72
III.6	<i>Methoden der Zellkultivierung, -manipulation und -analyse</i>	72
III.6.1	Kultivierung & Subkultivierung von Säugerzelllinien	72
III.6.2	Zellzählungsmethoden.....	73
III.6.2.1	Zellzählung mittels Neubauerzählkammer	74
III.6.2.2	Zellzählung mittels „Countess [®] Automated Cell Counter“	74
III.6.3	siRNA vermittelte Säugerzellmanipulation	74
III.6.4	Plasmidgestützte Säugerzellmanipulation	77
III.6.5	Toxinbasierende Säugerzellmanipulation.....	79
III.6.6	Methoden zur Zellernte: Zelllysat und semi-permeabilisierte Zellen (SPZ).....	82

III.6.6.1	Präparation von Zelllysate	83
III.6.6.2	Präparation semi-permeabilisierter Zellen (SPZ)	83
III.6.7	Echtzeit Zellanalyse (xCELLigence RTCA)	85
III.6.8	„Pulse-chase“ Experimente in Kombination mit Proteinsyntheseinhibitoren	86
III.6.9	Fluoreszenzbasierende Methoden der Zellanalyse	90
III.6.9.1	Bestimmung der Zellviabilität durch das Nuclear-ID™ Reagenz	92
III.6.9.2	Beobachtung der Aktinmorphologie mit Hilfe von FITC-Phalloidin	92
III.6.9.3	Untersuchung der ER-Morphologie mittels Immunfluoreszenz	94
III.6.9.4	Analyse der intrazellulären Ca ²⁺ -Homöostase (Ca ²⁺ -„imaging“)	94
III.6.9.5	Kalibrierung der Fura-2 Messungen	100
III.7	III.7 Methode der statistischen Analyse	103
IV	Ergebnisse	104
IV.1	Zelluläre Phänotypen der <i>SEC61A1</i> Expressionsmodulation	104
IV.1.1	Etablierung der siRNA vermittelten Sec61α Depletion	104
IV.1.1.1	Kinetik der siRNA vermittelten <i>SEC61A1</i> Genexpressionsminderung	105
IV.1.1.2	Proliferations- und Viabilitätskinetik während der Sec61α Reduktion	107
IV.1.1.3	Auswirkungen der <i>SEC61A</i> Expressionsmodulation auf Proteomebene	110
IV.1.2	Analyse der Zell- und ER-Morphologie nach <i>SEC61A</i> „silencing“	115
IV.1.2.1	ER-Morphologie Sec61α depletierter HeLa-Zellen	115
IV.1.2.2	Zytoskelettstruktur Sec61α depletierter HeLa-Zellen	117
IV.1.2.3	Ribosomenverteilung Sec61α depletierter HeLa-Zellen	118
IV.1.3	Effekte der <i>SEC61A</i> Expressionsmodulation auf den Proteintransport ins ER	121
IV.1.3.1	Einwirkung auf die ER Membraninsertion C-terminal verankerter Substrate	121
IV.1.3.2	Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER Sec61α depletierter Zellen	125
IV.1.3.3	Einfluss der <i>SEC61A</i> Komplementation auf den signalpeptidabhängigen Proteintransport ins ER	131
IV.1.3.4	Zusammenfassung der Effekte der <i>SEC61A</i> Expressionsmodulation auf den Proteintransport ins ER	134
IV.1.4	Einfluss der <i>SEC61A</i> Expressionsmodulation auf die Ca ²⁺ -Homöostase	136
IV.1.4.1	<i>Status quo</i> des Kalziumgehaltes behandelter/manipulierter HeLa-Zellen	137
IV.1.4.2	Die ER Translokase als potentielle passive Ca ²⁺ -permeabler Pore	140
IV.1.4.3	Einfluss des Sec61α Gehaltes auf die zelluläre Ca ²⁺ -Homöostase	147
IV.1.4.4	Auswirkung der induzierten Proteinfehlfaltung auf den Ca ²⁺ -Efflux des ER	149
IV.2	Einfluss der <i>SEC62</i> Expressionssenkung auf die Ca ²⁺ -Homöostase	156
IV.3	Zelluläre Phänotypen der <i>BIP</i> Expressionsminderung	159
IV.3.1	Einfluss der <i>BIP</i> Expressionsreduktion durch RNAi auf die Ca ²⁺ -Homöostase	159
IV.3.2	Auswirkungen der <i>BIP</i> Reduktion durch das Zytotoxin Subtilase (SubAB)	163
IV.3.2.1	Etablierung der <i>BIP</i> Reduktion mittels Subtilase	163
IV.3.2.2	Einfluss der toxinvermittelten BiP Reduktion auf die Ca ²⁺ -Homöostase	169

IV.3.2.3	Einfluss der BiP Reduktion durch Subtilase auf den Proteintransport ins ER	175
V	Diskussion.....	182
V.1	<i>Interpretationen der SEC61A1 Expressionsmodulation</i>	<i>182</i>
V.1.1	Effiziente Reduktion des Sec61 α durch verschiedene siRNAs	182
V.1.2	SEC61A1 kodiert ein essentielles Protein.....	183
V.1.3	Unveränderte Zytoskelett- und ER Morphologie nach Sec61 α Depletion	183
V.1.4	Sec61 α repräsentiert einen Ribosomenrezeptor der ER Membran	184
V.1.5	Die SEC61A1 Expressionsmodulation beeinflusst die Proteostase	186
V.1.6	Sec61 α gestattet signalsequenzspezifisch den Proteintransport ins ER.....	191
V.1.6.1	Der Sec61 Komplex: entbehrlich für die Insertion der „tail-anchor“ Proteine.....	191
V.1.6.2	Der Sec61 Komplex: unentbehrlich für den Proteintransport sekretorischer Proteine mit N-terminaler Signalsequenz	193
V.1.7	Der Sec61 Komplex repräsentiert einen ubiquitären Ca ²⁺ „leak“ Kanal	197
V.1.7.1	Die Relevanz weiterer putativer Ca ²⁺ „leak“ Kanäle.....	201
V.1.8	Resümee der verifizierten Funktionen des humanen Sec61 Komplexes	202
V.1.9	Proteinfehlfaltung erhöht den Kalziumefflux durch Sec61 α , nicht aber durch die Mutante Sec61 α -Y344H.....	204
V.2	<i>Interpretationen der BIP Expressionsminderungen.....</i>	<i>205</i>
V.2.1	BIP: kein einfaches Ziel der RNA Interferenz.....	206
V.2.1.1	BiP, ein fehlfaltungssensitiver Schließmechanismus des Sec61 Komplexes	206
V.2.2	Effiziente BiP Spaltung durch das Zytotoxin Subtilase (SubAB)	207
V.2.2.1	BiP ist nicht nur für HeLa-Zellen essentiell	207
V.2.2.2	Die zweistündige BiP Fragmentierung ist ohne Auswirkung auf den passiven Kalziumausstrom oder das „store-operated calcium entry“ (SOCE).....	208
V.2.2.3	Die längerfristige BiP Fragmentierung reduziert den Kalziumgehalt	209
V.2.2.4	Die Behandlung mit Subtilase erhöht die cytosolische Kalziumkonzentration.....	209
V.2.2.5	BiP beeinflusst substratspezifisch den Proteintransport ins ER	211
V.3	<i>Interpretationen des SEC62 „silencing“</i>	<i>212</i>
V.3.1	Sec62 begrenzt die Kalziumleckage und Kalziumspeicherfunktion des ER	212
V.4	<i>Physiologische Relevanz der Daten.....</i>	<i>214</i>
V.4.1	Das ER Chaperon BiP moduliert die Funktionen des Sec61 Komplexes.....	215
V.5	<i>Offene Fragen.....</i>	<i>218</i>
V.5.1	Die Grundlage der Substratspezifität von BiP und Sec61 α -Y344H?	218
V.5.2	Kalziumefflux: aber warum?	219
VI	Literaturverzeichnis	222
VII	Danksagung.....	245
VIII	Publikationen	246

Abkürzungsverzeichnis

2D / 3D	zweidimensional / dreidimensional
Å	Ångström (= 10^{-10} m = 0,1 nm)
AA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
α_1 -ACT	α_1 -Antichymotrypsin (Transportsubstrat)
α_1 -AT (Z*)	Z-Variante des α_1 -Antitrypsins (Transportsubstrat)
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP2	Aquaporin2 (Transportsubstrat)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BiP	„immunoglobulin heavy chain binding protein“
BSA	bovines Serumalbumin
C (-Terminus)	Carboxyl-Terminus
°C	Grad Celsius
Ca^{2+} / $[\text{Ca}^{2+}]$	Kalziumion / Kalziumkonzentration
CAC	Zitronensäurezyklus
CCE	kapazitiver Kalziumeinstrom (= SOCE)
Ci	Curie
CMV	Zytomegalie-Virus
CTP	Cytidintriphosphat
cytb5	ER-ständige Variante des Cytochrom b5 (Transportsubstrat)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER / ERAD	endoplasmatisches Retikulum / ER assoziierte Degradation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (= und andere)
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsc	konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein
Hsp	Hitzeschockprotein
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
Igk	Immunglobulin leichte Kette Kappa (Transportsubstrat)
IP_3 / IP_3R	Inositoltriphosphat / Inositoltriphosphatrezeptor

IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
ivc	invariante Kette (Transportsubstrat)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	„lysogeny broth“
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
m	Meter
M	Molarität [mol/l]
mA	Milliampere
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER Membran
m ⁷ GpppG	5'-(7-Methyl)-guanosin-5'-guanosintriphosphat
min	Minute
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)
N (-Terminus)	Amino-Terminus
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NC(K)X	Natrium-Kalzium-(Kalium)-Austauscher der Plasmamembran
NE	Kernmembran (= Membran des Nukleus)
NEF	Nukleotidaustauschfaktor
Neo	Neomycin
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (= offener Leserahmen)
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PK	Proteinase K
PLAC	Proteaseinhibitormix (Pepstatin A, Leupeptin, Antipain, Chymostatin)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMCA	Kalzium-ATPase der Plasmamembran
ppαF / ppcecA / ppl	Präpro-α-Faktor / PräprocecropinA / Präprolaktin (Transportsubstrate)
PrPΔGPI / ΔHD	Prionproteinderivat ohne Glykosylphosphatidylinositolankerstelle / ohne hydrophobe Domäne (Transportsubstrate)
Psn1	Presenelin1
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion
R	Ratio
RAMP	ribosomassoziertes Membranprotein
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RISC	RNA induzierter Stilllegungskomplex
RM	raue Mikrosomen
R/M	membranassozierte Ribosomen pro 1 μm Membran
RNA / RNAi	Ribonukleinsäure / Ribonukleinsäureinterferenz
RNaseA	Ribonuklease A

RNC	Ribosom-naszierender Kette-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SBD	Substrat-Bindedomäne
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekretions-Mutante
sER	glattes endoplasmatisches Retikulum
SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
siRNA	„small interfering“ RNA
SOCE	„store-operated Ca ²⁺ entry“ (= CCE)
SPC	Signalpeptidase (= Signalpeptidasekomplex)
SPPase	Signalpeptidpeptidase
SPZ	semi-permeabilisierte Zellen
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signalerkennungspartikel („signal recognition particle“)
SubAB	Subtilase AB ₅ Zytotoxin
Syb2	Synaptobrevin2 (Transportsubstrat)
TA-MP	„tail-anchor“ Membranprotein
TB	„terrific broth“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Thapsigargin
TMD	Transmembrandomäne
TOM	Proteintranslokase der äußeren mitochondrialen Membran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
Tun	Tunicamycin
TX-100	Triton X-100
U	Unit (Enzymeinheit)
UdS / UKS	Universität des Saarlandes / Universitätsklinikum des Saarlandes
UPR	„unfolded protein response“
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent („volume/volume“)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent („weight/volume“)

Ein- beziehungsweise Dreibuchstabencode für Aminosäuren

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

I ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

Diese Arbeit verfolgte das Ziel der Charakterisierung der Proteintranslokase des humanen endoplasmatischen Retikulums (ER) hinsichtlich ihrer Funktionen und Regulationsmechanismen auf zellulärer Ebene. Hauptaugenmerk lag dabei auf der zentralen Komponente der Translokase, dem heterotrimeren Sec61 Komplex mit seiner essentiellen Untereinheit Sec61 α .

Ausgangspunkt der Analysen war die effiziente, siRNA vermittelte Reduktion der *SEC61A1* Expression in HeLa-Zellen. Analog den Befunden publizierter *in vitro* Daten demonstrierte die elektronenmikroskopische Betrachtung depletierter Zellen die Ribosomenrezeptorfunktion des Sec61 α an der ER Membran. Damit einhergehend bestätigte die etablierte Kombination aus semi-intakten Zellen und der *in vitro* Synthese von Modellproteinen im programmierten Retikulozytenlysat das eingeschränkte Proteintransportvermögen Sec61 α depletierter Zellen für Substrate mit N-terminaler Signalsequenz. Der identische experimentelle Aufbau erlaubte gleichzeitig die Demonstration der Sec61 α unabhängigen Membraninsertion verschiedener „tail-anchor“ Membranproteine. Die Reduktion der Proteintranslokation wirkte sich mit zunehmender Dauer auf die zelluläre Proteinhomöostase aus. Durch die Depletion an Sec61 α kam es zum Verlust des gesamten heterotrimeren Sec61 Komplexes sowie ERj1 und zur Verringerung der Zellviabilität. Bei der Messung cytosolischer Kalziumströme Fura-2 beladener Zellen zeigte sich in Abwesenheit des Sec61 Komplexes der deutlich reduzierte Kalziumausstrom aus dem ER. Zudem ist es durch die Komplementation der Sec61 α depletierten Zellen mit dem Wildtypprotein gelungen sowohl den Proteintransport als auch den passiven Kalziumefflux wiederherzustellen. Damit wurde erstmals verifiziert, dass sich sowohl die zelluläre Funktion der Proteintranslokase als auch die des bis dato unbekanntes Kalziumeffluxkanals des ER auf Ebene des Sec61 Komplexes zusammenführen lassen.

Weitere Komplementationsexperimente mit der Sec61 α -Y344H Mutante zeigten gegenüber dem Wildtypprotein ein eingeschränktes Substratspektrum des Proteintransportes und eine permanent erhöhte, nicht durch Faltungsantagonisten forciertbare, Kalziumpermeabilität. Die Generierung der zur diabetesassoziierten Sec61 α -Y344H Mutante identischen Phänotypen durch die siRNA oder toxinvermittelte (Subtilase) Depletionsstrategie von BiP waren die Grundlage zur Annahme der Regulation des Sec61 Komplexes durch dieses luminal Hsp70 Chaperon. Die putative Interaktion erfolgt am luminalen loop7 des Sec61 α am Y344.

Die Analyse der RNAi basierenden *SEC62* Expressionsminderung resultierte ebenfalls in einer Änderung der Kalziumhomöostase, wobei die Daten nahelegen, dass Sec62 den Kalziumausstrom des Sec61 Komplexes und die Kalziumspeicherfunktion des ER begrenzt.

ABSTRACT

CELLULAR CHARACTERIZATION OF THE FUNCTIONS AND REGULATORY MECHANISMS OF THE HUMAN SEC61 COMPLEX

This study was aimed to characterize the human endoplasmic reticulum (ER) translocase at the cellular level in terms of its functions and regulatory mechanisms. The attention has been drawn to the pivotal component of the ER translocase, the heterotrimeric Sec61 complex and its essential subunit Sec61 α .

After establishing the efficient siRNA mediated silencing of the *SEC61A1* gene in HeLa cells an electron-microscopic approach of the depleted cells demonstrated the Sec61 complex functioning as the necessary ribosome receptor at the ER membrane. Furthermore, the established assay combining semi-intact cells and *in vitro* synthesis of model proteins in programmed rabbit reticulocyte lysate verified the restricted protein transport ability of the Sec61 α depleted cells. The limited protein transport affected precursor proteins carrying an N-terminal signal sequence, but had no impact on the membrane integration of various tail-anchor membrane proteins. After a certain time the constricted protein translocation also influenced the cellular proteostasis. The depletion of Sec61 α resulted in the loss of the whole heterotrimeric Sec61 complex as well as ERj1 and reduced the cell viability. Live cell calcium imaging of fura-2 loaded cells revealed the clearly reduced calcium leakage from the ER in absence of the Sec61 complex. Complementation experiments of Sec61 α depleted cells with the wild type protein rescued the hampered protein transport and the passive calcium efflux. This was the first verification that the cellular functions of the protein translocase and that of the elusive calcium leak channel converge at the level of the ubiquitous Sec61 complex.

Moreover, complementation experiments using the Sec61 α -Y344H mutant exhibit a confined substrate spectrum and a permanently increased calcium leakage that can no longer be boosted by folding antagonists. Interestingly, the siRNA or toxin (subtilase) mediated depletion of BiP allowed the replication of the identical phenotypes observed for the diabetes associated Sec61 α -Y344H point mutation. This led to the assumption that the regulation of the Sec61 complex was mediated via the luminal Hsp70 chaperon BiP. The putative interaction occurs at the luminal loop7 of the Sec61 α protein at position Y344.

Finally, the analysis of the RNAi mediated *SEC62* gene silencing also affected the calcium homeostasis. The measurements indicated that Sec62 curtails the calcium leakage of the Sec61 complex as well as the calcium storage function of the ER.

II EINLEITUNG

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben Matthias Schleiden und Theodor Schwann die Zelle als den elementaren Baustein des Lebens (Vasil 2008). Auch wenn dieses Dogma von Pflanzenbiologen kritisiert wird (Baluska *et al.* 2004), besitzen doch alle pro- oder eukaryotischen Organismen eine Plasmamembran zur Abgrenzung ihres Cytosols vom extrazellulären Milieu. Dieses einfache Prinzip der Kompartimentierung wurde im Laufe der Entwicklung von Eukaryoten weiterhin genutzt, um selbst innerhalb der Zelle getrennte Reaktionsräume zu erzeugen. Neben der Existenz des Nukleus zeichnen Eukaryoten sich durch den Erwerb weiterer Organellen aus. Dazu zählen unter anderem auch Chloroplasten, Mitochondrien, der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum (ER), dessen zentrale Stellung im Zuge der Proteinsekretion und des Kalziumhaushaltes in dieser Arbeit untersucht wurden.

II.1 Das ER: ein multifunktionales Organell

Das endoplasmatische Retikulum (ER) repräsentiert ein dynamisches und kontinuierliches Netzwerk innerhalb eukaryotischer Zellen (Friedman & Voeltz 2011). Mit seiner überwiegend retikulären (netzartigen) Struktur beansprucht es, mit großen zelltypspezifischen Abweichungen versehen, rund 10 % des gesamten Zellvolumens (Voeltz *et al.* 2002). Darüber hinaus dient das ER auch als Eintrittspunkt des sekretorischen Weges. Nahezu alle Enzyme und Strukturproteine des ER, des ER-Golgi-intermediären-Kompartiments (ERGIC), des Golgi-Apparates, der Lysosomen sowie plasmamembranständige und sezernierten Proteine passieren zu Beginn ihrer Biogenese die ER Membran oder werden in diese integriert. Somit scheint es nicht ungewöhnlich, dass – je nach Literaturangabe – etwa ein Drittel bis hin zur Hälfte aller synthetisierten Vorstufenproteine am ER eingeschleust werden (Brostrom & Brostrom 2003; Braakman & Bulleid 2011). Eine genauere massenspektroskopische Proteomanalyse des sekretorischen Weges eines Rattenleberparenchyms von Gilchrist *et al.* (2006) lieferte dahingegen lediglich rund 1430 verschiedene Proteine (davon 830 ER Proteine). Ein Zahlenwert der bei Annahme von 25.000 kodierenden Genen im Rattengenom nur 6 % der exprimierten Gene umfasst. Das heißt ein kleiner Teil des Proteoms ist maßgeblich an der Biogenese eines Großteils synthetisierter Proteine beteiligt. Dieser Umstand unterstreicht die Bedeutung des ER in eukaryotischen Zellen und seine unentbehrlichen Funktionen.

Um seinen diversen Anforderungen gerecht zu werden, ist das ER in unterschiedliche morphologische Strukturen unterteilt. Eine mögliche Unterteilung gliedert das ER in die

Bereiche äußere Kernmembran (NE), raues ER (rER) und glattes ER (sER). Während das rER und teilweise auch die NE durch den Besitz von membrangebundenen Ribosomen charakterisiert sind, ist das sER frei an Ribosomen und wird daher oftmals auch als agranuläres ER bezeichnet. Das rER umfasst durch die Kopplung an Ribosomen die Funktionen der Proteinbiogenese inklusive Faltung, Sekretion und zugehörigen Modifikationen. Das sER gilt als Ort der Phospholipid-, Fettsäure- und Steroidsynthese sowie der Detoxifikation (Baumann & Walz 2001; Denmeade & Isaacs 2005). Eine zweite Variante der Unterteilung des peripheren ER (rER und sER) ist ebenfalls etabliert. Die länglichen Röhren des ER werden dabei als Tubuli bezeichnet und eher dem sER zugeordnet, wohingegen großflächige Formationen – sogenannte „sheets“ – als rER fungieren. An der Ausbildung der Tubuli und „sheet“ Strukturen sind maßgeblich Polysomen und Reticulon-Proteine beteiligt (Shibata *et al.* 2006; de Brito & Scorrano 2010; Shibata *et al.* 2010).

Zur Multifunktionalität des ER gehört auch eine hohe Flexibilität. So kann sich das ER in Folge von (De-)Differenzierungsprozessen, Zellzyklusphasen und als Adaptionsmechanismus auf verschiedene Stressbedingungen (gehäufte Proteinfehlfaltungen, Autophagie) in Volumen und Konstitution verändern (Sammels *et al.* 2010). Eine 3D Cryoelektronentomographie Rekonstruktion zeigt, dass die Umwandlung von „sheet“ zu Tubuli Strukturen im Verlauf der Mitose mit der Reduktion des Ribosomenbesatzes der ER Membran einhergeht. Eine vergleichbare „sheet“-Tubuli Transition wird auch durch die Behandlung mit Puromycin, einem Proteinsyntheseinhibitor zur Loslösung naszierender Ketten aus synthetisierenden Ribosomen, erreicht (Puhka *et al.* 2007). Ein zweites Beispiel für das dynamische Verhalten des ER ist die mit der durch Interleukine aktivierte B-Zelldifferenzierung einhergehende ER Expansion, welche die enorme Antikörpersekretion der entstehenden Plasmazellen ermöglicht (van Anken *et al.* 2003).

Um die Funktionen und Homöostasebedingungen des ER in einen zellulären Kontext einzuordnen, lohnt sich ein Blick auf dessen möglichen evolutiven Ursprung. Eine attraktive Idee besagt, dass das ER eventuell aus einer Invagination der Plasmamembran hervorging und als permanentes Organell erhalten blieb (Braakman & Bulleid 2011). Demnach ähnelt das ER Lumen in gewissen Zügen dem extrazellulären Raum, vor allem was die oxidierende Umgebung und die hohe Konzentration an Kalziumionen (Ca^{2+}) betrifft (Schröder & Kaufman 2005). Daher unterstützen unterschiedliche Faltungsmediatoren die Proteinfaltung naszierender Polypeptide beim Übertritt vom reduzierenden Milieu des Cytosols in dieses Kompartiment. Die vier bekannten Klassen an Faltungsfaktoren sind Hitzeschockproteine (Hsp), Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, Oxidoreduktasen und Lektine.

Wie jedes andere Zellorganell stellt auch das ER keinen hermetisch abgeschlossenen Reaktionsraum dar. Stattdessen steht es über Vesikeltransport, Protein-Lipidbrücken, Kanäle und Transporter in ständigem Kontakt beziehungsweise Informationsaustausch zu anderen Organellen (Friedman & Voeltz 2011). Neben dem Kalziumefflux steht das ER auch über den Proteintransport vom Cytosol in ständigem Austausch mit diesem Kompartiment.

II.2 Proteintransport zum ER („targeting“)

Der Proteintransport in oder über biologische Membranen ist ein fundamentaler Prozess an dessen Anfang die ribosomale Proteinsynthese steht. Beim Proteintransport zum ER, dem sogenannten „targeting“, bieten sich der Zelle zwei Varianten. Zu transportierende Vorläuferproteine können bereits während ihrer Synthese in einer cotranslational stattfindenden Zielsteuerung zur ER Membran dirigiert werden (Kapitel II.2.1.1), oder sie erreichen diese posttranslational nach ihrer vollständigen Synthese und Freisetzung vom cytosolischen Ribosom (Kapitel II.2.1.2 und II.2.1.3). Die Zuordnung eines Vorläuferproteins zu einem der beiden Transportmodi wird in der Hefe signifikant durch das im Transportsubstrat integrierte Signalpeptid (= Signalsequenz) bestimmt (Ng *et al.* 1996).

II.2.1 Die Signalsequenz – eine entscheidende Determinante der Zielsteuerung

Bereits mit Formulierung der Signalthypothese (Blobel & Dobberstein 1975a; 1975b) war die Notwendigkeit einer Signalsequenz als effizienter ER-Zielsteuerungsmechanismus bekannt. Neben abspaltbaren Signalpeptiden können auch integrale Transmembrandomänen (TMD) von Membranproteinen in Form von Signalankersequenzen oder Stopptransfersequenzen als internes Signal zum „targeting“ genutzt werden (Martoglio & Dobberstein 1998). Im besonderen Fall eines C-terminal verankerten Substrates mit nur einer TMD, auch „tail-anchor“ Membranprotein genannt, befindet sich die Zielsteuerungssequenz erst kurz vor dem Carboxylterminus des Proteins (Kutay *et al.* 1995).

Anstelle einer universalen, ER-gerichteten Signalsequenz entwickelte sich praktisch jedes Vorläufersubstrat mit einem individuell angepassten Signalpeptid (Kim *et al.* 2002). Dadurch erhält die Zelle auch für den Schritt der Proteinzielsteuerung größtmögliche Flexibilität und Regulationsmöglichkeit. Somit ist es verständlich, dass statistische Sequenzanalysen von eukaryotischen, abspaltbaren Signalpeptiden keine einheitliche Konsensussequenz ermitteln konnten und stattdessen eine große Aminosäurediversität vorliegt (von Heijne 1983; 1985).

Dennoch konnten allgemeine Charakteristika einer Signalsequenz zusammengefasst werden. In der Regel zeigen abspaltbare Signalsequenzen eine Länge von etwa 15 bis 30 Aminosäuren mit einer tripartiten Organisation. Die hydrophobe Kernsequenz (h) umfasst 5-15 Aminosäuren und wird von einer positiv geladenen Region (n) und einer ungeladenen, polaren Sequenz (c) flankiert (Kapp *et al.* 2009; Zimmermann *et al.* 2011). Ähnliches gilt auch für die N- oder C-terminal gelegenen TMD, welche als Signalankersegmente der Membranproteine dienen. Lediglich deren hydrophobe h-Region scheint mit 20 Aminosäuren etwas verlängert, um den 3-5 nm breiten hydrophoben Kern eines Lipidbilayers permanent zu durchspannen (von Heijne 1986; Mateja *et al.* 2009).

Studien verschiedener Signalsequenzen zeigen, dass deren substratspezifische Eigenschaft evolutiv konserviert ist und sich verglichen mit einem neutralen Peptid sogar nur halb so schnell verändern (Williams *et al.* 2000). Das heißt, die vielen Signalpeptidvariationen sind kein Zeichen funktioneller Degeneration, sondern jede Signalsequenz ist auf die zugehörige reife Domäne eines Vorläufersubstrates abgestimmt (Kang *et al.* 2006).

Trotz ihrer geringen Größe zeigen einige Signalsequenzen auch nach ihrer Abspaltung vom reifen Teil des Proteins „post-targeting“ Funktionen (Kapp *et al.* 2009). So ist beispielsweise das Signalpeptid des Hormons Präprolaktin in der Lage mit dem cytosolischen durch Kalzium modulierten Protein Calmodulin zu interagieren (Lyko *et al.* 1995; Martoglio *et al.* 1997).

Die gemeinsame Eigenschaft aller Vorläufersubstrate, die zum ER transportiert werden müssen, ist also der Besitz mindestens einer hydrophoben Domäne. Diese initiiert entweder als abspaltbare Signalsequenz oder als Signalankersequenz in Form einer TMD das „targeting“ zur ER Membran. Wie alle exponierten, hydrophoben Domänen tendieren auch Signalsequenzen im dichtgepackten Milieu des Cytosols (Proteinkonzentration ≈ 300 g/l (Shao & Hegde 2011a)) zur Aggregation. Als präventive Maßnahme der Proteinaggregation nutzt die Zelle für unterschiedliche Signalsequenzen verschiedene molekulare Chaperone. Diese sollen das Signalpeptid nach dessen Austritt aus dem ribosomalen Tunnelausgang abschirmen, vor unspezifischen Interaktionen sowie vor Fehlfaltung schützen und zielgerichtet zu ER Membran dirigieren. Wichtige cytosolischen Chaperone, die mit Signalpeptiden in Kontakt treten, werden nachfolgend erläutert (Kapitel II.2.1.1 bis II.2.1.3).

II.2.1.1 SRP-abhängiger Proteintransport zur ER Membran (cotranslational)

Das cotranslationale „targeting“ sekretorischer Proteine (s. Abb. II-01) wird durch das cytosolische „signal recognition particle“ (SRP) vermittelt und auch als SRP-abhängiger Proteintransport deklariert (Wilkinson & Stirling 2009). Sobald eine entsprechende Signalsequenz aus dem ribosomalen Tunnelausgang hervortritt, wird sie vom SRP erkannt und gebunden (Walter *et al.* 1981; Walter & Blobel 1982). Zudem führt diese Rekrutierung des SRP zu aktiven Ribosomen zu einer erheblichen Verlangsamung der Proteinsynthese und der Komplex aus Ribosom und naszierender Kette (RNC) im Verbund mit SRP (RNC-SRP) wird mit Hilfe des membranständigen SRP Rezeptors (SR) zur ER Membran dirigiert (Walter & Blobel 1981; Gilmore *et al.* 1982a; Gilmore *et al.* 1982b).

Um diese verschiedenen Aufgaben zum „targeting“ eines RNC zum ER zu bewerkstelligen, besteht das evolutiv konservierte SRP – ein Ribonukleoproteinkomplex – aus mehreren Komponenten. Im Falle des Säugetier SRP assoziieren sechs Proteine (SRP9/14/19/54/68/72) mit der etwa 300 nt langen 7SL RNA. Funktionell lässt sich das SRP in die Alu- und S-Domäne gliedern, welche gleichzeitig durch die langgestreckte L-förmige Struktur (28 nm) an verschiedenen Regionen des Ribosoms agieren (Halic & Beckmann 2005). Die sogenannte Alu-Domäne katalysiert, vermittelt durch das Heterodimer aus SRP9 und SRP14, den Elongationsarrest. Dazu wird die Alu-Domäne erst bei Anwesenheit eines Signalpeptides durch spezifische Interaktionen des SRP9/14 Dimers an der Grenzfläche der ribosomalen Untereinheiten positioniert, genau an der Eintrittsstelle der beladenen tRNAs und Elongationsfaktoren („A-site“) und erschwert so deren Assoziation und damit die Elongation der Proteinsynthese (Terzi *et al.* 2003; Halic *et al.* 2004). Die Bindung der Alu-Domäne wird durch die gleichzeitige Bindung der S-Domäne in der Nähe des ribosomalen Tunnelausgangs ermöglicht. Die S-Domäne bindet die Proteine SRP19, das Dimer aus SRP68/72 und als Schlüsselkomponente das die verschiedenen Funktionen bestimmende SRP54. Das SRP54 Protein lässt sich in drei Domänen unterteilen. Während die M-Domäne mittels ihrer methioninreichen Bindungsfurche die hydrophobe Signalsequenz am Tunnelausgang in Empfang nimmt und den Kontaktpunkt zur 7SL RNA herstellt, sind die N- und G-Domäne durch die Bindung von GTP und ihre GTPase Aktivität am „targeting“ zum SRP Rezeptor (SR) beteiligt (Zopf *et al.* 1990; Freymann *et al.* 1997; Janda *et al.* 2010). Eine zweite GTPase mit vergleichbarer N- und G-Domäne befindet sich in der α -Untereinheit des dimeren SR (SR α). In Verbund mit dem membranständigen SR β Protein, die dritte GTPase im eukaryotischen „targeting“-Zyklus, bildet das membranassoziierte SR α den funktionalen SRP Rezeptor an der ER Membran für den RNC-SRP Komplex (Tajima *et al.* 1986; Miller *et al.* 1995). Während des Transfers des RNC-SRP Komplexes zum intakten SR müssen sich

(vermutlich) alle drei GTPasen (SRP54, SR α und SR β) im GTP beladenen Zustand befinden, was deren hohe Affinität und koordinierte Bindung zueinander gewährleistet (Connolly *et al.* 1991; Legate *et al.* 2000; Schwartz & Blobel 2003). Die nachfolgende, regulierte Freigabe der sich nun an der ER Membran befindlichen Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette inklusive der Wiederaufnahme der Proteinsynthese erfolgt durch die reziproke GTPase stimulierende Ausbildung eines „NG-Zwillings“ aus SRP54 und SR α (Egea *et al.* 2004; Focia *et al.* 2004). Während die aus dem „targeting“-Prozess entlassene naszierende Kette des RNC bereitsteht für den Schritt der Membraninsertion, können das SRP und der SR nach Austausch des gebundenen GDP zu GTP den nächsten „targeting“-Zyklus einleiten (Keenan *et al.* 2001).

Auch für den Prozess des SRP-abhängigen Proteintransports, der im Gegensatz zur Situation in Bakterien bei Säugern den vorherrschenden Transportmodus darstellt, gilt es molekulare Ratios zu bedenken, um die Effektivität des Mechanismus im zellulären Kontext einzuordnen. So befinden sich im Cytosol der Hefe *S. cerevisiae* pro SRP Molekül etwa 40 Ribosomen (SRP: 6.000 - 8.000 Moleküle; Ribosom: \approx 310.000 Partikel) und bei *E. coli* sogar nur ein SRP pro 100 Ribosomen (Jensen & Pedersen 1994; Raue *et al.* 2007). Dieses Ungleichgewicht zwischen SRP und Ribosom wird jedoch durch mehrere Umstände wie weitere akzessorische Komponenten kommt es durch die Kanalisierung zum Strom an Kalziumionen in die Mitochondrien bestimmt (vgl. Kapitel II.1), sodass nicht jeder RNC zur ER Membran dirigiert werden muss. Zweitens, könnte durch ein SRP Molekül ein Polysom (eine mit mehreren Ribosomen besetzte mRNA) zur ER Membran dirigiert werden und andererseits zeigten Berndt *et al.* (2009) an Hand von „Pull-down“-Studien mit RNC, dass die Präsenz einer noch im ribosomalen Tunnel verborgenen Signalsequenz bereits das SRP zum entsprechenden Ribosom rekrutiert. Weiterhin verdeutlichen Depletionsstudien des SRP in Hefe und Säugerzellen zwei Sachverhalte. Erstens, der SRP vermittelte Elongationsarrest hält das naszierende Polypeptid des RNC während des „targeting“-Zeitraums im translokationskompetenten Zustand (Lakkaraju *et al.* 2008). Und zweitens, trotz der effizienten Depletion des SRP waren beide Modellorganismen lebensfähig, was auf alternative „targeting“-Strategien hinweist (Mutka & Walter 2001; Lakkaraju *et al.* 2007). Weitere SRP-unabhängige „targeting“-Routen bestehen durch das Verbleiben bereits zur ER Membran dirigierter Ribosomen, welche ohne ein erneutes „targeting“ eine weitere Synthese eines sekretorischen Proteins einleiten können (Potter & Nicchitta 2000) oder durch eine posttranslationale Zielsteuerung eines vollständig synthetisierten Vorläufersubstrates nach dessen Freigabe vom Ribosom.

II.2.1.2 SRP-unabhängiger Proteintransport zum ER (posttranslational)

Das SRP-unabhängige, posttranslationale „targeting“ entsprechender Vorläufersubstrate zur ER Membran ist im Vergleich zum cotranslationalen Mechanismus ein bis dato weniger gut charakterisierter Prozess. Zudem scheint im Gegensatz zur Situation in *S. cerevisiae* und *E. coli* der posttranslationale Proteintransport im Säuger verglichen mit dem cotranslationalen Weg deutlich weniger prominent (Cross *et al.* 2009; Zimmermann & Blatch 2009). Dies spiegelt sich deutlich in der Anzahl bekannter posttranslational transportierter Substrate in Säugerzellen wieder. Nur die beiden kleinen Proteine Apelin (77 Aminosäuren) und Statherin (62 Aminosäuren) sind bekannte, humane Vorläufersubstrate des posttranslationalen „targeting“ (Stephen High, persönliche Mitteilung). An diesen beiden Substraten zeigt sich eine spezifische, jedoch nicht restriktive, Charakteristik posttranslational transportierter Substrate. Neben ihrer für die Zielsteuerung notwendigen Signalsequenz sind sie mit einer Länge von weniger als 80 Aminosäuren (AS) in der Regel schlicht zu kurz um noch während ihrer Synthese als RNC vom SRP gebunden zu werden. Deren C-Terminus wird bereits vom ribosomalen Peptidyltransferasezentrum freigegeben bevor die Signalsequenz (≈ 20 AS) den ribosomalen Tunnelausgang mit fast 100 \AA (entsprechen etwa 60 AS) vollständig verlassen hat (Voss *et al.* 2006; Zimmermann *et al.* 2011). Jedoch können auch deutlich größere artifizielle Hybridsubstrate generiert aus einem kleinen posttranslationalen Substrat und der cytosolischen Dihydrofolat-Reduktase nach Abschluss ihrer Synthese ins ER Lumen translozieren (Schlenstedt *et al.* 1992; 1994).

Das posttranslationale „targeting“ zur ER Membran beginnt somit im Unterschied zum cotranslationalen Mechanismus nach der vollständigen Synthese und Freisetzung des Transportsubstrates vom Ribosom und erfolgt unter Ausschluss des SRP und des SRP Rezeptors (Müller & Zimmermann 1987; Schlenstedt *et al.* 1990). Trotzdem gibt es auch eine grundlegende Gemeinsamkeit der co- und posttranslationalen Transportrouten. Dies ist das konstante Abschirmen („chaperoning“) der hydrophoben, ungefalteten Domänen des Transportsubstrates während der Passage durch das Cytosol zur ER Membran durch molekulare Chaperone. Auch beim posttranslationalen „targeting“ dienen die Chaperone der Aggregationsprävention und halten das Cargo in einem transportkompetenten, entfalteten Zustand (Wiech *et al.* 1987). Die Idee der Beteiligung molekularer Chaperone stammt aus der Beobachtung verschiedener Arbeitsgruppen, dass es sich beim posttranslationalen „targeting“ um einen Ribosom unabhängigen, aber ATP konsumierenden Schritt handelt (Mueckler & Lodish 1986; Perara *et al.* 1986; Schlenstedt & Zimmermann 1987). Notwendige Chaperone im Säuger sind das konstitutiv exprimierte Hsc70 und vermutlich ein weiteres Hsp40-Cochaperon (Zimmermann *et al.* 1988). Ein membranständiger Rezeptor vergleichbar

dem SRP Rezeptor für die cotranslationale Zielsteuerung an die ER Membran ist nicht bekannt. Ein potentieller Kandidat wäre jedoch das ER Membranprotein DnaJB12, welches durch seine charakteristische cytosolisch liegende J-Domäne mit Hsc70 interagieren könnte, um so den posttranslationalen Substratkomplex zur ER Membran zu dirigieren (Zahedi *et al.* 2009). Kürzlich von Shao & Hegde (2011b) publiziert, kann offenbar auch das ubiquitäre, multifunktionale Protein Calmodulin spezifisch an die Signalpeptide kleiner Vorläufer-substrate binden und so deren Translokationskompetenz aufrecht erhalten. Das Intermediat aus Calmodulin und kleinem Vorläuferprotein unterbindet die Degradation des Transport-substrates und unterstützt so dessen posttranslationales „targeting“.

Auch der posttranslationale Mechanismus der Zielsteuerung sekretorischer Proteine mit einer N-terminalen Signalsequenz zum ER ist, trotz der geringen Kenntnis von Vorläufersubstraten, im Säuger von Bedeutung. So beträgt das Verhältnis von Hsc70 zu SRP im Cytosol einer typischen Säugerzelle etwa 100:1 (Abell *et al.* 2007). Verglichen mit dem SRP stünden augenscheinlich ausreichend Hsc70 Chaperone für das „targeting“ zur Verfügung.

Interessanterweise zeigen publizierte Arbeiten die Beteiligung sowohl des cytosolischen Hsc70/Hsp40 und SRP Systems in einem weiteren posttranslationalen „targeting“ Schritt zur ER Membran. Dabei tragen die Substrate jedoch keine N-terminale Signalsequenz, sondern eine sogenannte C-terminal kodierte „tail-anchor“ Signalankersequenz. Die drei bekannten posttranslationalen Zielsteuerungsmechanismen der „tail-anchor“ Membranproteine sind Gegenstand des nächsten Kapitels II.2.1.3.

II.2.1.3 Zielsteuerungsmechanismen der „tail-anchor“ Membranproteine

Im Gegensatz zum co- oder posttranslationalen „targeting“ der Transportsubstrate mit N-terminaler Signalsequenz (s. Kapitel II.2.1.1 und II.2.1.2) zeichnen sich die „tail-anchor“ Membranproteine (TA-MP) durch den Besitz einer hydrophoben, C-terminal befindlichen Transmembrandomäne (TMD) innerhalb der letzten 50 Aminosäurereste aus (Kutay *et al.* 1993; Borgese & Fasana 2011). Eine solche Struktur unterbindet ebenfalls das cotranslationale Interagieren mit dem ribosomassoziierten SRP und resultiert in einem posttranslationalen „targeting“. Im Humangenom sind mehrere Vertreter dieser besonderen Klasse der posttranslationalen Transportsubstrate kodiert. Bioinformatische Studien sprechen von 411 putativen TA-MP, kodiert von 325 einzelnen Genen im menschlichen Erbgut (Kalbfleisch *et al.* 2007). Dies entspricht etwa 1 - 2 % der menschlichen Gene und liegt in der

Größenordnung des prozentualen Anteils an kodierten TA-MP in *Arabidopsis thaliana* (1,3 %) und *Saccharomyces cerevisiae* (1 %). Ein etwas geringerer Prozentsatz an TA-MP findet sich im Genom von Bakterien und Archaeen (Borgese & Righi 2010). Auch wenn sich die C-terminal verankerten Proteine im Eukaryoten in verschiedenen Membranen befinden (Nukleus, Mitochondrien, Peroxisomen, etc.), sind mit Ausnahme der ER Membran die Lipidbilayer des sekretorischen Weges non-permissiv (Borgese & Fasana 2011). Dies steht vermutlich in direktem Zusammenhang mit der Lipidzusammensetzung, da nur die ER Membran im sekretorischen Weg eine geringe molare Cholesterin:Phospholipid Ratio ($\approx 0,05$ für rER) aufweist, welches über den Golgi-Apparat ($\approx 0,25$) hin zur Plasmamembran ($\approx 0,75$) weiter ansteigt (Colbeau *et al.* 1971; Fleischer *et al.* 1974; Brambillasca *et al.* 2005). Wie aber verläuft der „targeting“-Prozess dieser „tail-anchor“ Proteine?

In analoger Weise zu den Substraten mit N-terminaler Signalsequenz bedürfen auch die hydrophoben TMD der TA-MP während ihrer Zielsteuerung durch das dichtgepackte Cytosol zur Aggregationsprophylaxe einer permanenten Abschirmung. Seit dem Jahr 2004 sind bereits drei – vermutlich parallel agierende – Mechanismen des TA-MP „targeting“ beschrieben (Rabu *et al.* 2009). Neben der nun auch posttranslational agierenden SRP Route (Abell *et al.* 2004), stellen der TRC40 Weg (Stefanovic & Hegde 2007) wie auch das bereits beschriebene Hsc70/Hsp40 System (Abell *et al.* 2007) zwei weitere Chaperonsysteme zum TA-MP „targeting“ dar (s. Abb. II-01). Ob *in vivo* jedoch tatsächlich alle drei der durch verschiedene *in vitro* Quervernetzungsexperimente gefundenen TA-MP „targeting“-Routen effektive Zielsteuerungsmechanismen zur ER Membran repräsentieren, ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Hegde & Keenan 2011).

a) SRP Route

In vitro Quervernetzungsexperimente demonstrieren, dass der zum Ribosom rekrutierte Signalsequenzerkennungspartikel (SRP) transient mit der recht hydrophoben TMD der TA-MP Synaptobrevin2 und Sec61 β nach deren Freisetzung vom Ribosom interagiert. Wie im cotranslationalen Modus erfolgt das „targeting“ des SRP-Cargo Komplexes zur ER Membran mit Hilfe des membranständigen SRP Rezeptors in einem GTP abhängigen Schritt (Abell *et al.* 2004). Der weniger hydrophobe „tail-anchor“ von Cytochrom b5 hingegen zeigt keine Assoziation mit dem SRP. Weiterhin verdeutlichen kinetische Analysen mit dem Modellsubstrat Sec61 β , dass der rekonstituierte SRP Weg mit gereinigtem SRP im Vergleich zu unfraktioniertem Cytosol nur in einem kurzen, anfänglichen Zeitfenster aktiv ist und eine geringere Effizienz der auf das „targeting“ folgenden Membranintegration aufweist (Abell *et*

al. 2007). Ebenfalls 2007 konnten dann Stefanovic und Hegde einen zweiten, bis dahin völlig unbekanntem cytosolischen „targeting“ Mechanismus für verschiedene TA-MP in seinen Grundzügen aufklären, die TRC40 Route. Passend zu den Daten von Abell *et al.* (2007) zählen auch Sec61 β und Synaptobrevin2 zu den Substraten des TRC40 Weges, was deren effektivere Membranintegration in Gegenwart des unfraktionierten Cytosols erklärt.

b) TRC40 Route

Die Schlüsselkomponente dieses zweiten TA-MP „targeting“ Mechanismus ist im Säuger wie auch in der Hefe eine „P-loop“ GTPase der SIMIBI Familie, welche im Laufe der Evolution jedoch eine ATPase Aktivität erlangte (Leipe *et al.* 2002; Borgese & Fasana 2011). Diese hochkonservierte ATPase trägt im Säuger den Namen TRC40 (= Asna1) und das Ortholog der Hefe heißt Get3 (= Arr4). Beide Enzyme, bzw. Chaperone der hydrophoben C-terminalen TMD der TA-MP, besitzen eine hohe Sequenzidentität zum gemeinsamen bakteriellen Vorläufer ArsA, der katalytischen Untereinheit des Arsenit-Resistenz Operons (Kurdi-Haidar *et al.* 1996; 1998; Mateja *et al.* 2009). Die Funktion hat sich jedoch von der Schwermetall-resistenz hin zum „targeting“ diverser TA-MP gewandelt.

Im Säuger beginnt das „targeting“ TRC40-abhängiger TA-MP durch den multifunktionalen BAG6 Komplex (Hegde & Keenan 2011). Dieser trimere Komplex aus Bag6 (= Bat3), TRC35 und Ubl4A wird vorzugsweise zu synthetisierenden Ribosomen rekrutiert, wenn sich eine funktionale TMD im ribosomalen Tunnelausgang befindet (Mariappan *et al.* 2010). Somit agiert der ribosomassoziierte BAG6 Komplex vor TRC40 als ein „pretargeting“- oder Sortierfaktor hydrophober Domänen und überträgt diese auf das cytosolische TRC40 oder leitet entsprechende Substrate zur proteasomalen Degradation (Leznicki *et al.* 2010; Hessa *et al.* 2011). Wie bei der SRP-vermittelten Zielsteuerung bedarf auch der „targeting“ Komplex aus TRC40 plus TA-MP eines proteasesensitiven ER Rezeptors. Zudem verdeutlicht die zugehörige *in vitro* Rekonstitution der TRC40 Route für Sec61 β und RAMP4 mit Hilfe gereinigter und rekombinanter Proteine, dass das „targeting“ und die nachfolgende Membraninsertion beider Substrate ATP oder ADP abhängig erfolgt (Favaloro *et al.* 2010). Weitere biochemische und fluoreszenzmikroskopische Analysen chimärer Proteine identifizierten das tryptophanreiche, basische Protein WRB (= CHD5) als ER Rezeptor für TRC40 im Säugersystem (Vilardi *et al.* 2011). WRB rekrutiert durch seine cytosolische „coiled-coil“ Domäne den TRC40 „targeting“ Komplex zur ER Membran und stimuliert vermutlich die ATPase Funktion des TRC40, was eine Freigabe des TA-MP nahe der ER Membran bewirkt. Alle Komponenten der dreistufigen TRC40 „targeting“ Route haben

orthologe Proteine in der Hefe, die in analoger Weise agieren. Einige davon konnten kürzlich auf atomarer Ebene durch Röntgenstrukturdaten aufgelöst werden (Mateja *et al.* 2009; Bozkurt *et al.* 2010; Chartron *et al.* 2010; Mariappan *et al.* 2011; Stefer *et al.* 2011; Shao & Hegde 2011a). In der Hefe wird der TRC40 Weg als „GET pathway“ bezeichnet. Die anfängliche Bedeutung des Akronyms („Golgi-ER-trafficking“ (Schuldiner *et al.* 2005)) hat man mittlerweile zu „guided entry of tail-anchored proteins“ abgewandelt.

Während TRC40^{-/-} Mäuse bereits früh in der Embryogenese sterben, ist der „Knock-out“ der GET Gene (Get1-5) in Hefe nicht letal und das, obwohl einige der TRC40 abhängigen TA-MP essentielle Proteine repräsentieren (Mukhopadhyay *et al.* 2006; Cherry *et al.* 2012). Dies legt den Schluss nahe, dass es offensichtlich verschiedene „targeting“ Routen gibt. Die ER Isoform des Cytochrom b5, eines der bestcharakterisierten TA-MP, wird aber weder strikt TRC40-abhängig (Stefanovic & Hegde 2007) noch SRP-anhängig (Anderson *et al.* 1983) zur ER Membran gebracht, was auf einen dritten TA-MP „targeting“ Mechanismus hinweist.

c) Hsc70/Hsp40 Route

Arbeiten von Abell *et al.* (2007) zeigen das posttranslationale „targeting“ des TA-MP Sec61 β durch das cytosolische Chaperonpaar Hsc70/Hsp40, welches auch kleine Substrate mit N-terminaler Signalsequenz posttranslational zur Membran zu dirigieren vermag (vgl. Kapitel II.2.1.2). Quervernetzungsexperimente verschiedener Sec61 β Derivate selbiger Publikation demonstrieren, dass die Adduktbildung aus Sec61 β und Hsc70 von der Präsenz des „tail-anchor“ abhängig ist. Eine nachfolgende Veröffentlichung mit sieben weiteren TA-MP des sekretorischen Weges bestätigt für sieben der acht getesteten Substrate eine stimulierende Aktivität des Hsc70/Hsp40 Chaperonpaares auf das „targeting“ bzw. die Membranintegration. Besonders TMD mit niedriger Hydrophobizität, wie die des Cytochrom b5 oder des PTP1B nutzen den ATP-abhängigen Hsc70/Hsp40 Weg. Als ergänzenden Hinweis zeigt diese Studie, dass die Membraninsertion des Cytochrom b5 und des PTP1B *in vitro* spezifisch durch Hsp70 Inhibitoren (DMT002220, MAL3-101) gestört werden kann (Rabu *et al.* 2008).

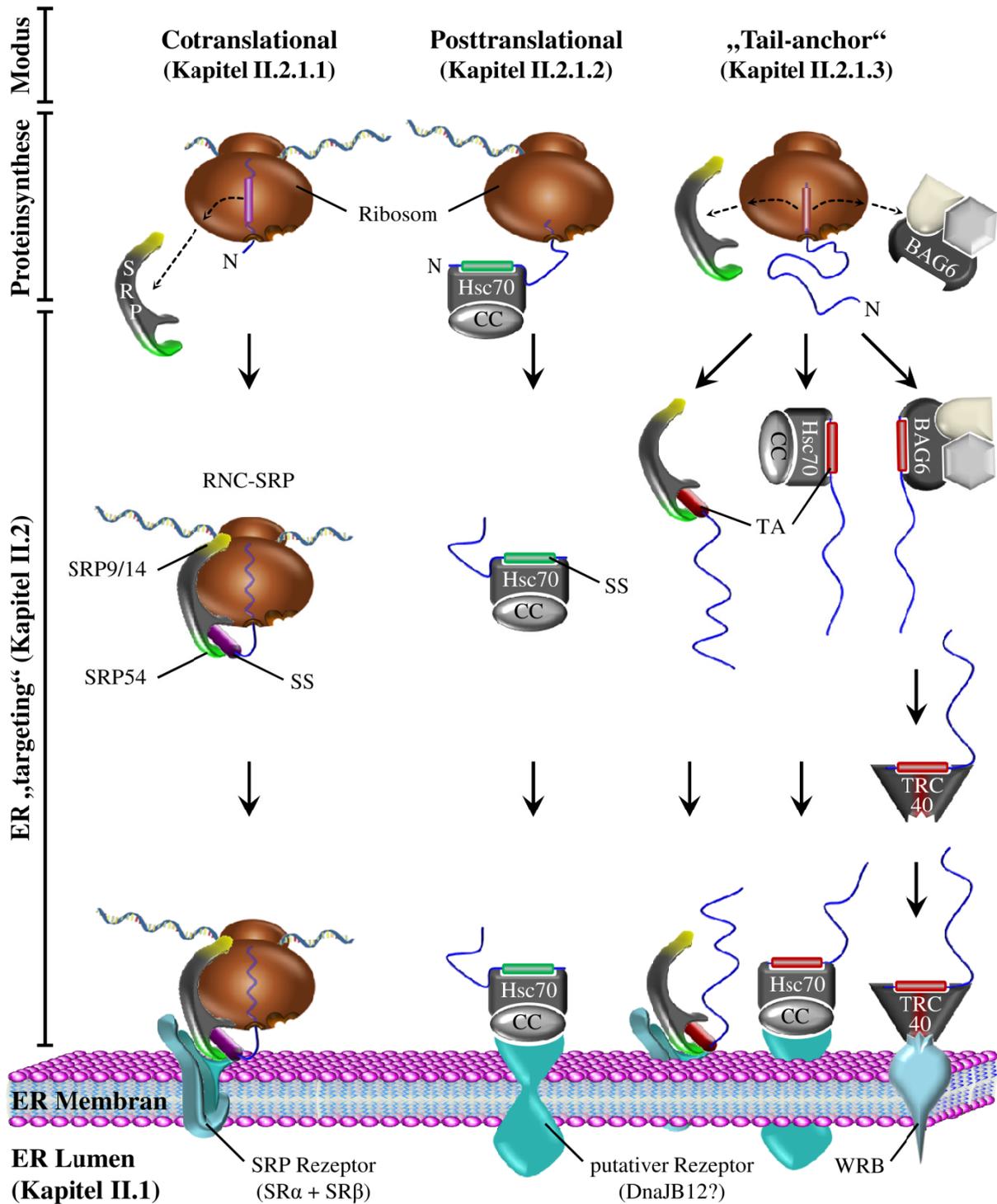


Abb. II-01: Bekannte Proteintransportmechanismen zur ER Membran in Mammalia („targeting“)
 Illustriert sind die Komponenten der drei bekannten „targeting“ Routen sekretorischer Proteine zur ER Membran (cotranslational, posttranslational, „tail-anchor“). Molekulare Chaperone des Cytosols sind in grau und beige gehalten (SRP, Hsc70 + CC (Cochaperon), trimerer BAG6 Komplex, TRC40) und die zugehörigen membranständigen Rezeptoren an der ER Membran in türkis (SRP Receptor, putativer Receptor, WRB). N-terminale Signalsequenzen (SS; lila oder grün) oder C-terminale „tail-anchor“ (TA; rot) bestimmen maßgeblich den gewählten „targeting“ Modus. Gestrichelte Pfeile symbolisieren die Rekrutierung molekularer Chaperone durch Signalpeptide im ribosomalen Tunnelausgang. Nähere Erläuterungen sind den angegebenen Kapiteln zu entnehmen.
 N = N-Terminus; RNC-SRP = Ribosom-naszierende Kette-SRP-Komplex

II.3 Signalsequenzinsertion an der ER Membran

Alle zuvor beschriebenen co- und posttranslationalen „targeting“ Routen zur ER Membran haben zwei Gemeinsamkeiten. (a) Unabhängig des Typs der verwendeten Signalsequenz des Cargos, bedarf diese einer konstanten Abschirmung und Weitergabe von einem molekularen Chaperon (oder hydrophoben Milieu) zum Nächsten; und (b) alle funktionalen Signalsequenzen erfahren nach dem „targeting“ Schritt eine Insertion in die ER Membran.

Die Membraninsertion bietet jedem Sequenzabschnitt einer Polypeptidkette zwei Wege. Entweder passiert der entsprechende Abschnitt die Membran vollständig und transloziert in das ER Lumen oder aber wird in die ER Membran integriert, wie beispielsweise eine Transmembrandomäne eines Membranproteins. Die für die Membranpassage und -integration notwendigen Proteinkomplexe sind Thema dieses Kapitels.

II.3.1 (Spontane) Membraninsertion und -integration der „tail-anchor“ Proteine

Während über die molekularen Mechanismen der Zielsteuerung der C-terminal verankerten Substrate zur ER Membran binnen weniger Jahre ein enormes Detailwissen angehäuft wurde (s. Kapitel II.2.1.3; Abb. II-01), ist der nachfolgende Prozess der Membraninsertion inklusive stabiler Integration (s. Abb. II-02) der „tail-anchor“ Membranproteine (TA-MP) noch völlig ungeklärt (Hegde & Keenan 2011). Was aber sind mögliche Modellvorstellungen der TA-MP Insertion (Borgese *et al.* 2003a)?

Erstens, das einzige charakterisierte Proteintranslokationssystem der ER Membran ist der Sec61 Komplex (s. Kapitel II.3.2). Studien an Hefemutanten unterschiedlicher Untereinheiten des Sec61 Komplexes mit Einschränkung des co- oder posttranslationalen Proteintransports zeigen jedoch weiterhin eine uneingeschränkte Cytochrom b5 Insertion (Yabal *et al.* 2003). Die Arbeiten von Yabal *et al.* (2003) schließen aber nicht aus, dass andere TA-MP den Sec61 Komplex als notwendige Insertase nutzen können. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die für die TA-MP Insertion notwendige Funktion des Sec61 Proteins in den getesteten Punktmutationen nicht betroffen ist.

Zweitens, der hydrophobe „tail-anchor“ könnte vergleichbar den asymmetrisch verteilten Lipiden der Lipidbilayer bei deren „Flip-Flop“ durch eine vermeintliche Flippase mittransportiert werden (Pomorski *et al.* 2001).

Drittens, eine bisher nicht charakterisierte Insertase vermittelt die Membranintegration der TA-MP oder einer Teilmenge davon (vgl. Abb. II-02).

Eine letzte Idee geht schlicht von der spontanen Insertion der hydrophoben TMD der TA-MP aus, welche durch das entsprechende „targeting“ nah genug an das obere „leaflet“ eines adäquaten Lipidbilayers gebracht werden (s. Abb. II-02). Die mögliche parallele Ausrichtung des „tail-anchor“ zur Membran begünstigt dann dessen spontane Membranintegration (Mateja *et al.* 2009). Ungewöhnlich scheint jedoch, dass die spontane Translokationskompetenz von Cytochrom b5 und PTP1B in proteinfreie Liposomen selbst durch Verlängerung des C-Terminus um eine hydrophile Sequenz mit bis zu 85 Aminosäuren kaum beeinflusst wird (Brambillasca *et al.* 2006). Eine weitere Auffälligkeit in Zusammenhang mit TA-MP ist deren häufige Zugehörigkeit zu den Translokasekomplexen verschiedener Organellen wie ER, Mitochondrien, Peroxisomen oder Chloroplasten (Borgese *et al.* 2003b; Soll & Schleiff 2004). Kombiniert man diesen Aspekt zusammen mit der Annahme der spontanen TA-MP Insertion, könnten TA-MP als evolutiver Wegbereiter der Proteintranslokation gelten.

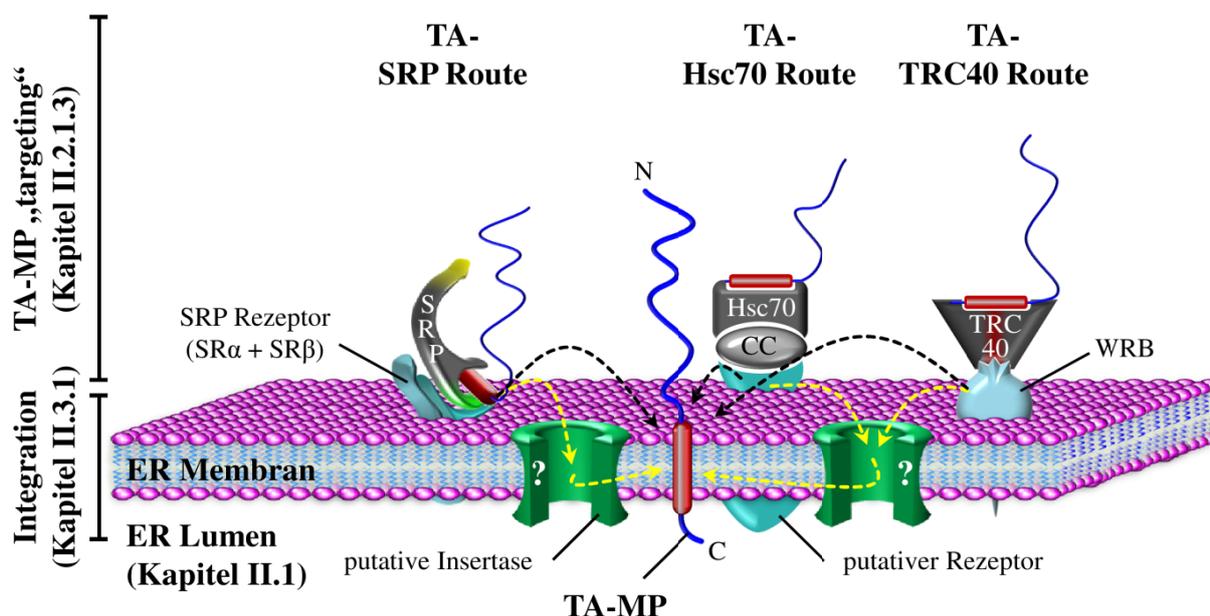


Abb. II-02: ER Membranintegration der „tail-anchor“ Proteine im Säuger
 Das Cartoon zeigt den auf das „targeting“ der „tail-anchor“ Membranproteine (TA-MP) folgenden Schritt der möglicherweise spontanen (schwarzgestrichelte Pfeile) oder proteinvermittelten (gelbgestrichelte Pfeile) Membranintegration. Für keinen der drei TA-MP „targeting“-Möglichkeiten (SRP-, Hsc70/Hsp40-, TRC40-Route; vgl. Abb. II-01) ist der Mechanismus der Cargoinsertion und -integration in die ER Membran bekannt. Nähere Erläuterungen sind den angegebenen Kapiteln zu entnehmen. N/C = N/C-Terminus

Vor allem die Beteiligung des SRP und seines zugehörigen Rezeptors SR beim „targeting“ des Synaptobrevin2 legen die Vermutung nahe, dass zur Integration des Cargos ebenso wie unter den im folgenden Kapitel beschriebenen cotranslationalen Bedingungen auch der Sec61 Komplex der ER Membran als Insertase oder Translokase fungieren könnte.

II.3.2 Der Sec61 Komplex: Schlüsselkomponente der Membraninsertion

Im Gegensatz zu den zuvor besprochenen C-terminal verankerten Proteinen, ist der Mechanismus der Membraninsertion N-terminaler Signalsequenzen genauer bekannt und resultiert letztlich in der vollständigen Translokation in das ER Lumen oder führt – im Falle von Membranproteinen – zur Membranintegration eines Vorläufersubstrates. Die dazu notwendige Pore ist der in allen drei Domänen des Lebens konservierte Sec61 Komplex (Calo & Eichler 2011; du Plessis *et al.* 2011; Park & Rapoport 2012).

Diese für den Proteintransport zentrale Komponente besteht beim Säuger aus den Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ (Görlich *et al.* 1992a; Görlich & Rapoport 1993). Die Namen der entsprechenden Orthologe aus Hefen, Bakterien und Archaeen sind in Tabelle II-01 zusammengetragen (Auer *et al.* 1991; Hartmann *et al.* 1994; Rapoport *et al.* 1996; Kinch *et al.* 2002; Cao & Saier Jr 2003).

Tab. II-01: Übersicht orthologer und paraloger Untereinheiten der heterotrimeren Sec61 Komplexe aus Säugern, Hefen, Archaeen und Bakterien

Sec61 Komplex				
Untereinheit	Säuger	Hefe	Archaeon	Bakterium
α	Sec61 α 1/Sec61 α 2	Sec61p/Ssh1p	SecY	SecY
β	Sec61 β	Sbh1p/Sbh2p	Sec β	SecG
γ	Sec61 γ	Sss1p	SecE	SecE

Passend zu dem Fakt, dass die β -Untereinheiten eine geringere Homologie und Sequenzidentität untereinander aufweisen als die jeweiligen γ - und α -Proteine, sind es auch nur die beiden Letzteren, welche in genetischen Studien an Hefe und Bakterien als essentiell für die Proteintranslokation und Zellviabilität beschrieben wurden (Nishiyama *et al.* 1994; Matlack *et al.* 1998). Im Säuger handelt es sich bei Sec61 β und Sec61 γ um kleine „tail-anchor“ Membranproteine. Das deutlich größere Sec61 α umfasst insgesamt zehn Transmembrandomänen (TMD) mit einem cytosolisch lokalisierten N- und C-Terminus. Die Größendifferenzen legen nahe, dass Sec61 α die porenbildende und somit proteinleitende Untereinheit des trimeren Komplexes repräsentiert. Diese einfache Überlegung wurde eindrucksvoll durch die bisher einzige Kristallstruktur eines gereinigten Sec61YE β Komplexes des Archaeons *Methanococcus jannaschii* (\approx 50% gleiche Aminosäuresequenzen zu Eukaryoten und Eubakterien) bestätigt (Van den Berg *et al.* 2004). Auf Basis dieses

Modells konnten dann auch Strukturen für den Sec61 Komplex des Säugers interpoliert werden (s. Abb. II-03).

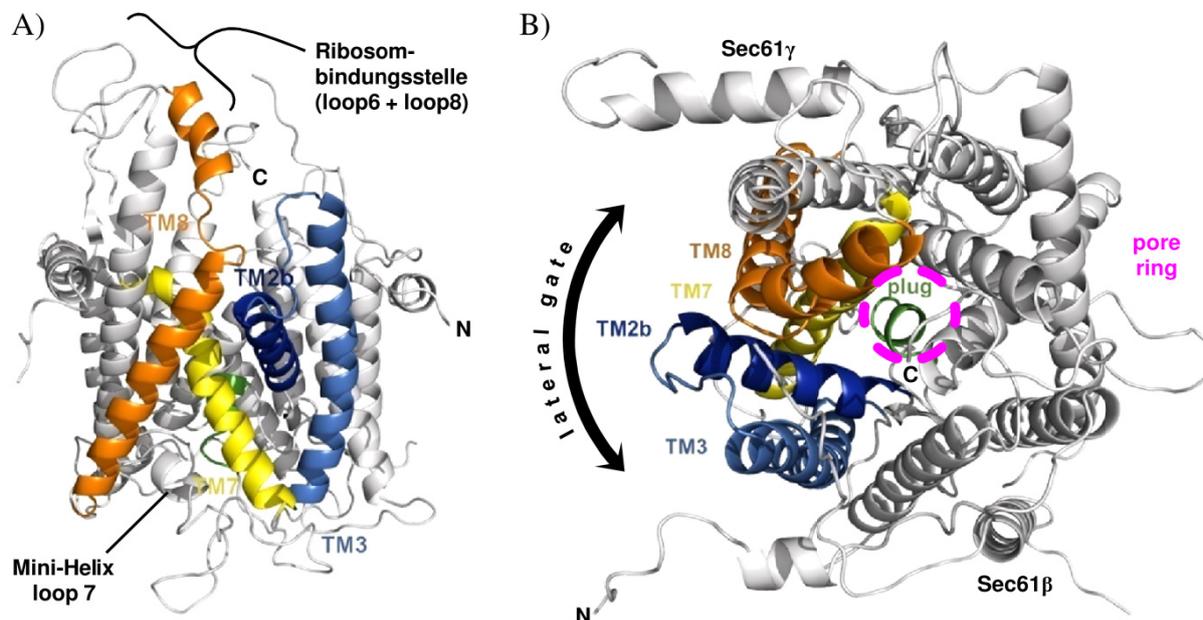


Abb. II-03: Mögliches Homologiemodell des humanen Sec61 Komplexes nach Zimmermann *et al.* (2011) Basierend auf der Röntgenkristallstruktur des SecYE β Komplexes (*M. jannaschii*) und der Sequenz des humanen Orthologs wurde eine putative Struktur des menschlichen Sec61 Komplexes berechnet und als Bänderdiagramm dargestellt. Die α -, β - und γ -Untereinheit sind in grau gezeigt. In den Ansichten (parallel (A) oder senkrecht vom Cytosol (B) zur ER Membranebene) sind die das „lateral gate“ (schwarzer, doppelköpfiger Pfeil) formenende Transmembrandomänen und die vermutlich den Kanal verschließende „plug“ Domäne inklusive des „pore ring“ (sechs große, hydrophobe Aminosäurereste) hervorgehoben. Weitere Strukturmerkmale des Sec61 α (N/C-Terminus (N/C), Ribosombindungsstelle und die Mini-Helix in loop7) sind angedeutet.

Die Anordnung und Struktur des Sec61 Komplexes verdeutlicht, dass lediglich die Sec61 α Untereinheit mit ihren zehn TMD den proteinleitenden Kanal in der Membran bildet. Sie formen eine fast sanduhrförmige Pore mit einer zentralen Konstriktion (bis auf 3 Å), dem „pore ring“ (s. Abb. II-03B). Diese Verengung aus meist sechs radial nach innen zeigenden, hydrophoben Isoleucinresten liegt – von cytosolischer Seite aus betrachtet – knapp oberhalb der TMD2a, die den sogenannten „plug“ formt. Dieser Aufbau aus, banal gesprochen, einer Dichtung („pore ring“) in Verbund mit einem verschiebbaren Stöpsel („plug“) verleiht dem Molekül sowohl Flexibilität zur Translokation der unterschiedlichen Aminosäurereste als auch eine hohe Dichtigkeit vor, während und nach dem Prozess des Proteintransports zur Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere. Die in der Literatur als „plug displacement“ bezeichnete Arbeitsweise wurde nicht nur theoretisch durch berechnete Moleküldynamiken unterstützt (Gumbart & Schulten 2006; Mandon *et al.* 2009; Gumbart *et al.* 2011) sondern auch durch biochemische Quervernetzungsexperimente (Li *et al.* 2007; Saparov *et al.* 2007).

Zudem wird der Proteintransport durch das hydrophobe „Interieur“ des Sec61 α gestützt, welches störende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Kanal und Transportsubstrat vermeiden soll. Die Kombination aus „plug displacement“ und dem „lateral gate“ gestattet darüber hinaus nicht nur die Membranpassage von Vorläufersubstraten ins ER Lumen, sondern auch bei Bedarf deren seitliche Integration in die ER Membran. Das laterale Tor wird durch die TMD2/3 und TMD7/8 gebildet und öffnet zur freien Seite, die weder durch das flankierende Sec61 β oder Sec61 γ besetzt ist (Breyton *et al.* 2002; Van den Berg *et al.* 2004).

Einzelne Untereinheiten des humanen oder murinen Sec61 Komplexes sind mit Krankheiten assoziiert. Homozygote Mäuse mit einer Substitution eines evolutiv stark konservierten Tyrosins zu Histidin (Y344H in loop7; s. Abb. II-03A) im *SEC61A1* Gen (*SEC61A1-Y344H*) entwickeln auf Grund des β -Zellverlustes des Pankreas eine Typ2 Diabetes mellitus (Lloyd *et al.* 2010). Genetische Analysen zeigen, dass in etwa $\frac{3}{4}$ der Fälle der Glioblastoma multiforme (bösartiger Hirntumor) das *SEC61G* (kodiert Sec61 γ) auf Chromosom 7 amplifiziert ist (Lu *et al.* 2009). Die gleiche Studie beschreibt auch, dass es im umgekehrten Fall der siRNA vermittelten *SEC61G* Depletion in behandelten Zellen zu einer reduzierten Zellproliferation und erhöhten Apoptoserate kommt. Beide Krankheiten könnten in direktem Zusammenhang zu einer veränderten Proteintranslokation stehen, deren genauer Ablauf trotz der lehrreichen Kristallstruktur des zentralen Transporters weiterer Einzelheiten bedarf.

Wie gelangt ein durch das SRP-abhängige, cotranslationale „targeting“ (s. Kapitel II.2.1.1) zur ER Membran dirigierter Ribosom-naszierende Kette-Komplex (RNC) vom SRP Rezeptor (SR) zum Sec61 Komplex? Ein Modell besagt, dass Sec61 β als GTP-Austauschfaktor für den GDP/GTP Zyklus des SR β fungiert, welches nur in GTP-Form mit SR α interagiert. Somit würde der funktionale SR nur in unmittelbarer Nähe des Sec61 Komplexes assemblieren und der RNC kann membrannahe zum Sec61 Komplex transferiert werden (Helmerts *et al.* 2003). Unterstützt wird der Transfer des RNC zum Sec61 Komplex durch zwei weitere Aspekte. Der Sec61 Komplex interagiert in zweiter Instanz selbst mit Signalsequenzen (Jungnickel & Rapoport 1995). Zahlreiche Quervernetzungsexperimente mit reaktiven Seitenketten, v.a. in der h-Domäne der Signalsequenz, belegen deren Interaktion mit Sec61 α hauptsächlich mit TMD2 und TMD7, dem „lateral gate“ (High *et al.* 1993; Mothes *et al.* 1994; Martoglio *et al.* 1995; Mothes *et al.* 1998). Darüber hinaus besitzt der Sec61 Komplex durch die cytosolischen Schleifen 6 und 8 des Sec61 α eine hochaffine Ribosombindungsstelle (s. Abb. II-03A), welche vermutlich den Transfer des RNC zum Sec61 Komplex unterstützt (Raden *et al.* 2000;

Song *et al.* 2000). Die Affinität liegt bei etwa 10 nM (Prinz *et al.* 2000; Burgard 2009) und die ribosomalen Proteine Rpl23a und Rpl35 stehen Sec61 α am nächsten (Becker *et al.* 2009). Um eine zum Sec61 Komplex dirigierte naszierende Kette mit einem Durchmesser von 5 Å (ungefaltet) bis zu 12 Å (α -helikale TMD) auch tatsächlich zu translozieren muss sich die Pore des Sec61 α variabel weiten. Tatsächlich demonstrieren elektrophysiologische Messungen in Lipidbilayern rekonstituierter Sec61 Komplexe aus Säugern und Fluoreszenz- quenchingexperimente eine fluktuierende Pore mit Spannweiten von 6 - 60 Å (Hamman *et al.* 1997; Wirth *et al.* 2003).

Wie aber kann ein Molekül sich auf bis zu 60 Å weiten, wenn es in der Ebene der Membran selbst nur 40 Å im Durchmesser einnimmt? Könnten sich durch eine Oligomerisierung mehrerer trimerer Sec61 Komplexe größere Translokationsporen ausbilden? Während FRET- Analysen von Snapp *et al.* (2004) die Oligomerisierung affirmieren, sprechen aktuelle Cryoelektronentomogramme von monomeren Hefe- oder Säuger-Sec61 Komplexen die mit (in-) aktiven Ribosomen in Kontakt treten (Ménétret *et al.* 2008; Becker *et al.* 2009). Ungeachtet des Oligomerisierungsgrades sind Sec61 Komplexe durch solch große Poren fähig bei der Biogenese polytooper Membranproteine bis zu vier TMD direkt in unmittelbarer Umgebung zu beherbergen und anschließend kooperativ in die Membran zu entlassen (Borel & Simon 1996; Sadlish *et al.* 2005; White & von Heijne 2008; Skach 2009).

Wie impermeabel für Ionen ist der Sec61 Komplex tatsächlich? Die zur Bestimmung der Porengröße verwendete Elektrophysiologie misst den Fluss von Ionen, um indirekt Aussagen über die Porengröße und weitere molekulare Kenngrößen des Kanals zu gewinnen (Harsman *et al.* 2011a; 2011b). Die zuvor erwähnte hohe Dynamik des Porendurchmessers (6 - 60 Å) des – zumindest eukaryotischen – Sec61 Komplexes spricht also für eine parallele Ionenpermeabilität während des Proteintransports. Bedingt durch den bei Strukturanalysen gefundenen 10 - 12 Å großen Spalt zwischen Sec61 Komplex und dem während des cotranslationalen Proteintransportes aufsitzenden 80 S Ribosom (Durchmesser \approx 25 nm) kann auch letzteres den Sec61 Komplex alleine nicht vollends abdichten (Ménétret *et al.* 2008). Die Permeabilität des in der ER Membran abundanten Sec61 Komplexes (Guth *et al.* 2004) bietet somit einen Ansatzpunkt für die in der Literatur mehrfach beschriebene Permeabilität des ER gegenüber Ionen (v.a. Ca²⁺) und kleinen Molekülen wie Glukosederivaten (Heritage & Wonderlin 2001; Roy & Wonderlin 2003; Le Gall *et al.* 2004). Treffenderweise wird der Sec61 Komplex ebenfalls in seiner Dynamik und Transportaktivität durch den generellen Kalziumkanalblocker Lanthan inhibiert (Erdmann *et al.* 2009); ein weiteres Indiz der putativen Ionenpermeabilität des Sec61 Komplexes.

Da weder Sec61 α noch die beiden TA-MP Sec61 β/γ ein ER Retentionssignal besitzen, vermitteln vermutlich weitere akzessorische Faktoren den Rückhalt des Sec61 Komplexes. Das Konglomerat aus Sec61 Komplex und weiteren akzessorischen Faktoren bezeichnet man als Translokon, oder um Stellung zu seiner enzymatischen Funktion als Proteintransporter zu beziehen, als Translokase. Die Existenz solch eines makromolekularen Ensembles wurde mit Hilfe der FRAP-Methode demonstriert. Ein chimäres GFP-Dad1 Protein, welches als funktionale Untereinheit der Oligosaccharyltransferase als Bestandteil eines Translokons gilt, hat innerhalb des Lipidbilayers eine deutlich geringere laterale Mobilität als ein nicht im Komplex befindliches Kontrollprotein der ER Membran (Nikonov *et al.* 2002; Nikonov *et al.* 2007). Weitere putative Untereinheiten und ihr Beitrag zur Funktion der Translokase sind im nächsten Kapitel aufgeführt.

II.3.3 Die ER Translokase

Das Translokon repräsentiert einen modulierbaren, heteromultimeren Proteinkomplex dessen variable Zusammensetzung sich offensichtlich den Anforderungen bestimmter Substrate und Gegebenheiten anpassen kann. Eine mögliche Gliederung der akzessorischen Untereinheiten des Sec61 Komplexes ist deren Einteilung nach luminalen Proteinen und Membranproteinen mit oder ohne J-Domäne (Hennessy *et al.* 2005; Jiang *et al.* 2007; Weitzmann *et al.* 2007).

II.3.3.1 Akzessorische Membranproteine des Translokons ohne J-Domäne

a) TRAM

Das „translocating chain-associating membrane protein“, kurz TRAM, wurde als eines der ersten den Sec61 Komplex ergänzenden Translokonuntereinheiten gefunden. Einige der an rekonstituierten Proteoliposomen getesteten Vorläufersubstrate (z.B. Präpro- α -Faktor) benötigen neben dem gereinigten Sec61 Komplex und dem SRP Rezeptor auch TRAM für eine effiziente Translokation (Görlich & Rapoport 1993). TRAM ist ein polytopes (8 TMD) Glykoprotein der ER Membran, welches die geladene n-Domäne einer Signalsequenz binden kann und die Vorläufersubstrattranslokation stimuliert (Voigt *et al.* 1996; Tamborero *et al.* 2011). Das in Hundepankreasmikrosomen mit 1,74 μ M abundante TRAM kann kalziumabhängig phosphoryliert werden (Gruss *et al.* 1999; Guth *et al.* 2004).

b) TRAP

TRAP („translocon-associated protein complex“) ist ein Heterotetramer, welches, ebenso wie TRAM, substratspezifisch (z.B. Prionprotein) die Translokation fördern kann (Fons *et al.* 2003). Wie Cryoelektronentomogramme zeigen, assoziiert das phosphorylierbare TRAP in einer 1:1 Stöchiometrie mit dem Sec61 Komplex (Ou *et al.* 1992; Ménétret *et al.* 2008).

c) RAMP4

Das ribosomassoziierte Membranprotein 4 (RAMP4) ist ein kleines „tail-anchor“ Membranprotein das eindrucksvoll die Dynamik des Translokons widerspiegelt (Hori *et al.* 2006). Nur in Anwesenheit einer TMD innerhalb des ribosomalen Tunnels wird RAMP4 zum Sec61 Komplex rekrutiert und moduliert möglicherweise den Ribosom-Translokon-Komplex zwischen einem Substrattranslokations- und -integrationsmodus (Johnson 2009; Pool 2009).

d) Sec62

Das in Hundepankreas-mikrosomen mit 2 μM in stöchiometrischen Mengen zum Sec61 α vorhandene Sec62 Membranprotein (= Htp1) trägt zwei TMD mit einem cytosolischen N- und C-Terminus ohne ER Retentionssignal (Dudek *et al.* 2009). Während das Hefeortholog essentiell für Viabilität und den posttranslationalen Proteintransport in das ER Lumen ist (Deshaies & Schekman 1989; Stirling *et al.* 1992), ist eine siRNA vermittelte Langzeitdepletion des Sec62 in Säugerzellen nicht letal (Melanie Theis, persönliche Mitteilung) und seine Beteiligung am Proteintransport Gegenstand aktueller Untersuchungen. Jedoch bindet Sec62 des Säugers hochaffin ($K_D = 100 \text{ pM}$) mittels seines stark positiv geladenen N-Terminus Ribosomen nahe des Tunnelausgangs und ist *in vitro* in der Lage die ribosomale Proteinsynthese auf dem Level der Initiation zu hemmen (Müller *et al.* 2010). Um dennoch eine stabile Proteintranslokation zu ermöglichen, wird die Sec62 bedingte Hemmung der Proteinsynthese vermutlich durch weitere Bindungspartner (Sec63, BiP; s. II.3.3.2 und II.3.3.3) reguliert. Datenbankrecherchen beruhend auf Sequenzmotiven listen Sec62 als möglichen Kationenkanal (Dudek *et al.* 2009) mit zwei putativen EF-Handmotiven (Stefan Schorr, persönliche Mitteilung). Vergleichsstudien an Patienten mit Prostatakarzinom zeigen einhergehend mit einer häufigen Amplifikation des *SEC62* Gens (Chromosom 3q26) eine erhöhte Expression des *SEC62* auf Ebene der mRNA und des Proteins (Jung *et al.* 2006; Linxweiler *et al.* 2012). Umgekehrt korreliert eine siRNA vermittelte Depletionsstudie an etablierten Prostatakarzinom-Zelllinien den Rückgang der Zellmigration, des invasiven Wachstumspotentials als auch der Stresstoleranz gegenüber Thapsigargin mit dem Sec62 Gehalt (Greiner *et al.* 2011a; 2011b).

e) Posttranslational modifizierende Enzymkomplexe des ER (SPC und OST)

Wie *in vitro* Experimente rekonstituierter Proteoliposomen zeigen, haben diese das Vorläufersubstrat posttranslational modifizierenden multimeren Enzymkomplexe keinen Einfluss auf die Translokation oder Integration eines Proteins. Dennoch sind die von ihnen *in vivo* katalysierten Prozesse entscheidend für eine korrekte Proteinfaltung. Sowohl die Signalpeptidase (SPC) als auch Oligosaccharyltransferase (OST) tragen das katalytisch aktive Zentrum auf luminaler Seite der ER Membran (Burda & Aebi 1999; Paetzel *et al.* 2002; Kelleher & Gilmore 2006; Wilson & High 2007). Daher sind die durch die SPC und OST katalysierten Prozessierungen des Vorläufersubstrates, die Signalsequenzabspaltung oder Glykosylierung, welche deutlich dessen Molekulargewicht verändern, ein entscheidender Indikator für die Membranpassage eines transportierten Proteins. Daten chemischer Quervernetzungen zwischen Sec61 β und einer SPC Untereinheit (SPC25) sprechen von einer transienten Rekrutierung der SPC zum Translokon in Abhängigkeit gebundener Ribosomen (Kalies *et al.* 1998).

Zwei weitere mögliche Enzymkomplexe des Translokons sind die in der h-Domäne des Signalpeptids spaltende Signalpeptidpeptidase (SPPase) und die GPI-Transamidase zum Anfügen eines C-terminalen Glykosylphosphatidyl-(GPI)-ankers (Lemberg & Martoglio 2002; Ohishi *et al.* 2003; Lemberg & Martoglio 2004; Kamariah *et al.* 2011)

II.3.3.2 Akzessorische Membranproteine des Translokons mit J-Domäne

Die etwa 70 Aminosäurereste umfassende J-Domäne bezeichnet ein charakteristisches Sequenzmerkmal aller Chaperone des Typs Hsp40, welche auf Grund ihrer Homologie zum bakteriellen DnaJ Protein auch als DnaJ-Familie bezeichnet werden (Greene *et al.* 1998; Hennessy *et al.* 2000). Die J-Domäne, die in ihrer Sekundärstruktur aus vier α -Helices (I-IV) besteht (Suh *et al.* 1998; 1999), beinhaltet zwischen den Helices II und III das hochkonservierte Tripeptidmotiv aus Histidin, Prolin und Aspartat (HPD-Motiv). Durch das HPD-Motiv der Hsp40 Cochaperone erfolgt die Interaktion mit und Stimulation der ATPase-Domäne von Hsp70 Chaperonen (Cheetham *et al.* 1994; Qian *et al.* 1996; Cheetham & Caplan 1998).

Im Säuger sind bisher sieben verschiedene dem ER zugehörige Hsp40 Proteine bekannt (ERj1 - ERj7), wobei vier davon Membranproteine (ERj1, ERj2, ERj4 und ERj7) darstellen (Otero *et al.* 2010).

a) ERj1

ERj1 (= Mtj1) ist ein nicht im Hefegenom kodiertes Typ I Membranprotein, welches seine N-terminale J-Domäne ins ER Lumen exponiert und innerhalb seiner cytosolischen Domäne ein zu Sec62 (s. II.3.3.1) analoges basisches Oligopeptid aufweist (Dudek *et al.* 2002). Wie bei Sec62 erlaubt dieses basische Oligopeptid die hochaffine Interaktion mit Ribosomen nahe dem Tunnelausgang ($K_D = 30 \text{ pM}$) und ist ebenfalls fähig *in vitro* die Proteinsynthese auf dem Level der Initiation zu hemmen (Blau *et al.* 2005; Dudek *et al.* 2005). Im Gegensatz zu Sec62 können aber sowohl die Ribosomenbindungsaffinität als auch die Interferenz mit der Proteinsynthese direkt über die luminalen J-Domäne des ERj1 durch den luminalen Interaktionspartner BiP (s. II.3.3.3) moduliert werden. Die Assoziation des Hsp70 Chaperons BiP an die J-Domäne mindert die hohe Affinität zwischen ERj1 und Ribosom und beendet vollständig den Translationsarrest (Dudek *et al.* 2005; Benedix *et al.* 2010).

Das Modell der regulierbaren Proteinsyntheseinhibition des cytosolischen, positiv geladenen Oligopeptids durch die Interaktion der J-Domäne mit BiP wäre auch für Sec62 plausibel. Durch die in Säugern und Hefe beobachtete Interaktion zwischen Sec62 und Sec63 stünde auch Sec62 quasi eine modulierende J-Domäne zur Verfügung (Tyedmers *et al.* 2000; Wittke *et al.* 2000; Müller *et al.* 2010). Bestärkt wird dieses Modell durch Komplementationsexperimente, die zeigen, dass humanes ERj1 den letalen Sec63 Phänotyp der Hefe retten kann (Kroczyńska *et al.* 2004; Dudek *et al.* 2009).

b) ERj2 (= Sec63)

Ein weiteres membranständiges J-Domänen Protein im Säuger ist Sec63, welches dreimal die Membran durchspannt. Die J-Domäne liegt luminal zwischen der zweiten und dritten TMD. Der cytosolisch gelegene C-Terminus beherbergt ein stark saures Oligopeptid, das vermutlich die Assoziation zu Sec62 über dessen basisches Peptid ermöglicht (Skowronek *et al.* 1999). Zudem interagiert der cytosolische Teil von Sec63 mit Nukleoredoxin und stellt somit über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine mögliche Erklärung für die Beteiligung des *SEC63* Gens an der Polycystischen Lebererkrankung bereit (Davila *et al.* 2004; Müller *et al.* 2011). Zwar liegt Sec63 in Hundepankreasmikrosomen gemeinsam mit Sec62 in äquimolaren Verhältnissen zu Sec61 α ($\approx 2 \text{ }\mu\text{M}$) vor, doch eine lebensfähige *SEC63*^{-/-} Zelllinie schließt eine essentielle Funktion des Sec63 aus (Tyedmers *et al.* 2000; Fedeles *et al.* 2011).

Das Sec63p Protein der Hefe dagegen ist essentiell und als Komponente des heptameren SEC als auch des hexameren SEC' Komplexes (Sec62 fehlt) notwendig für den post- und co-translationalen Proteintransport (Feldheim *et al.* 1992; Panzner *et al.* 1995; Jermy *et al.* 2006).

II.3.3.3 Luminale Komponenten des Translokons

a) BiP

BiP steht für „immunoglobulin heavy chain binding protein“ und kann alternativ auch als Grp78 „Glukose reguliertes Protein mit 78 kDa“ oder HSPA5 bezeichnet werden (Haas & Wabl 1983; Munro & Pelham 1986). BiP ist mit einer Konzentration von 5 μ M in rauen Hundepankreas-mikrosomen das zentrale Hsp70 Chaperon des ER Lumens und hat deren typischen Aufbau aus einer N-terminalen Nukleotid-Bindedomäne (NBD) welche über eine hydrophobe „linker“ Region mit einer Peptid-Bindedomäne (PBD) in Verbindung steht (Bies *et al.* 1999; Smock *et al.* 2010). Typische Substrate der PBD sind kurze, sieben überwiegend hydrophobe Aminosäuren umfassende Sequenzmotive, welche bei bereits gefalteten Proteinen nicht mehr zur Oberfläche exponiert sein sollten (Fourie *et al.* 1994; Mayer & Bukau 2005; Dill *et al.* 2008). Ebenfalls entscheidend für die Substratbindung und Diskriminierung ist neben der „lid“ Domäne der PBD auch das entsprechende J-Domänen Hsp40 Cochaperon (Marcinowski *et al.* 2011). In Kooperation mit einer J-Domäne und einem Nukleotidaustauschfaktor (NEF) kann BiP einen nachfolgend beschriebenen Hsp70-Zyklus durchlaufen (s. Abb. II-04). Mit gebundenem ATP in der NBD besitzt die PBD eine geöffnete Konformation mit geringer Substrataffinität. Die Stimulation der schwachen intrinsischen ATPase-Aktivität der NBD durch die J-Domäne katalysiert die ATP-Hydrolyse und führt zu einer Konformationsänderung mit geschlossener PBD, welche das Substrat mit vielfach höherer Affinität bindet. Um den Zyklus zu vervollständigen und das Peptid wieder zu entlassen, wird ein NEF benötigt. Durch den vom NEF vermittelten ADP-ATP-Austausch wird das Substrat aus der PBD freigegeben und kann den nächsten Zyklus aus Assoziation und Dissoziation durchlaufen bis es seine korrekte Konformation eingenommen hat (Kampinga & Craig 2010; Young 2010). Die Funktion von BiP als Chaperon erlaubt eine Assoziation mit vielen weiteren Proteinen und erklärt dessen Beteiligung an einer Unzahl zellulärer Prozesse. Die transiente Interaktion von BiP mit Faltungsintermediaten und auch fehlgefalteten Proteinen gestatten die Schlussfolgerung, dass BiP an der Faltung, Assemblierung und Qualitätskontrolle neugefalteter Proteine beteiligt ist (Hurtley *et al.* 1989; Machamer *et al.* 1990; Knittler & Haas 1992; Knittler *et al.* 1995). Die Demonstration der luminalen Abdichtung der Translokationpore durch BiP vor und während der Translokation eines Transportsubstrates mittels Fluoreszenzquenchingexperimenten an rekonstituierten Proteoliposomen sprechen für die räumliche Nähe zwischen BiP und dem Sec61 Komplex (Hamman *et al.* 1998; Haigh & Johnson 2002; Alder *et al.* 2005). Die räumliche Nähe, möglich durch membranständige J-Domänen (ERj1, Sec63) der Translokase, gestattet es BiP aktiv durch die Bindung ungefalteter, translozierender Polypeptide deren Transport zu fördern

(Tyedmers *et al.* 2003). Desweiteren wird BiP eine entscheidende Rolle bei den Prozessen der “unfolded protein response” (UPR) und der ER assoziierten Degradation (ERAD) zugeschrieben. Zwei zelluläre Reaktionsmechanismen als Antwort auf eine Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER, die entweder selbst oder durch das Rekrutieren von BiP beide gekoppelten Signalwege aktivieren (Ron & Walter 2007; Hoseki *et al.* 2009; Mori 2009; Määttänen *et al.* 2010; Walter & Ron 2011). Kürzlich publizierte Arbeiten, die auf der BiP Depletion in Säugerzellen beruhen, zeigen ebenfalls die Verringerung der ERAD (Lass *et al.* 2008), die Induktion der UPR (Wolfson *et al.* 2008) sowie eine reduzierte Virusassemblierung und Dislokation des SV40, Dengue- und Cytomegalievirus (Buchkovich *et al.* 2008; Wati *et al.* 2009; Geiger *et al.* 2011). Die fünf letztgenannten Publikationen verwendeten zur effektiven BiP Depletion das gereinigte Subtilase Zytotoxin (Paton *et al.* 2004).

Die Subtilase (SubAB) bildet neben den Shiga-, Pertussis- und Cholera-toxinen (inklusive der hitzelablen Enterotoxine) die vierte Familie der AB₅ Toxinfamilie (Beddoe *et al.* 2010). Im Gegensatz zum cytosolischen Wirkort aller anderen AB₅ Toxine, trifft SubAB nach seiner Internalisation und dem retrogradem Transport in infizierten Zellen bereits im ER auf sein Zielsubstrat BiP (Chong *et al.* 2008). Während die pentamere B-Untereinheiten als Lektin den Tropismus des Toxins vermittelt (bindet an terminale α 2-3 verknüpfte N-Glykolylnuramin-säurereste an α 2 β 1 Integrin (Yahiro *et al.* 2006)), ist es die katalytische A-Untereinheit, welche im ER als typische Serinprotease agiert. Die tief im Subtilaseenzym eingebettete katalytische Triade erklärt die extreme Substratspezifität des Toxins, welches BiP in der evolutiv konservierten „linker“ Region in einem Dileucin (L₄₁₆-L₄₁₇) spaltet (Paton *et al.* 2006). Die phänotypische Ausprägung der Subtilase bzw. der BiP Spaltung in Mensch und Maus ist das auch mit shigatoxischen *E. coli* (STEC) Stämmen einhergehende hämolytisch-urämische Syndrom (HUS, Gasser-Syndrom), eine Triade aus mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen (Wang *et al.* 2007). Wie einige STEC bedingte HUS-Epidemien zeigen, ist das Syndrom im Extremfall tödlich.

b) Die Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) Grp170 und BAP (= Sil1)

Sowohl Grp170 als auch das mit dem Marinesco-Sjögren Syndrom in Verbindung gebrachte BAP (BiP assoziiertes Protein) stellen zwei alternative NEF für BiP im ER Lumen des Säugers dar und unterstützen als Cochaperone dessen Hsp70-Zyklus (Senderek *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2005; Weitzmann *et al.* 2006; 2007). Erst der Verlust beider Hefehomologe (Lhs1p, Sil1p) ist synthetisch letal (Tyson & Stirling 2000) und spricht für ihre Redundanz.

II.4 Termination des Proteintransports zum ER

Der finale Schritt der Proteintranslokation eines Substrates ist die Termination des Transportprozesses. Mit dessen Vollendung wird ein lösliches Protein vollständig in das ER Lumen transloziert, ein Membranprotein als integraler Bestandteil in die ER Membran entlassen und das Translokon verschlossen. Nach dem durch die Signalsequenz diktierten „targeting“ zur ER Membran (s. Kapitel II.2), dem Transfer und Insertion in den Sec61 Komplex (s. Kapitel II.3.2) ist es die Aufgabe der Translokase (s. Kapitel II.3.3) das Transportsubstrat seinen Anforderungen entsprechend zu transportieren (s. Abb. II-04). Was aber ist die treibende Kraft für die Translokation durch den nur als passive, proteinleitende Pore agierenden Sec61 Komplex? Im Falle der SRP-abhängigen, cotranslational initiierten Transportroute ist es wahrscheinlich die nach dem Lösen vom SRP und Transfer in den Sec61 Komplex wieder fortschreitende ribosomale Proteinsynthese. Die bei Eintritt ins Lumen beginnende Faltung und Modifikation des naszierenden Polypeptids ergänzt die Translokation und ermöglicht auch die Passage der letzten 70-80 Aminosäuren noch außerhalb des ER nach Beenden der ribosomalen Synthese. Für den SRP-unabhängigen Transport könnte möglicherweise ausschließlich die intrinsische oder chaperongestützte Faltung und Modifikation die treibende Kraft zur Translokation sein. Mehr und mehr gebundene BiP Moleküle beispielsweise würden wie eine molekulare Ratsche ein Zurückrutschen des Substrates verhindern und so dessen Transport lotsen (Matlack *et al.* 1999; Tyedmers *et al.* 2003; Zimmermann *et al.* 2011).

Nach der Termination des Proteintransportes können Ribosomen durch die hochaffinen Bindungspartner (Sec61 α , ERj1, Sec62) an der ER Membran verbleiben und bei Synthese eines sekretorischen Proteins die nächste Membraninsertion ohne „targeting“ einleiten (Potter & Nicchitta 2000; Potter *et al.* 2001; Potter & Nicchitta 2002; Stephens *et al.* 2005).

Eine schematische Übersicht über die einzelnen Schritte und Eckpunkte des SRP-abhängigen Proteintransportes zum ER ist im nachfolgenden Cartoon (Abb. II-04) illustriert. Auf Grund der Unkenntnis über die genauen Vorgänge und Abläufe der SRP-unabhängigen Proteintranslokation ins ER von Säugern, wurde auf eine separate Skizze dieser Transportroute verzichtet. Die Vergleichbarkeit der im co- und posttranslationalen Modus agierenden Translokasen ist eine offene Frage. Ob in Analogie zur Situation in Hefe ein posttranslational agierender SEC Komplex und ein SEC' Komplex für die cotranslationale „Performance“ existieren, die sich durch die An-/Abwesenheit von Sec62 unterscheiden, bleibt abzuwarten (Willer *et al.* 2003; Jermy *et al.* 2006; Wilkinson & Stirling 2009).

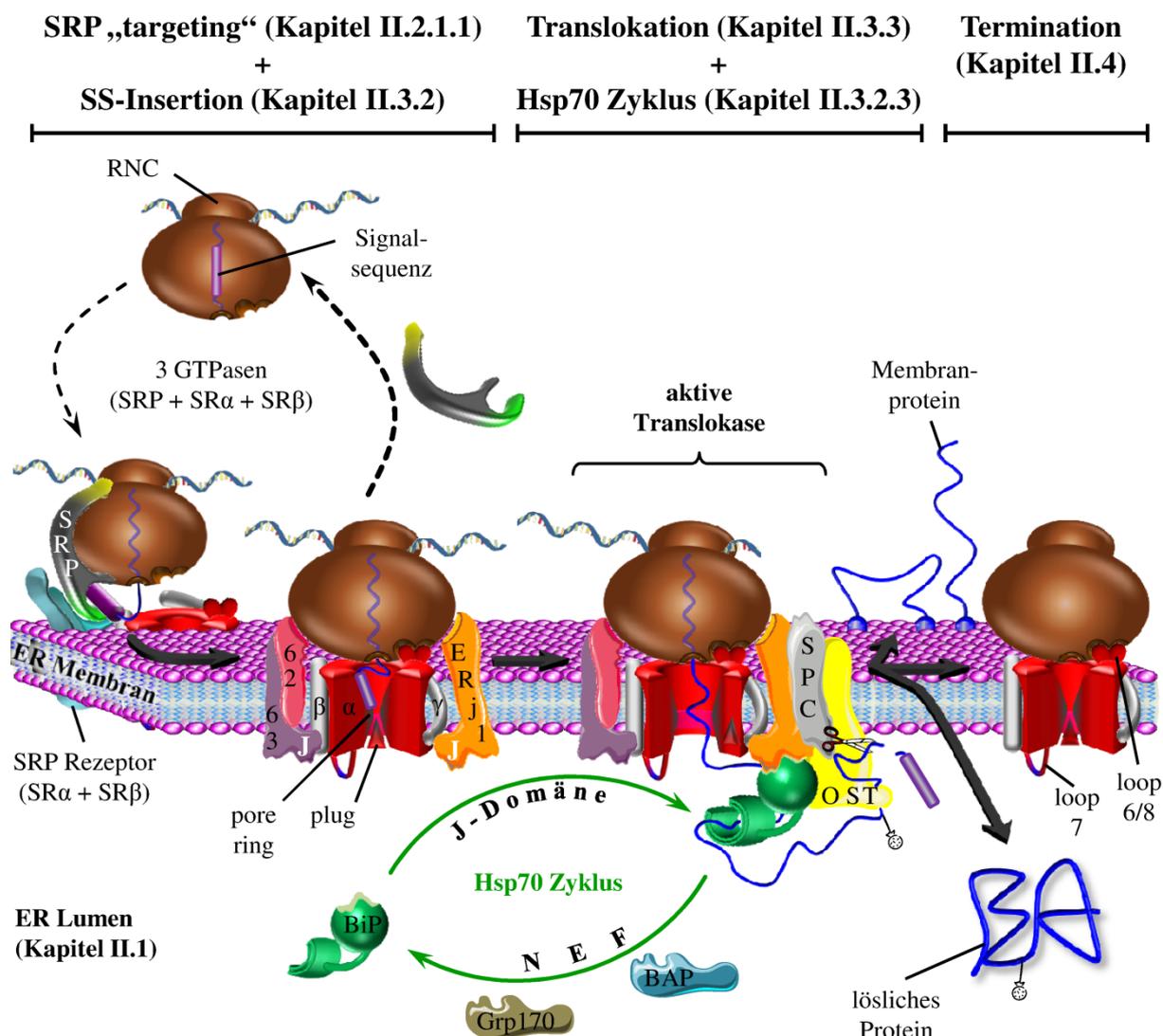


Abb. II-04: SRP-abhängiger Proteintransport im Säuger

Illustriert sind die Einzelschritte und Komponenten des cotranslationalen Proteintransportes vom „targeting“ über Signalsequenz-Insertion (SS-Insertion) mit folgender Translokation und Termination inklusive des Hsp70-Zyklus. Die Blickrichtung ist parallel zur Membranebene direkt in das laterale „gate“ des Sec61α (α), dessen verschiedene Charakteristika (pore ring, plug, loop7 und loop6/8) einschließlich Sec61β (β) und Sec61γ (γ) hervorgehoben sind (vgl. Abb. II-03). 62/63 = Sec62/63; J = J-Domäne; NEF = Nukleotidaustauschfaktor; OST = Oligosaccharyltransferase; RNC = Ribosom-naszierende Kette-Komplex; SPC = Signalpeptidase; SRP = „signal recognition particle“

Das ER Lumen stellt verglichen mit dem Cytosol eine deutlich andere Umgebung für Proteine dar. Neben dem Wechsel in ein stark oxidatives Milieu treffen translozierte Polypeptide im ER Lumen auch auf eine andere Ionenzusammensetzung, vor allem in Bezug auf die vorherrschende Kalziumkonzentration. Wie und mit welcher Effektivität trotz des dauernden Proteinaustauschs zwischen ER und Cytosol (Proteinbiogenese versus Degradation) das ER diese Kalziumbedingungen aufrecht erhält, ist Bestandteil des nächsten Kapitels.

II.5 Kalziumhomöostase des ER

Kalzium gilt in der Biologie wohl als der vielseitigste und bekannteste sekundäre Botenstoff der Zelle. Das Spektrum an Kalziumsignalwegen reicht von der Fertilisation einer Eizelle und der Zellproliferation bis hin zur Apoptose und gesteuerten Zelldegeneration. Weitere kalzium-sensitive Prozesse umfassen die Muskelkontraktion, Transmitterfreisetzung, Genexpression, metabolische Aktivität oder das Gedächtnis (Berridge *et al.* 2000). Kalzium ist also ein pleiotropes Ion, welches zudem auch im ER unabdingbar für die Prozessierung, Faltung und den Export von Proteinen ist (Berridge 2002). Im Gegensatz zur Hefe stellt das ER des Säugers den intrazellulären Hauptkalziumspeicher dar und weist alle erforderlichen Elemente eines mobilen Speichers auf: kalziumpuffernde Proteine (1) zur Erhöhung der Speicherkapazität, Kalziumkanäle (2) und -pumpen (3) für den Kalziumaustausch (Rizzuto & Pozzan 2006; Harsman *et al.* 2011c). Die inhomogene Struktur des ER (s. Kapitel II.1) setzt sich auch auf Ebene der Speicherelemente (1) - (3) und somit auch für Kalzium selbst fort (Papp *et al.* 2003). Elektronenenergieverlustspektroskopie und Messungen mit lumineszierendem Äquorin bestätigen diese heterogene Verteilung der Kalziumkonzentration im ER (Pezzati *et al.* 1997; Meldolesi & Pozzan 1998). Durch die abundanten Kalziumpuffer liegt die durchschnittliche Konzentration an freiem Kalzium im ER etwa bei 100 - 800 μM während die totale Kalziumkonzentration auf 1 - 2 mM geschätzt wird (Robert *et al.* 1998; Park *et al.* 2002; Feske 2007; Ziman *et al.* 2010).

II.5.1 Kalziumeigenschaften

Was verleiht Kalzium seine Vielseitigkeit zur Beteiligung an so vielen Signalwegen? Der Schlüssel liegt in den physikochemischen Eigenschaften des Ions und in der Fähigkeit der Zelle das Kalziumsignal räumlich und zeitlich zu organisieren. Kalzium besitzt eine flexible Koordinationschemie, eine hohe Affinität für Carbo(n/x)ylreste, das häufigste Strukturmotiv in Aminosäuren, und eine schnelle Bindungskinetik (Jaiswal 2001; Case *et al.* 2007). Diese drei Eigenschaften machen Kalzium zu einem idealen Interaktionspartner biologischer Moleküle. Durch seine positive Ladung kann es zudem bei Assoziation das elektrostatische Feld und die Konformation eines Bindungspartners merklich beeinflussen. Die Kehrseite dieser Eigenschaften ist, dass bei erhöhter Konzentration Kalzium für alle Organismen zytotoxisch wirkt auf Grund der Präzipitation von Phosphaten (ATP), der Aggregation von Proteinen und Nukleinsäuren sowie des Integritätsverlusts von Membranen (Clapham 2007).

II.5.2 Kalziumpuffernde Chaperone des ER

In seiner Funktion als Kalziumspeicher dient das ER verschiedenen Kalziumsignalwegen als Reservoir und der Erhaltung der intrazellulären Kalziumhomöostase (Rao *et al.* 2002). Um gleichzeitig viel Kalzium zu speichern und die Konzentration an freiem, „reaktiven“ Kalzium möglichst gering zu halten, ist der Großteil des im ER gespeicherten Kalziums an kalziumbindenden/-puffernden Proteinen angelagert. Das humane Genom kodiert rund 200 kalziumbindende Proteine, wovon im ER nur vier davon den Großteil der Pufferfunktion übernehmen. Die Hauptkalziumpuffer des ER sind die Chaperone Calreticulin, BiP, Grp94 und PDI (Milner *et al.* 1991; Carafoli *et al.* 2001). Calreticulin bindet 50 % und BiP weitere 25 % des gesamten retikulären Kalziums (Lievremont *et al.* 1997; Nakamura *et al.* 2001). Gemeinsam ist den ER kalziumbindenden Chaperonen ihre geringe Affinität ($K_D \approx 1 \text{ mM}$) bei hoher Kapazität (Dutzende von Kalziumionen pro Molekül), sodass im ER auf ein freies Kalziumion etwa zehn Gebundene kommen (Ashby & Tepikin 2001; Paredes *et al.* 2008).

Die Beteiligung der Chaperone an der Kalziumpufferung erklärt auch die Beeinflussung von Prozessen wie Proteinfaltung, Qualitätskontrolle, Sekretion und der UPR durch den ER luminalen Kalziumgehalt (Michalak *et al.* 2002).

II.5.3 Passive Kalziumkanäle („leak“ Kanäle)

Neben den kalziumpuffernden Proteinen stellen die passiven Kalziumeffluxkanäle das zweite erforderlich Element eines mobilen Speichers dar. Der passive Kalziumleckstrom beschreibt einen permanenten, dem chemischen Gradienten folgenden Ausstrom von Kalzium aus dem ER in Abwesenheit einer physiologischen Stimulation durch einen Agonisten. Mit rund $100 \mu\text{M}$ ist die freie Kalziumkonzentration des ER mindestens drei Zehnerpotenzen größer als im Cytosol ($50 - 100 \text{ nM}$), was zu einem kontinuierlichen, dem Gradienten folgenden, Kalziumleckstrom über die ER Membran führt. Und obwohl dieser seit langem bekannte, omnipräsente basale Kalziumefflux in manchen Zelltypen in der Lage ist binnen weniger Minuten das ER massiv an Kalzium zu depletieren, wird über die nötigen „leak“ Kanäle noch diskutiert (Barrero *et al.* 1997; Camello *et al.* 2002). Die Permeabilität des ER gegenüber Ionen (v.a. Ca^{2+}) und Glukosederivaten (Le Gall *et al.* 2004) wurde bisher über direkte und indirekte Methoden einer Liste an Kandidaten zugeschrieben. Dazu zählen: Preseneline (Tu *et al.* 2006), Bcl2 (Chami *et al.* 2004), Pannexin (Vanden Abeele *et al.* 2006), TRPC1 (Berbey *et al.* 2009), CALHM1 (Gallego-Sandín *et al.* 2011), die trunkierte SERCA1 Isoform (Chami *et al.* 2001; 2008), $\text{A}\beta_{42}$ Peptide (Demuro *et al.* 2005), natürliche Gallensäuren (Combettes *et*

al. 1988; Zimniak *et al.* 1991) und auch der Sec61 Komplex (Van Coppenolle *et al.* 2004; Giunti *et al.* 2007; Ong *et al.* 2007; Amer *et al.* 2009).

Die Beteiligung des Sec61 Komplexes und die Relevanz weiterer Kandidaten als “leak” Kanäle zu fungieren wird ausführlich in der Diskussion behandelt (s. Kapitel V.1.7.1).

II.5.4 Aktive Kalziumpumpen (SERCA)

Das dritte und letzte erforderliche Element eines mobilen Speichers sind aktive Kalziumpumpen zum Auffüllen des Depots. Dazu dienen die polytopen ER Membranproteine der SERCA (SR/ER-Kalzium-ATPase) Familie. Insgesamt kodieren im Menschen drei Gene eine Vielzahl von SERCA Isoformen mit unterschiedlichen Expressionsmustern (Rizzuto & Pozzan 2006). Ubiquitär exprimiert wird die *SERCA2*, dessen Isoformen SERCA2a/b die höchste Kalziumaffinität aufweisen und etwa 30 Kalziumionen pro Sekunde transportieren unter Verbrauch von 15 ATP (Toyoshima *et al.* 2000; Berg *et al.* 2003; Vandecaetsbeek *et al.* 2009). Die SERCA Kristallstrukturen von Toyoshima *et al.* (2000) zeigen, dass diese P-Typ ATPase anstelle der P-Schleife eine Rossmann-Falte zur Nukleotidbindung besitzt. Der homozygote SERCA2 Knock-out ist für Mäuse auf Grund der gestörten Kalziumhomöostase letal (Periasamy & Kalyanasundaram 2007). Diese Kalziumhomöostase beinhaltet das Wechselspiel zwischen dem passiven Kalziumefflux durch die „leak“ Kanäle und dem permanenten aktiven Kalziumrücktransport durch die SERCA über die ER Membran. Diese Kalziumströme erzeugen zwischen Cytosol und ER Lumen ein dynamisches Gleichgewicht, welches die vorherrschenden Kalziumruhekonzentrationen aufrecht erhält und nach Stimulation wieder herstellt (s. Abb. II-05). Die Regulation der SERCA-Aktivität erfolgt u.a. durch die Kalziumpuffer Calreticulin und Calnexin, das kleine „tail-anchor“ Protein Phospholamban oder cADPR (Kutay *et al.* 1993; John *et al.* 1998; Toyoshima *et al.* 2000; Berridge 2002).

II.5.5 Weitere Einflussfaktoren der ER Kalziumhomöostase (MAM und SOCE)

Die Kalziumhomöostase des ER beschränkt sich nicht auf den Kalziumaustausch mit dem Cytosol, sondern ist über Protein- und/oder Lipidbrücken auch an Mitochondrien und das extrazelluläre Milieu geknüpft (Sammels *et al.* 2010). Während MAM den bezeichnenden Begriff für die Interaktion zwischen ER und Mitochondrien darstellt, beschreibt SOCE die Konnektivität zwischen ER und Plasmamembran und so zum extrazellulären Raum.

II.5.5.1 MAM: Mitochondrien-assoziierte ER Membran

Die Wichtigkeit der evolutiv konservierten MAM zeigt sich nicht nur daran, dass alle Mitochondrien in Kontakt zur ER Membran stehen, sondern auch bei genetischen Hefeanalysen mit einem synthetischen Hybridprotein zur Rettung MAM defizienter Zellen (Csordás *et al.* 2006; 2010; Kornmann *et al.* 2009). Zahlen zu Folge stehen 5 - 20 % der mitochondrialen Oberfläche in Kontakt mit der ER Membran, in einer idealen Distanz von 10 - 25 nm und erlauben die bidirektionale, non-vesikuläre Kommunikation in Form von Ionen, Lipiden und Proteinen (Hayashi *et al.* 2009; Rizzuto *et al.* 2009). Bekannte Markerproteine der MAM sind unter anderem BiP, der IP₃ und σ 1 Rezeptor, VDAC1 oder der ERMES Komplex (de Brito & Scorrano 2010; Abou-lovergne *et al.* 2011). Eine Änderung oder Manipulation der ER luminalen Kalziumkonzentration wirkt sich somit auch auf Mitochondrien aus und damit auf die metabolische sowie apoptotische Aktivität (Berridge 2002).

II.5.5.2 SOCE: „store-operated calcium entry“

Der SOCE auch kapazitiver Kalziumeinstrom (CCE) genannt, beschreibt den Influx von extrazellulärem Kalzium (Konzentration \approx 1 mM) ins Cytosol ausgehend von einer Reduktion der ER luminalen Kalziumkonzentration. Somit beschreibt der SOCE ein biphasisches Kalziumsignal, welches die Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration nach Depletion des ER luminalen Kalziums nochmals deutlich verstärkt (Targos *et al.* 2005). Diese bereits 1990 von Putney geformte SOCE Hypothese konnte mittlerweile auch auf molekularer Ebene durch vielfache Charakterisierung der STIM und Orai Proteine bestätigt werden (Luik *et al.* 2006; Vig *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006). STIM Proteine dienen dabei mit ihren beiden luminal liegenden EF-Händen (kalziumbindendes Sequenzmotiv aus doppelter Helix-Loop-Helix) als Sensoren der ER Kalziumdepletion und kolokalisieren nach ihrer Oligomerisation in sogenannten „punctae“ nahe der Plasmamembran mit Orai Proteinen. Orai Proteine sorgen dann als plasmamembranständige Kalziumkanäle für den massiven Kalziumeinstrom ins Cytosol (Hewavitharana *et al.* 2008; Deng *et al.* 2009). Der SOCE dient jedoch nicht nur der weiteren Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration nach Stimulation, sondern auch der Wiederauffüllung des intrazellulären Kalziumspeichers (Venkatachalam *et al.* 2002).

Während MAM (s. oben) also eher der Begrenzung und Lokalisation eines Kalziumsignals dient, scheint SOCE das Gegenteil, eine Globalisierung des Kalziumsignals, zu vermitteln.

II.5.5.3 Elimination toxischer Kalziumsignale

Um gleichzeitig zytotoxische Effekte zu vermeiden und die Effizienz der kalziumabhängigen Signalwege weiterhin zu gewährleisten, muss die erhöhte cytosolische Kalziumkonzentration kurz nach Stimulation wieder reduziert werden. Neben der SERCA des ER stehen der Zelle auch die mit höherer Kapazität agierenden Kalzium-ATPasen (PMCA) und -Austauscher (NCX, NCKX) der Plasmamembran zur Verfügung, um Kalziumsignale schnell und effizient zu eliminieren (Guerini *et al.* 2005). Um die Menge an freiem Kalzium ebenfalls gering zu halten, existieren auch im Cytosol effektive kalziumpuffernde Proteine wie Parvalbumin, Calbindin oder Calmodulin (Berridge *et al.* 2000), sodass Kalzium nach Möglichkeit nur lokal begrenzt operiert in sogenannten Kalziumnanodomänen. Im Cytosol fällt die Konzentration an freiem Kalzium von 10 μM an der Öffnung eines aktiven Kalziumkanals im Radius von wenigen 100 \AA zurück auf 50 - 100 nM, ein Volumen das ungefähr zehn Calmodulinmoleküle beherbergt (Niggli 1999; Berridge *et al.* 2003; Clapham 2007).

Abbildung II-05 zeigt eine Übersicht der Komponenten der zellulären Kalziumhomöostase.

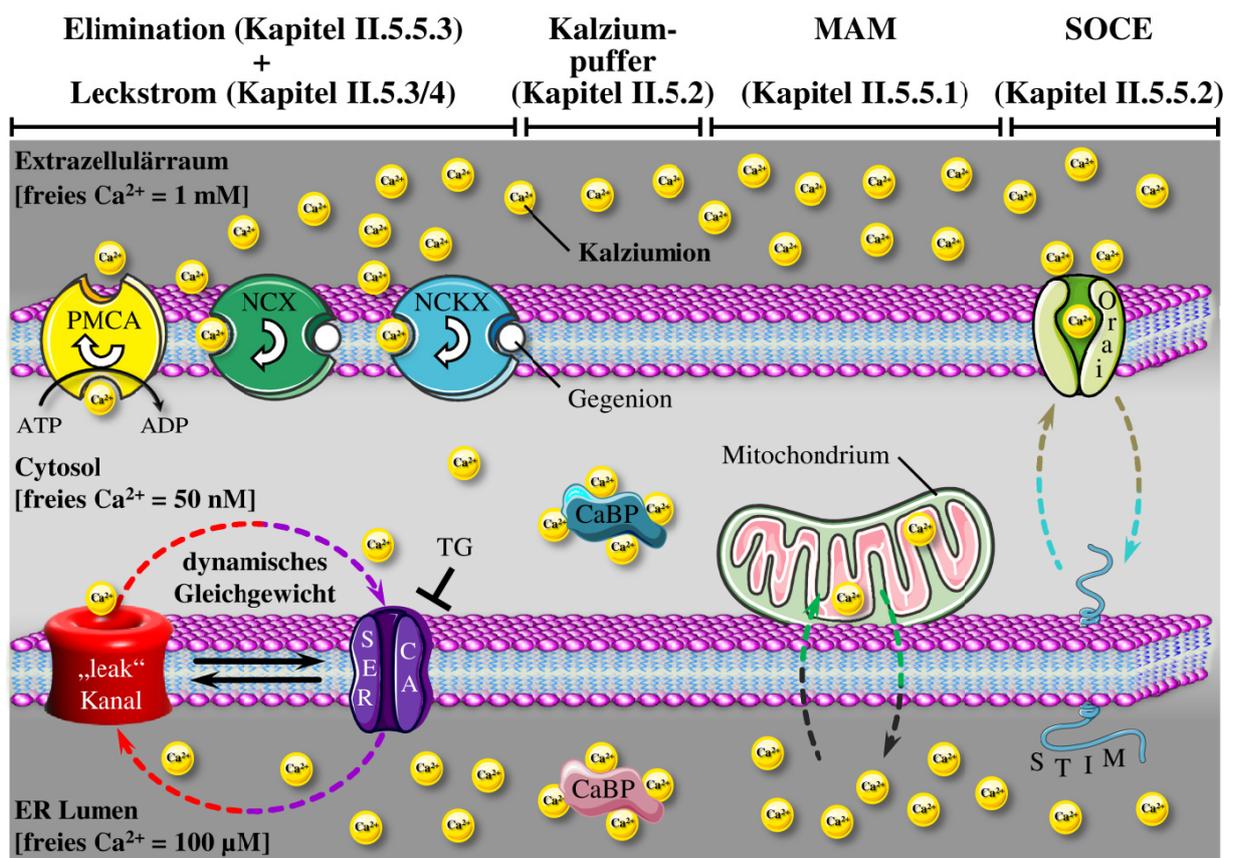


Abb. II-05: Komponenten und Mechanismen der zellulären Kalziumhomöostase

Gezeigt sind essentielle Komponenten der Kalziumhomöostase und die zelluläre Kalziumverteilung im ER Lumen, Cytosol und Extrazellulärraum (links). Nähere Informationen sind den angegebenen Kapiteln zu entnehmen. Gestrichelte Pfeile zeigen Kalziumströme an. CaBP = kalziumbindendes Protein; TG = Thapsigargin (irreversibler SERCA-Inhibitor)

II.6 Zielsetzung der Arbeit

Wie zu Beginn der Einleitung erwähnt, steht das ER des Säugers durch den permanenten Proteintransport und Kalziumefflux in ständigem Informationsaustausch mit dem Cytosol und anderen Organellen. Die explizite Frage war nun, ob beide Prozesse, sowohl Proteintransport als auch Kalziumefflux, sich an der ER Membran auf Ebene des Sec61 Komplexes festlegen und zusammenführen lassen (s. Abb. II-06).

Zur Beantwortung dieser biologischen Fragestellung diente ein zellbiologischer Assay basierend auf dem siRNA vermittelten Gen „silencing“ des humanen *SEC61A1*. Die an der Kernkomponente der Translokase depletierten humanen Zellen wurden hinsichtlich ihres Proteintranslokationsvermögens verschiedener Transportsubstrate getestet. Hierzu wurde eine Kombination aus semi-intakten Zellen und der *in vitro* Synthese im programmierten Retikulozytenlysat etabliert. Ferner wurden die Sec61 α depletierten Zellen auch zur Analyse intrazellulärer Kalziumströme verwendet. Hierzu mussten intakte Zellen mit einem Kalziumindikator beladen werden, der Rückschlüsse auf Änderungen der Kalziumkonzentrationen erlaubt. Von vorrangigem Interesse war dabei die Analyse der Beteiligung des Sec61 Komplexes am passiven Kalziumefflux aus dem ER. Zur Validierung beider Resultate dienten entsprechende Rettungs- und Komplementationsexperimente sowohl mit wildtypischem Sec61 α als auch der Diabetes mellitus assoziierten Variante, Sec61 α -Y344H.

Desweiteren wurde auch eine mögliche Regulation und Beeinflussung des Sec61 Komplexes durch weitere Faktoren in Betracht gezogen. Neben dessen Regulation durch cytosolische, membranständige oder luminaire akzessorische Proteine der ER Translokase (ERj1, Sec62 und BiP) wurde auch eine Beeinflussung des Sec61 Komplexes auf pharmakologischer Basis (Puromycin, Dithiothreitol, Tunicamycin) analysiert und etabliert (s. Abb. II-06).

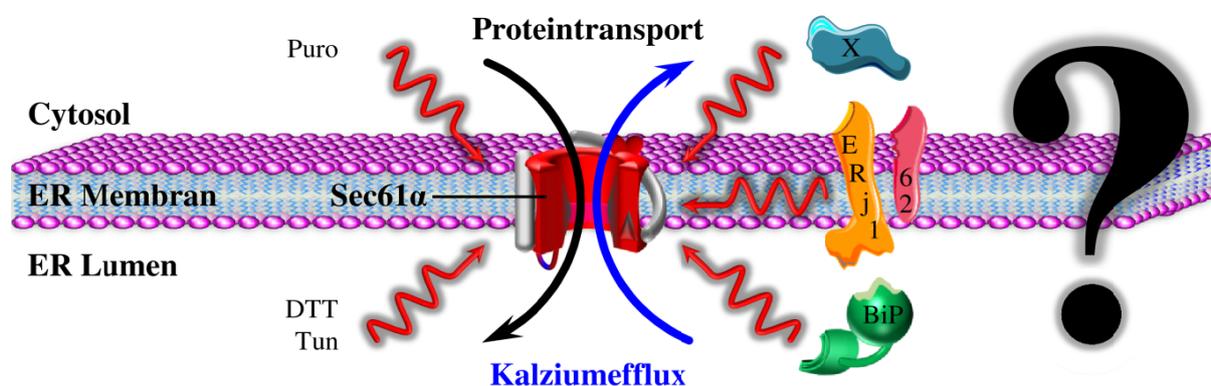


Abb. II-06: Zielsetzung der Arbeit

Lassen sich Proteintransport (schwarzer Pfeil) und der passive Kalziumefflux des ER (blauer Pfeil) auf einen gemeinsamen Nenner bringen, den Sec61 Komplex? Wie wird Sec61 α durch Pharmaka (links) und Proteine (rechts) beeinflusst (rote Pfeile)? 62 = Sec62; DTT = Dithiothreitol; Puro = Puromycin; Tun = Tunicamycin; X = cytosolisches Protein

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 Materialien

III.1.1 Geräte, zugehörige Software und Verbrauchsmaterialien

Vertrieb:	Artikel:
Abimed, Langenfeld:	Gilson-Pipetten
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:	Image Eraser SF mit Exponierplatten
Applied Biosystems, Carlsbad, USA:	HT7900 System qRT-PCR Cycler
Beckman, München:	GS-6KR Zentrifuge (Bactifuge),
Eppendorf, Hamburg:	Kühlzentrifuge 5402, Reaktionsgefäße (1,5 ml), Thermostat 5320, Tischzentrifuge 5415R,
Fröbel Labortechnik, Wasserburg:	Geltrockner, Wipptische
GE Healthcare, Uppsala, Schweden:	ImageQuant Software TL 1D Version 7.0, Image Scanner III, Storage Phosphor Screen Exponier- platten, Typhoon Trio TM , Electrophoresis Power Supply EPS 601
Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim:	Sterilbank
Greiner Bio-One, Frickenhausen:	Gewebekulturflaschen 250 ml (75 cm ²), Zellkultur-Multiwell-Platten mit 6 / 12 / 24 well, Zellkultur-Schalen Ø 3,5 cm und 6 cm
Greiner Labortechnik, Frickenhausen:	Rotationsschüttler
Heraeus, Hanau:	Brutschränke, Trockenschrank
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt:	Pipetus [®] -akku Pipettierhilfe
Isotherm KGW:	Behälter für Flüssigstickstoff
Invitrogen, Darmstadt:	„Countess [®] Automated Cell Counter“
Julabo, Seelbach:	Wasserbad
Marienfeld, Lauda-Königshofen:	Objektträger; Neubauer Improved Zählkammer
Millipore Co., Bedford, USA:	Immobilon-P Transfermembran (0,45 µm Poren- größe), Milliporewasseranlage Milli-Q
Neolab, Heidelberg:	Deckglas (Ø 25 mm, 10 mm)
New Brunswick, Edison, USA:	Galaxy 14 S CO ₂ Inkubator
Nikon Instruments, Düsseldorf:	Filterset (DAPI, FITC, TRITC, TexR; s. III.6.9), Nikon Eclipse TE 2000-S, Nikon Plan Fluor 10x/0,3 Objektiv, Nikon Plan Fluor ELWD

	20x/0,45 Objektiv, NIS Elements AR 3.0 Software
Panasonic, Hamburg:	Mikrowellenherd
Peqlab, Erlangen	NanoDrop [®] ND-1000 UV/Vis Spektralphotometer
Roche, Mannheim:	FuGENE HD, Lumi Imager F1, xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) SP und 96 well E-Plate, RTCA Software 1.1
Sarstedt, Nümbrecht:	Pipettenspitzen, 15 ml / 50 ml Röhre
Sartorius, Göttingen:	Feinwagen BP61, BP4100, LA420
Schleicher & Schuell, Dassel:	Filterpapiere
Schütt, Göttingen:	Autoklav
Scientific Industries, Bohemia , USA:	Vortex-Mixer (Genie 2 TM)
Sigma, Steinheim:	Glasbeads
Systec GmbH, Wetzlar:	Autoklav DX-65
Thermo Fisher Scientific, Dreieich:	CO ₂ -Inkubator Heracell [®] 150, Nalgene [®] Bottle-Top Filtereinheit (500 ml)
TILL photonics, Gräfeling:	iMIC Mikroskop, Polychromator V, TILLvisION Software
Whatman GmbH, Dassel:	Whatman FP30/0,2 CA-S rotrand (0,2 µm)
WTW, Weilheim:	pH-Meter pH 537
Werkstatt Biochemie 1, Göttingen:	Elektrophoresekammern (Eigenbau)
Zeiss, Jena:	Binokulares Mikroskop Axiolab für Hellfeld Fluar 20x/0,75 M27 Objektiv (iMIC)
Ziegra, Isernhagen:	Eismaschine

III.1.2 Chemikalien und gekaufte sekundäre Antikörper

Vertrieb:	Artikel:
Applied Biosystems, Carlsbad, USA:	TaqMan [®] Gene Expression Assays
Biochrom AG, Berlin:	Fetal Bovine Serum (FCS)
Calbiochem [®] (Merck, Darmstadt):	Tunicamycin, Digitonin
Carl Roth, Karlsruhe:	LB-Agar (Lennox), LB-Medium, Mowiol 4-88, TB-Medium
Difco Laboratories, Detroit, USA:	Bacto Agar

Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz:	“Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability reagent”
GE Healthcare Uppsala, Schweden:	ECL-Plex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5, ECL-Western Blot Detektionssystem
Genomed, Löhne:	Midi-Präparation Jetstar
Invitrogen, Karlsruhe:	Alexa Fluor® 594 Ziege-anti-Kaninchen IgG, BenchMark™ Protein Ladder, FITC-Phalloidin, Fura-2 AM, Gibco® DMEM + GlutaMAX™-I, Ionomycin, MEM NEAA (non-essential amino acid mix) 100x, OptiMEM, 1xPBS, Thapsigargin
Macherey-Nagel, Düren:	Nucleospin RNA II-Kit
Merck, Darmstadt:	DMSO, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, Essigsäure, Glycerin, Ethanol, Glycin, Kaliumchlorid, Magnesiumacetat, Methanol, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Millipore Co., Bedford, USA:	Nonidet P40
Molecular Probes, Leiden, Niederlande:	Fura-2 Calcium „imaging” Calibration Kit (F-6774)
MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich:	Trypsininhibitor (Soybean)
PAA, Pasching, Österreich:	Penicillin/Streptomycin 100x, Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) in PBS (1x)
Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim:	[³⁵ S]-Cystein/Methionin (1000 Ci/mmol) [³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol)
Polysciences Europe GmbH, Eppelheim:	Paraformaldehyd (16 %)
Promega Biotec, Madison, USA:	Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated L4960, RNasin®-Ribonukleaseinhibitor, TnT® T7 coupled Rabbit Reticulocyte Lysate L4600
Qiagen, Hilden:	HiPerFect, AllStars negative control siRNA, diverse siRNAs (Zielgene: <i>SEC61A1</i> , <i>BIP</i> , <i>ERJ1</i> , <i>SEC62</i> ; s. auch III.1.5)
Riedel de Haën, Hannover:	Aceton, Essigsäure, Kaliumacetat
Roche, Mannheim:	1,4-Dithiothreitol

Serva, Heidelberg:	Acrylamid, Ammoniumpersulfat, Bisacrylamid, Bromphenolblau, SERVA Blue R, Ethanol, HEPES, Saccharose, SDS, TEMED, Triton X-100
Sigma-Aldrich, Steinheim:	Ampicillin, Antipain, β -Mercaptoethanol, BSA, Chymostatin, 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), DMEM ohne Cystein und Methionin, Leupeptin, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG, PepstatinA, Phenylmethansulfonylfluorid, Poly-L-Lysin, Propylgallat, Puromycin-Dihydrochlorid, Saponin
Thermo Fisher Scientific, Dreieich:	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
TSI GmbH, Zeven:	Sucofin Magermilchpulver

III.1.3 Enzyme

Vertrieb:	Artikel:
Invitrogen, Karlsruhe:	Superscript® II Reverse Transkriptase
Prof. James Paton, Adelaide, Australien:	Subtilase AB ₅ , Subtilase A _{S272} B ₅
Promega Biotec, Madison, USA:	SP6 RNA-Polymerase, T7 RNA-Polymerase
Roche, Mannheim:	Nuklease S7, Proteinase K, Trypsin

III.1.4 (Primäre) Antikörper

Der Großteil der in der Arbeit verwendeten primären Antikörper wurde aus dem Blut immunisierter Kaninchen gewonnen. Alle dafür notwendigen Arbeitsschritte, beginnend bei der Peptidsynthese bzw. Polypeptidaufreinigung, die Immunisierung, die Blutentnahme sowie die letzte Gewinnung der Seren wurden durchgeführt von Dr. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes).

Tab. III-01: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten Primärantikörper

ER = Endoplasmatisches Retikulum; IF = Immunfluoreszenz;
 OST = Oligosaccharyltransferase; UCLA = University of California, Los Angeles;
 UdS = Universität des Saarlandes
 (alphabetische Auflistung; * = gekaufter primärer Antikörper)

Antikörper	interne Kennung	Charakteristik	Ursprung / Herkunft	Verdünnung
------------	-----------------	----------------	---------------------	------------

*α-β-Aktin	β -Aktin	monoklonal, gegen β -Untereinheit des Aktin („Haushalts“-Strukturprotein)	Maus, Sigma	1:5000
α-BiP	950	polyklonaler Peptidantikörper gegen luminales ER Protein BiP	Kaninchen, UdS	1:250
*α-BiP	BiPmc	monoklonal, gegen luminales ER Protein BiP	Maus, BD Bioscience	1:2000
*α-BiP	SPA-827	monoklonal, gegen KDEL-Motiv (BiP, Grp94)	Maus, Stressgen	1:1000
α-ERj1	Johanna II	polyklonaler Proteinantikörper gegen integrales ER Membranprotein ERj1	Kaninchen, UdS	1:250
*α-GAPDH	GAPDH	polyklonal, gegen cytosolisches Enzym GAPDH („Haushalts“-Enzym)	Kaninchen, Santa Cruz	1:500
α-Grp170	ABP150	polyklonaler Proteinantikörper gegen luminales ER Protein Grp170	Kaninchen, UdS	1:1000
α-Grp94	Grp94	polyklonaler Proteinantikörper gegen luminales ER Protein Grp94	Kaninchen, UdS	1:500
*α-Integrinβ1	Int. β 1	polyklonal, gegen Plasmamembranrezeptor Integrin β 1	Kaninchen, Cell signaling	1:1000
*α-Psn1	Psn1	monoklonal, gegen Presenelin1-Untereinheit des γ -Sekretase Komplexes	Maus, Millipore	1:500
α-RibophorinI	18A4	monoklonal, gegen RibophorinI-Untereinheit des OST Komplexes	Maus, David Meyer (UCLA)	1:1000
α-Rpl23a	1087/1088	polyklonaler Peptidantikörper gegen ribosomales Protein L23a der großen ribosomalen Untereinheit	Kaninchen, UdS	1:500
α-Rps3	680	polyklonaler Peptidantikörper gegen ribosomales Protein S3 der kleinen ribosomalen Untereinheit	Kaninchen, UdS	1:500
α-Sec61α	Sec61 α	polyklonaler Peptidantikörper gegen α -Untereinheit des Sec61 Komplexes	Kaninchen, Universität Göttingen	1:200
α-Sec61β	179b	polyklonaler Peptidantikörper gegen β -Untereinheit des Sec61 Komplexes	Kaninchen, UdS	1:500
α-Sec61γ	Sec61 γ	polyklonal, gegen γ -Untereinheit des Sec61 Komplexes	Kaninchen, Katja Kapp (MPI Dresden)	1:200
α-Sec62	262b	polyklonaler Peptidantikörper gegen integrales ER Membranprotein Sec62	Kaninchen, UdS	1:500; bzw. 1:100 (bei IF)
α-Sec63	Δ N380	polyklonaler Proteinantikörper gegen integrales ER Membranprotein Sec63	Kaninchen, UdS	1:500
*α-SERCA2	SERCA2	monoklonal, gegen integrales ER Membranprotein SERCA2a/b	Maus, Sigma	1:1000
α-SRα	178	polyklonaler Peptidantikörper gegen ER membranassoziertes Protein SR α	Kaninchen, UdS	1:500
α-SRβ	510	polyklonaler Peptidantikörper gegen integrales ER Membranprotein SR β	Kaninchen, UdS	1:1000

Zur immunologischen Detektion dienen als passende sekundäre Antikörper entweder ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung 1:1000) oder die Cy-Fluorophor-markierten Antikörper „ECL Plex“ Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy5 (Verdünnung 1:1000). Im Zuge der Immunfluoreszenz diente das Alexa Fluor[®] 594 Ziege-anti-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:1000) als sekundärer Antikörper.

III.1.5 Oligonukleotide

III.1.5.1 Verwendete DNA-Oligonukleotide (Primer)

Die folgende Liste zeigt eine tabellarische Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide.

Tab. III-02: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
RZ 268	GGT GGG AGG TCT ATA TAA GC	Amplifikation des PCR-Produktes von Synaptobrevin2
RZ 269	TCA CAC GCC CGT CTT GTT GGA	Amplifikation des PCR-Produktes von Synaptobrevin2

III.1.5.2 Verwendete RNA-Oligonukleotide (siRNA)

Die folgende Liste zeigt eine tabellarische Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide.

Tab. III-03: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide

UTR = untranslatierte Region; (alphabetische Auflistung; * = bei der *ERJI* siRNA handelt es sich ebenfalls um eine siRNA der 3'-untranslatierten Region)

Name	Zielgen (Organismus)	Sequenz (sense Strang)	verwendete Konzentration
<i>BIP</i> siRNA	<i>BIP</i> (Homo sapiens)	CCUUCGAUGUGUCUCUUCUtt	35 nM
<i>BIP</i> -UTR siRNA	<i>BIP</i> (Homo sapiens)	GCGGCUGUUUACUGCUUUUtt	35 nM
* <i>ERJI</i> siRNA	<i>ERJI</i> (Homo sapiens)	CCUCAUAUUUCUACGUCAtt	25 nM
Kontroll- siRNA	- (Homo sapiens)	Sequenz unbekannt (Qiagen AllStars negative control siRNA)	10 - 35 nM
<i>SEC61</i> siRNA	<i>SEC61A1</i> (Homo sapiens)	GGAAUUUGCCUGCUAAUCAtt	20 nM
<i>SEC61</i> -UTR siRNA	<i>SEC61A1</i> (Homo sapiens)	CACUGAAAUGUCUACGUUUtt	20 nM

SEC62 siRNA	SEC62 (Homo sapiens)	GGCUGUGGCCAAGUAUCUUt	10 nM
SEC62-UTR siRNA	SEC62 (Homo sapiens)	CGUAAAGUGUAUUCUGUACtt	10 nM

III.1.6 Plasmide

III.1.6.1 Plasmide zur Transfektion von Zelllinien

Tabelle III-04 zeigt eine Zusammenstellung der zur Transfektion von Kulturzellen verwendeten Vektoren. Die in der Zellkultur genutzten Plasmide wurden stets aus dem *E. coli* Stamm DH5 α gereinigt (s. Kapitel III.1.8).

Tab. III-04: Übersicht der verwendeten Plasmide zur Transfektion von Kulturzellen

Amp = Ampicillin; CMV = Zytomegalie-Virus; GFP = grünfluoreszierendes Protein; IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle; Neo = Neomycin; UdS = Universität des Saarlandes (alphabetische Auflistung)

Plasmidname	Charakteristik	Resistenzgen	Promotor	Herkunft
pcDNA3-Neo-IRES-GFP	Insertion einer IRES-GFP Sequenz in den pcDNA3-Neo-Basisvektor	Amp	CMV	U. Wissenbach, UdS
pcDNA3-Sec61α-Neo-IRES-GFP	Insertion des wildtypischen humanen <i>SEC61A1</i> Gen	Amp	CMV	J. Benedix, Uds
pcDNA3-Sec61α-Y344H-Neo-IRES-GFP	Insertion des mutierten <i>SEC61A1</i> -Y344H Allel	Amp	CMV	J. Dudek & M. Lerner, Uds

III.1.6.2 Plasmide und PCR-Produkte zur *in vitro* Synthese von Transportsubstraten

Die folgende Tabelle III-05 beinhaltet die Auflistung der zur *in vitro* Synthese von Transportsubstraten verwendeten Plasmide bzw. PCR-Amplifikate.

Tab. III-05: Übersicht der verwendeten Plasmide und PCR-Produkte zur Transfektion von Kulturzellen
AS = Aminosäuren; Amp = Ampicillin; CNR = Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italien; LMU = Ludwig-Maximilians-Universität München; OHSU = Oregon Health Sciences University; Kan = Kanamycin; UCSF = University of California, San Francisco; UPMC = University of Pittsburgh Medical Center; UdS = Universität des Saarlandes († = PCR-Produkt)

Plasmidname	Charakteristik	Resistenzgen	Promotor	Herkunft
pB4	Präprolaktin (Sequenz <i>Bos taurus</i>)	Amp	SP6	Peter Walter, UCSF
pB4-PvuII	trunkiertes Präprolaktin (86 AS) (Sequenz <i>Bos taurus</i>)	Amp	SP6	-

pCA1-mut	Mutante von PräprocecropinA (Ile ₄₄ - Ile ₄₅ → Met ₄₄ - Met ₄₅) (Sequenz <i>Hyalophora cecropia</i>)	Amp	T7	Gabriel Schlenstedt, Sven Lang, UdS
pcDNA3-ERj3	ERj3 (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Amp	T7	Johanna Dudek, UdS
ppαF	Präpro-α-Faktor (Sequenz <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Amp	SP6	Toshi Endo, Nagoya
Insulin	Präproinsulin (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Kan	T7	Origene
AQP2	Aquaporin2 (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Amp	SP6	William Skach, OHSU
pGEM4B5-op3	modifiziertes ER-ständiges Cytochrom b5 (C-terminaler Opsin-Anhang inkl. Glykosylierungsstelle)	Amp	SP6	Nica Borgese, CNR
pSputK-inv-c	invariante Kette (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Amp	SP6	Stephen High, University of Manchester
pcDNA3-sec61β- op3	Sec61β (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Amp	T7	Stephen High, University of Manchester
Syb2-OPG¹	Synaptobrevin2 (= VAMP2) (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	-	T7	Stephen High, University of Manchester
pCMV6-XL5- α₁-ACT	α ₁ -Antichymotrypsin (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Kan	SP6	Origene
Z*	α ₁ -Antitrypsin (Z-Variante) (Sequenz <i>Homo sapiens</i>)	Amp	SP6	David Perlmutter, UPMC
PrPΔHD	Prionproteinderivat (Sequenz <i>Mus musculus</i>)	Amp	T7	Jörg Tatzelt, LMU
PrPΔGPI	Prionproteinderivat (Sequenz <i>Mus musculus</i>)	Amp	T7	Jörg Tatzelt, LMU

III.1.7 Raue Mikrosomen

Bei rauen Mikrosomen (RM) handelt es sich um vesikuläre Partikel des endoplasmatischen Retikulums (ER), welche diesem Organell in seiner biologischen Zusammensetzung (Proteine, Lipide, Nukleinsäure und ihre Derivate) nahezu identisch sein sollten. Diese Ähnlichkeit erlaubt dem Experimentator

- (i) die Verwendung der RM als Positivkontrolle bei der immunologischen Detektion von Proteinen des ER in Kulturzellen mittels Western Blot (s. Kapitel III.2.5) sowie
- (ii) die Nutzung der RM als Kontroll-ER-Fraktion beim Transport von Modellsubstraten (s. Tab. III-05) in das ER semi-permeabilisierter Kulturzellen (s. Kapitel III.4.).

Als Quelle dienten diverse Chargen RM präpariert nach einer etablierten Methode aus Hundepankreas (Walter & Blobel 1983; Watts *et al.* 1983).

III.1.8 Bakterienstämme

Zur Amplifikation der notwendigen Plasmide (s. Tab. III-04 und III-05) wurden zwei verschiedene *Escherichia coli* Stämme mit folgenden Genotypen verwendet:

- ☛ ***E. coli* DH5α** (für Plasmide zur Transfektion von Zelllinien; s. III.1.6.1):
F⁻, φ80*dlacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺),
phoA, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*
- ☛ ***E. coli* JM101** (für Plasmide zur *in vitro* Synthese von Transportsubstraten; s. III.1.6.2):
supE thi-1 Δ(*lac-proAB*) [F' *traD36 proAB lacIqZ*ΔM15]

III.1.9 Zelllinien

Alle *in vivo* Datensätze und Experimente basieren auf der etablierten humanen Zelllinie HeLa (ATCC, Nr. CCL-2TM). Diese epitheliale und daher adhärente Zelllinie entstammt ursprünglich aus dem Gebärmutterhals (*Cervix uteri*) einer 31-jährigen Afroamerikanerin mit Adenokarzinom (bösartiger Tumor eines Drüsengewebes). HeLa-Zellen enthalten darüber hinaus Fragmente/Sequenzen des Humanen Papilloma Virus 18 (HPV-18) Genoms.

Das zur Kultivierung notwendige Medium Gibco[®] DMEM+GlutaMAXTM-I wurde zusätzlich mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt.

Desweiteren wurden für eine Zytotoxizitätsbestimmung mittels des xCELLigence RTCA (s. Kapitel III.6.7) auch noch die beiden humanen, epithelialen Zelllinien HEK-293 und PC3 verwendet.

HEK-293 Zellen (erhalten von AG Flockerzi) repräsentieren das künstlich generierte Transformationsprodukt einer humanen (weiblichen), embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5. Das zu verwendende Kulturmedium war identisch mit dem für HeLa-Zellen.

PC3 Zellen (DSMZ, Nr. ACC 465) entstammen der Knochenmarksmetastase eines 62 jährigen Kaukasiers mit Stadium IV Adenokarzinom der Prostata. Für diesen Zelltyp musste das HeLa-Kulturmedium zusätzlich mit 1 % (v/v) MEM NEAA (100x) ergänzt werden.

III.2 Analysemethoden/-grundlagen der Proteinbiochemie

III.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lämmli-Probenpuffer (1x):

60 mM Tris/HCl; pH 6,8

10 % (v/v) Glycerin

2 % (w/v) SDS

5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer:

384 mM Glycin

50 mM Tris/HCl

0,1 % (w/v) SDS

Zur analytischen Auftrennung der Polypeptide komplexer Proteingemische wurde eine modifizierte Methode nach Lämmli (Laemmli 1970) verwendet, bei der die Proteine im elektrischen Gleichspannungsfeld in einem diskontinuierlichen Gel lediglich nach dem Parameter ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Ermöglicht wird dies durch die Wechselwirkung zwischen der hydrophoben Alkylkette des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und den hydrophoben Aminosäureresten der Polypeptide. Durchschnittlich assoziiert etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein; beziehungsweise ungefähr ein Molekül SDS alle 2 AS. Durch die negative Ladung des Sulfatrestes der SDS-Moleküle wird die Eigenladung der Polypeptide maskiert. Als Resultat ergibt sich eine gleichmäßig negative Nettoladung der Polypeptidstränge in Abhängigkeit ihres Molekulargewicht (Weber & Osborn 1969), wodurch die gebildeten SDS-Polypeptid-Komplexe ein vergleichbares Ladung-zu-Masse-Verhältnis aufweisen. Zusätzlich bewirken Detergenz und die stark reduzierenden Bedingungen (β -Mercaptoethanol) des Lämmli-Probenpuffers in Kombination mit der hohen Temperatur beim Kochen der Lämmli-Proben eine Denaturierung der Proteine/Polypeptide. Somit werden die Polypeptide nun unabhängig von Eigenladung und Tertiär- oder Quartärstruktur nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Wanderungstrecke, welche ein Partikel dabei im Gel zurücklegt, gibt Aufschluss über seine molekulare Masse. Für einen Großteil aller Polypeptide gilt der empirisch ermittelte, lineare Zusammenhang, dass die Migrationsstrecke im Gel proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts ist. Je weiter ein Protein in einem bestimmten Zeitintervall im Gel wandert, desto kleiner sein Molekulargewicht (Andrews 1986; Dwyer 1993).

Die zur Analyse verwendeten SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus einem langen Trenngel überschichtet von einem kurzem Sammelgel. Das an Acrylamid niederprozentigere Sammelgel dient zur Fokussierung der Polypeptidketten. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung nach dem Molekulargewicht der Proteine.

Die Gele wurden nach dem folgenden Pipettierschema gegossen.

Tab. III-06: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen:
(AA = Acrylamid)

Lösungen \ AA-Konzentration		Trenngel			Sammelgel
		10 %	12,5 %	17,5 %	5 %
40 % (w/v) Acrylamid	(ml)	3,75	4,69	6,56	0,6
2 % (w/v) Bisacrylamid	(ml)	1,0	1,25	1,76	0,15
H ₂ O bidest.	(ml)	4,05	2,86	1,39	3,35
1 M Tris/HCl; pH 6,8	(ml)	-	-	-	0,6
1,875 M Tris/HCl; pH 8,8	(ml)	6			-
10 % (w/v) SDS	(µl)	150			48
TEMED	(µl)	5			7
20 % (w/v) AMPS	(µl)	45			45
Gesamtvolumen	(ml)	15			4,8

Zur Abdichtung der Polyacrylamidgele wurde ein Bodengel aus 2 % (w/v) Agarose gegossen. Die Proteinproben wurden vor ihrem Auftrag auf das Gel mit Lämmli-Probenpuffer versetzt, so dass ein Endvolumen von 20 - 30 µl erreicht wurde. Nach Erhitzen für 10 min bei 56 °C wurden die Proben für 15 s bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert und auf 14 cm x 11 cm x 0,1 cm Vertikalgele (s. Tab. III-06) aufgetragen. Die Proben wurden in die ausgesparten Taschen des Gels pipettiert, welches kurz zuvor in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet wurde. Die Auftrennung erfolgte für 2 h 30 min bei 45 mA oder über Nacht bei 6 mA.

III.2.2 Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lämmli-Probenpuffer (1x):

siehe III.2.1.

Elektrophoresepuffer-Urea:

192 mM Glycin

50 mM Tris/HCl

0,1 % (w/v) SDS

Zur Auftrennung von Polypeptiden mit einem geringen Molekulargewicht von weniger als 15 kDa (z.B. PräprocecropinA) wurden SDS-Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 19,4 % verwendet. Zur Verbesserung der Gelstabilität bei hoher Acrylamidkonzentration wurde Harnstoff (Endkonzentration 6 M) zugesetzt, der bedingt durch seine hohe Hygroskopizität die Beständigkeit des Gels verbessert (Ito *et al.* 1980; Ito *et al.* 1983). Die Gele wurden nach untenstehendem Schema als Vertikalgele (14 cm x 11 cm x 0,1 cm) gegossen.

Tab. III-07: Pipettierschema zur Herstellung von Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelen
(AA = Acrylamid, BAA = Bisacrylamid)

Lösungen \ AA-Konzentration		Trenngel	Sammelgel
		19,4 %	5 %
Harnstoff	(g)	5,88	1,80
60 % (w/v) AA, 0,8 % (w/v) BAA	(ml)	5,25	0,42
1,875 M Tris/HCl; pH 8,8	(ml)	6,50	-
1 M Tris/HCl; pH 6,8	(ml)	-	0,63
H ₂ O bidest.	(ml)	-	2,60
10 % (w/v) SDS	(μ l)	160	50
TEMED	(μ l)	6	5
10 % (w/v) AMPS	(μ l)	55	25
Gesamtvolumen	(ml)	11,97	3,73

Zur Abdichtung der Polyacrylamidgele wurde ein Bodengel aus 2 % (w/v) Agarose gegossen. Die Probenvorbereitung wurde analog wie in Kapitel III.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Harnstoff-Gele wurden mit Elektrophoresepuffer-Urea überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA für 6 - 8 h oder über Nacht bei 6 mA.

III.2.3 Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue

Färbelösung:

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

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

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Eisessig

Entfärber 1:

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Eisessig

Entfärber 2:

10 % (v/v) Methanol

5 % (v/v) Eisessig

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Polypeptide können mit Hilfe der Coomassie-Brillant-Blue-Färbung visualisiert werden. Möglich ist dies durch die unspezifische Anlagerung des Coomassie-Farbstoffes an basische Aminosäurereste (Lysin, Arginin) der Polypeptide.

Das Gel wurde zunächst für min. 20 - 30 Minuten in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Zum Entfärben wurde das Gel nacheinander für eine Stunde in Entfärber 1 und 18 Stunden in Entfärber 2 geschwenkt. Nach einer Inkubation für 30 min in einer 5 % Glycerinlösung konnte das Gel zwischen Zellophan-Papier getrocknet werden.

III.2.4 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membranen (Western Blot)Transferpuffer:

96,0 mM Glycin

12,4 mM Tris/HCl

Für eine immunologische Detektion wurden Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. Kapitel III.2.1.) und im Anschluss auf eine Trägermembranen aus Polyvinylidendifluorid (PVDF; Porengröße: 0,45 µm) transferiert. Orthogonal zum Polyacrylamidgel wird ein elektrisches Feld angelegt, wodurch sich die im Gel befindlichen Polypeptide durch die Gelmatrix zur Trägermembran hin bewegen und dort über hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben.

Die hydrophobe PVDF-Membran wurde durch Schwenken in 100 % Methanol für das wässrige Milieu zugänglich gemacht und zweimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach äquilibrierte die Membran gemeinsam mit zwei passend zurechtgeschnittenen Whatman-Papieren und zwei Schwämmen bis zur Verwendung im Transferpuffer.

Zum Elektrotransfer wurde das Nassblot-Verfahren angewendet, bei dem die Elektrophorese in einem Tank („Trans-Blot™ Cell“-Apparatur, Bio-Rad) komplett in wässriger Umgebung durchgeführt wurde. Die einzelnen Bausteine wurden in nachfolgender Anordnung von schwarz nach weiß, auf der dafür vorgesehenen Plastikhalterung, luftblasenfrei übereinander gestapelt:

- schwarze Seite: ➤ ein Schwamm
- (-) ➤ ein Whatman-Papier
- das SDS-Gel
- die PVDF-Membran
- (+) ➤ ein Whatman-Papier
- weiße Seite: ➤ ein Schwamm

Anschließend wurde die Plastikhalterung geschlossen und in die bereits mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer eingesetzt, so dass die schwarze Seite der Plastikhalterung mit dem Gel zur Kathode (- Pol) und die PVDF-Membrane zur Anode (+ Pol) zeigte. Der Transfer der durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 15 °C für 3 h oder über Nacht mit einer Spannung von 400 mA.

III.2.5 Immunologische Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

TBS-Puffer:

150 mM NaCl

10 mM Tris/HCl; pH 7,4

TBST Puffer:

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

Blockierlösung:

3 % (w/v) Magermilchpulver

in TBS-Puffer

Antikörperlösung:

Blockierlösung mit Antiserum

(Verdünnung vgl. Tab. III-01)

Das grundlegende Prinzip der immunologischen Detektion beruht auf der intrinsischen Eigenschaft von Antikörpern mit Hilfe ihres Paratops (Antigenbindungsstelle) exponierte, komplementäre Sequenzmotive (Epitope) spezifisch und hochaffin zu binden. Die Kombination aus primärem Antikörper, welcher als Epitop ein immobilisiertes Polypeptid auf der PVDF erkennt, und sekundärem Antikörper, dessen Paratop den F_C-Teil des primären Antikörpers als antigene Determinante bindet, erlaubt eine präzise und individuelle Bestimmung einzelner Polypeptide aus komplexen Proteingemischen. Zur anschließenden Visualisierung ist der sekundäre Antikörper kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Alternativ fanden Meerrettichperoxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper Verwendung, so dass die katalysierte Chemilumineszenzreaktion eine Detektion ermöglicht.

Zunächst musste die Membran nach dem Elektrotransfer für 30 min bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert werden. Dies führte zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen der Membran und hemmte die unkoordinierte Anlagerung von Antikörpermolekülen an die hydrophobe Membranoberfläche. Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte anschließend für 75 - 90 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht auf einem Rollinkubator. Vor und nach der bei Raumtemperatur durchgeführten 75 - 90 minütigen Behandlung mit gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Membran nach folgendem Schema gewaschen: 1 min in TBS; 2 x 5 min in TBST; 5 min in TBS

Bei Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper wurde die Membran nach dem Waschen mit einem 1:1 Gemisch aus zwei Lösungen des ECL („enhanced chemiluminescence“)-Detektionssystems inkubiert. Die durch die Peroxidase katalysierte Lichtemission wurde mittels Lumi Imager F1 detektiert. Bei Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem sekundärem Antikörper wurde die Membran vollständig getrocknet und die Fluoreszenz mit Hilfe des Typhoon TrioTM Scanners direkt detektiert.

III.2.6 Autoradiographie durch „Phosphorimaging“

Entfärber-Lösung:

40 % (v/v) Methanol (techn.)
 10 % (v/v) Essigsäure (techn.)
 2 % (v/v) Glycerin
 48 % (v/v) Aqua dest.

Neutralisationslösung:

50 % (v/v) Methanol (techn.)
 1 % (v/v) Glycerin
 49 % (v/v) Aqua dest.

Autoradiographie beschreibt die Methode der Visualisierung einer (biologischen) Komponente mit Hilfe radioaktiver Isotope; entweder durch Exposition eines Röntgenfilms durch die radioaktive Komponente oder, wie in dieser Arbeit, unter Verwendung des akkurateren und sensitiveren „Phosphorimaging“ mittels eines Strahlungsdetektors. Die radioaktive Probe wird dazu in Kontakt mit einer „storage phosphor“ Platte gebracht, welche die von der Probe emittierte β -Strahlung absorbiert, indem Moleküle der Plattenbeschichtung in einen angeregten Zustand gehoben werden. Die aus dem Grundzustand gehobenen Moleküle verbleiben bis zum Auslesen der Platte mittels eines „Phosphorimagers“ im physikalisch angeregten Zustand. Beim Abrastern der Exponierplatte fallen die angeregten Moleküle zurück in den Grundzustand und die durch den Detektor ermittelte, freigesetzte Energie wird digital in ein Bild umgewandelt.

Der Einbau des verwendeten radioaktiven Isotops [³⁵S]-Methionin oder -Cystein erfolgte entweder während der *in vitro* Proteinsynthese im Kaninchen-Retikulozytenlysat (s. III.3.2) oder im Zuge eines „pulse-chase“ Experimentes (s. III.6.8.). Nach Auftrennung der radioaktiv markierten Proteine mittels SDS-PAGE (s. III.2.1.) wurden die Proteine durch 15 minütiges Schwenken in Entfärberlösung im Gel fixiert, gefolgt von einer Inkubation in Neutralisationslösung für 30 Minuten. Abschließend wurde das Gel zwischen Whatman-Papier und Folie im Geltrockner bei 90 °C unter Vakuum für 1 - 2 Stunden getrocknet.

Die Detektion der radioaktiven Strahlung erfolgte wie anfangs beschrieben durch Auflegen der „storage phosphor“ Platte. Nach einer Expositionsdauer von 2 Stunden bis 20 Tagen wurde die Exponierplatte durch „Phosphorimaging“ mittels des Typhoon TrioTM analysiert.

III.2.7 Densitometrie (quantitative Bestimmung der Signalstärke)

Zur quantitativen Bestimmung diverser Signalstärken bzw. Bandenintensitäten diente die ImageQuant Software TL 1D (Version 7.0), welche eine computerbasierte Analyse der Farbmenge (= Graustufe) pro Flächeneinheit ermöglicht.

Die Densitometrie erfolgte standardmäßig nach Coomassie-Brillant-Blue-Färbung, immunologischer Detektion mittels Chemilumineszenz/Fluoreszenzfarbstoff oder nach „Phosphorimaging“ radioaktiv markierter Proteine. Analysiert wurden dazu jeweils die durch den Image Scanner III, den Lumi Imager F1 oder den Typhoon TrioTM digitalisierten Bilder. Lediglich Signalstärken des jeweiligen linearen Messungsbereichs wurden quantifiziert und gegebenenfalls graphisch mit Hilfe der Software Excel (Microsoft) dargestellt.

III.2.8 Proteinkonzentrationsbestimmungen

Eine direkte Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung bietet das NanoDrop[®]ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer. Dieses kapillar- und küvettenfreie UV/VIS-Spektralphotometer ermöglicht eine Absorptionsbestimmung verschiedener Wellenlängen von mikro-Volumina. Durch Aufbringen von 2 µl Flüssigkeit erzeugt das Gerät eine winzige Flüssigkeitssäule deren optische Dichte und Transmission im gewünschten Wellenlängenbereich bestimmt wird.

Um eine schnelle Bestimmung der Proteinkonzentration sich in Lösung befindlicher semi-permeabilisierter Zellen (s. Kapitel III.6.6.2) durchzuführen, wurde deren optischen Dichte mit Hilfe des NanoDrop[®]ND-1000 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm bestimmt.

Bei dieser UV-Wellenlänge zeigen bestimmte aromatische Aminosäurereste eine deutliche Absorption (Tyrosin > Tryptophan).

Zur Denaturierung aller Proteine der Suspension semi-permeabilisierter Zellen wurde ein Aliquot 1:20 in 2 % SDS verdünnt und spektralphotometrisch bei $\lambda = 280$ nm analysiert. Als Nullabgleich diente die reine 2 % SDS-Lösung. Typische OD_{280} Werte semi-permeabilisierter HeLa-Zellen lagen im Bereich von 14 bis 18.

III.3 Methoden der *in vitro* Proteinsynthese

Zur *in vitro* Proteinsynthese bieten sich zwei Alternativen.

Einerseits können Transkription und Translation im Zuge voneinander zeitlich und räumlich getrennter Reaktionen vorgenommen werden (Kapitel III.3.1 und III.3.2).

Andererseits bietet ein gekoppeltes System die Möglichkeit beide Prozesse einander anknüpfend im selben Reaktionsgefäß zu bewerkstelligen (Kapitel III.3.3).

III.3.1 *In vitro* Transkription mit SP6/T7 RNA-Polymerase

Salzlösung: (10x)

400 mM HEPES/KOH; pH 7,4

60 mM $MgAc_2$

20 mM Spermidin

Prämix A:

1/10 Volumen 10x Salzlösung

0,1 mg/ml BSA

10 mM DTT

0,5 mM Nukleotid-Mix

Nukleotid-Mix:

je 50 mM ATP, CTP, UTP

in 10 mM HEPES/KOH; pH 7,4

0,1 mM GTP

m^7 GpppG-Lösung:

5 U m^7 GpppG

in 300 μ l 10 mM HEPES/KOH; pH 7,9

Alternativ zur gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation im Retikulozytenlysat (s. Kapitel III.3.3) können beide Vorgänge auch separat voneinander durchgeführt werden.

Dazu wurde für die *in vitro* Transkription linearisierte oder auch zirkuläre Plasmid-DNA verwendet, welche unter Kontroll des SP6 oder T7 Promotors die Nukleotidsequenz eines Polypeptids kodiert (Krieg & Melton 1984; van der Werf *et al.* 1986). Die vorherige

Linearisierung des Plasmids durch eine entsprechende Restriktionsendonuklease konnte entweder

- (i) hinter dem offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) erfolgen, was nach anschließender Translation zu einem vom Ribosom freigesetzten Protein voller Länge führt, oder aber
- (ii) der Schnitt geschieht innerhalb des ORF, was in einem verkürzten, ribosomal arretierten Polypeptid resultiert.

Die zur Transkription verwendeten Plasmide und PCR Produkte sind in Tabelle III-05 aufgelistet. Das Plasmid pB4, welches Präprolaktin (ppl) kodiert, wurde mit *EcoRI* bzw. *PvuII* linearisiert. Die Linearisierung des Vektors pCA1, der das sekretorische Protein ppcecA kodiert, erfolgte mittels der Restriktionsendonuklease *HindIII*.

Das Pipettierschema eines *in vitro* Transkriptionsansatzes ist nachfolgend festgehalten:

Prämix A	30 µl
Plasmid-DNA	1 µg
m ⁷ GpppG (Cap)	2,5 µl
RNasin (40 U/µl)	1,5 µl
SP6 / T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	1 µl

Aqua dest.	ad 50 µl

Nach Inkubation für 3 h bei 40 °C im Wasserbad wurde die Polymerasereaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Das Transkript wurde entweder direkt zur *in vitro* Translation eingesetzt (s. Kapitel III.3.2) oder bei -80 °C aufbewahrt.

Lediglich im Falle von Synaptobrevin2 (Syb2) erfolgte die mRNA Synthese ausgehend von einem linearen PCR-Produkt. Die oben vorgegebene Menge an 1 µg Plasmid-DNA wurde daher durch 24 % (v/v), also 12 µl PCR-Produkt von Syb2 ersetzt (vgl. auch Kapitel III.5.1.).

III.3.2 *In vitro* Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden

Die *in vitro* Synthese und radioaktive Markierung von Proteinen wurde im Translationssystem „Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated“ der Firma Promega durchgeführt. Retikulozyten stellen im Zuge der Erythropoese die letzte Vorläuferform der Erythrozyten dar. Man bezeichnet sie oft auch als „jugendliche Erythrozyten“, da sie bereits wie die reifen Erythrozyten ihren Nukleus und sämtliche anderen

Zellorganellen im Verlauf der Genese abgestoßen haben. Somit sind zwar alle zur Translation erforderlichen cytosolischen Komponenten (Ribozyme, Proteine und Co-Faktoren) anwesend, jedoch ist das Lysat frei von störender endogener DNA. Das bereits nukleasebehandelte Lysat enthält - bedingt durch die Behandlung mit Nuklease S1 - auch keine endogenen mRNAs mehr, sodass eine kontrollierte und programmierte Synthese einzelner Polypeptide durch Zugabe einer zuvor transkribierten mRNA (s. Kapitel III.3.1) möglich ist.

Zur Markierung der synthetisierten Proteine diente in der Regel das radioaktive Isotop [³⁵S]-Methionin (1000 Ci/mmol). Erfolgte die Translation in Anwesenheit von rauen Hundepankreas-mikrosomen oder semi-permeabilisierter Zellen (= cotranslationale Transportbedingungen), so wurde ein entsprechender Anteil des Wassers durch diese ersetzt (6 % bzw. 32 %).

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

Retikulozytenlysat	12,5 µl
AS-Mix ohne Methionin	0,5 µl
RNasin	0,5 µl
mRNA	1,0 µl (Ausnahme: ppcecA-mRNA 3 µl)
[³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	1,0 µl

Aqua dest.	ad 25 µl

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und anschließend die Reaktion bei 30 °C für 15 min (posttranslational, s. Kapitel III.4.2) oder 60 min (cotranslational, s. Kapitel III.4.1) inkubiert. Für eine Analyse der Synthese wurde die Probe in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, erhitzt und eine SDS-PAGE durchgeführt (s. Kapitel III.2.1). Die anschließende Auswertung erfolgte durch „Phosphorimaging“ (s. Kapitel III.2.6).

III.3.3 Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation im Retikulozytenlysat

Dem Dogma der Molekularbiologie folgend kann die zelluläre Umschreibung (Transkription) einer gegebenen DNA-Sequenz in RNA mit deren anschließender Übersetzung (Translation) in eine zugehörige Aminosäuresequenz *in vitro* effizient nachgestellt werden.

Unter Verwendung des „TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System“, welches die Vorgänge der Transkription und Translation in direkt aufeinander folgenden Reaktionen koppelt, kann innerhalb eines Reaktionsgefäßes ausgehend von DNA Protein synthetisiert werden.

Auch im Falle der gekoppelten *in vitro* Proteinsynthese wurde linearisierte oder zirkuläre SP6 bzw. T7 Promotor kontrollierte Plasmid-DNA zur Expression verwendet.

Zur Markierung der synthetisierten Proteine diente für das verwendete Substrat Präproinsulin das radioaktive Isotop [³⁵S]-Cystein (1000 Ci/mmol), für alle sonstigen Substrate das Isotop [³⁵S]-Methionin. Erfolgte die Proteinsynthese in Gegenwart von Hundepankreasmikrosomen oder semi-permeabilisierter Zellen (= cotranslationale Transportbedingungen), so wurde ein entsprechender Anteil des Wassers durch diese ersetzt (6 % bzw. 32 %).

Ein *in vitro* Expressionsansatz zur Cystein-Markierung setzt sich wie folgt zusammen:

TnT [®] Retikulozytenlysats	12,5 µl
TnT [®] Puffer	1 µl
SP6 / T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	1 µl
[³⁵ S]-Cystein (1000 Ci/mmol)	1 µl
Plasmid-DNA	1 µg
RNasin (40 U/µl)	0,5 µl
AS-Mix ohne Cystein	0,5 µl

Aqua dest.	ad 25 µl

Ein *in vitro* Expressionsansatz zur Methionin-Markierung setzt sich wie folgt zusammen:

TnT [®] Retikulozytenlysats	12,5 µl
TnT [®] Puffer	1 µl
SP6 / T7 RNA Polymerase (20 U/µl)	1 µl
[³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol)	1 µl
Plasmid-DNA	1 µg
RNasin (40 U/µl)	0,5 µl
AS-Mix ohne Methionin	0,5 µl

Aqua dest.	ad 25 µl

Der Ansatz wurde auf Eis pipettiert und anschließend für 60 min bei 30 °C inkubiert. Für eine Analyse der Synthese wurde die Probe in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, erhitzt und eine SDS-PAGE durchgeführt (s. Kapitel III.2.1). Die anschließende Auswertung erfolgte durch „Phosphorimaging“ (s. Kapitel III.2.6).

III.4 Analysemethoden/-grundlagen der *in vitro* Proteintranslokation

Wie in der Einleitung unter Aspekt II.2.1.1 und II.2.1.2 besprochen, kann ein Polypeptid bereits während seiner Biogenese (cotranslational) oder aber nach vollständiger Synthese und Freisetzung vom Ribosom (posttranslational) über die ER Membran transloziert bzw. in selbige inseriert werden. Beide Transportmodi wurden mit den folgenden Untersuchungsmethoden *in vitro* nachempfunden.

III.4.1 Cotranslationale Translokation von Transportsubstraten in Membranvesikel

Um einen cotranslationalen Transport von Vorläufersubstraten zu ermöglichen, wurden dem *in vitro* Translationsansatz (s. III.3.2) und gekoppeltem *in vitro* Expressionsansatz (s. Kapitel III.3.3) bereits mit Synthesebeginn raue Hundepankreasmikrosomen (RM) bzw. semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) zugesetzt. Dabei wurden die RM mit 6 % (v/v) pro Translationsansatz zugesetzt und die SPZ stets 32 %ig (v/v). Zum Ausgleich des Volumens an RM oder SPZ wurde die entsprechende Menge an Aqua dest. im jeweiligen Ansatz reduziert. Schließlich wurde der Ansatz zur Synthese mit gleichzeitig stattfindender Translokation des naszierenden Polypeptids für 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von Lämmli-Puffer und Kochen der Probe für 5 min bei 95 °C konnte der Ansatz über SDS-PAGE (s. Kapitel III.2.1) aufgetrennt und durch „Phosphorimaging“ (s. Kapitel III.2.6) ausgewertet werden.

III.4.2 Posttranslationale Translokation von Modellsubstraten in Membranvesikel

Beim posttranslationalen Transport eines Modellsubstrates musste zunächst gewährleistet werden, dass der Vorläufer vollständig in Abwesenheit vesikulärer Membranen *in vitro* synthetisiert wurde.

Dazu erfolgte die Proteinsynthese wie unter III.3.2 beschrieben für 15 min bei 30 °C. Durch die anschließende Zugabe von Cycloheximidlösung (Endkonzentration 0,1 µg/µl) und RNaseA-Lösung (Endkonzentration 0,08 µg/µl) wurden Ribosomen sowohl durch den Proteinsyntheseinhibitor inaktiviert als auch mit Hilfe der Nuklease im rRNA-Anteil verdaut. Die Stoppreaktion erfolgte für 5 min bei ebenfalls 30 °C. Erst danach wurden zum Ansatz raue Hundepankreasmikrosomen (RM) bzw. semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) zugegeben. Wie beim cotranslationalen Ansatz wurden die RM mit 6 % (v/v) pro Translationsansatz zugesetzt und die SPZ stets 32 %ig (v/v).

Einzigste Ausnahme bildet dabei die Analyse der posttranslational inserierenden C-terminal verankerten Membranproteine Cytochrom b5, Synaptobrevin2 und Sec61 β . In diesem Fall wurden die synthetisierten Substrate lediglich mit 16 % SPZ inkubiert (s. Abb. III-01). Diese Vesikelkonzentration erlaubte bei ausreichend akzeptabler Signalstärke die Signaldetektion unterhalb der Sättigung (keine Linearität zwischen Modifikation und Vesikelkonzentration). Der fertige Ansatz inkubierte zur posttranslationalen Translokation für 30 min bei 30 °C. Die Analyse der Probe erfolgte nach Zugabe von Lämmli-Puffer und dem Kochen der Probe mittels SDS-PAGE (s. Kapitel III.2.1) und „Phosphorimaging“ (s. Kapitel III.2.6).

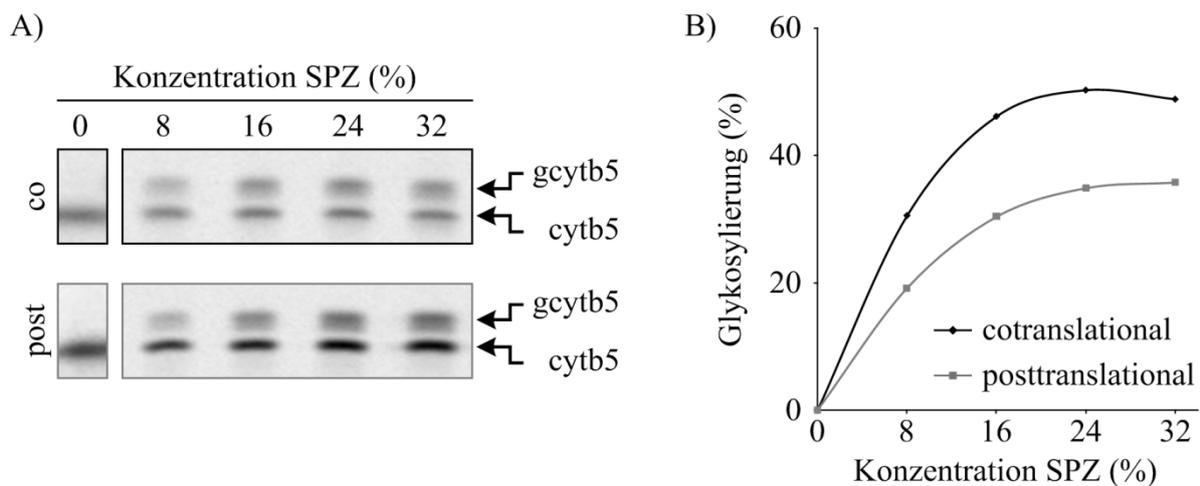


Abb. III-01: Linearer Messbereich C-terminal verankerter Membranproteine

(A) Ein *in vitro* Syntheseansatz zur radioaktiven [^{35}S]-Methionin Markierung des C-terminal verankerten Substrates Cytochrom b5 (cytb5) wurde während der 60 minütigen Synthese (cotranslational, co) oder 15 min nach erfolgter Synthese (posttranslational, post) bei 30 °C mit verschiedenen Konzentrationen semi-permeabilisierten Zellen (SPZ; 0 % - 32 %) ergänzt. Im posttranslationalen Ansatz wurde die Synthese durch Zugabe von Cycloheximid und RNaseA für 5 min bei 30 °C abgestoppt und anschließend zur posttranslationalen Translokation für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Analyse der Proben nach Zugabe von Lämmli-Puffer und Kochen bei 95 °C für 5 min erfolgte mittels SDS-PAGE und „Phosphorimaging“.

(B) Densitometrische Quantifizierung der Cytochrom b5 Glykosylierung (gcytb5) im Verhältnis zur Cytochrom b5 Synthese (Summe aus Vorläufer plus reifer Form) in Abhängigkeit der Konzentration an zugesetzten SPZ in Prozent.

III.4.3 Sequestrierung: Proteaseresistenztest eines Transportsubstrates

Saccharose-Lösung:

162,5 mM Saccharose
in bidest. H₂O

Proteinase K/Triton X-100-Lösung:

162,5 mM Saccharose
340 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K
0,2 % (w/v) Triton X-100
in bidest. H₂O

Proteinase K-Lösung:

162,5 mM Saccharose

340 µg/ml Proteinase K

in bidest. H₂O

Die Sequestrierung erlaubt die zweifelsfreie Bestimmung des Transports eines Vorläufer-substrates in ein schützendes Kompartiment. Erlangt ein *in vitro* synthetisiertes Polypeptid Proteinase K resistente Eigenschaften, so deutet dies seine vollständige Translokation in ein schützendes vesikuläres Lumen oder aber (im Falle eines Membranproteins) seine Insertion in eine (teilweise) schützende Lipiddoppelschicht an. Die Zugabe von Proteinase K in Kombination mit dem Detergenz Triton X-100 hebt durch Solubilisierung der schützenden Vesikelmembran die Proteinase K Resistenz eines transportierten Polypeptids wieder auf und lässt dadurch falsch-positiv interpretierte resistente Fragmente als solche erkennen.

Zum Durchführen einer Sequestrierung wird ein co-/posttranslationaler Translokationsansatz (s. III.4.1 und III.4.2) nach dessen Inkubation bei 30 °C auf Eis gestellt, um die Synthese- und Translokationsreaktion zu stoppen. Pro Transportansatz wurden dann drei Eppendorf-Reagiergefäße wie folgt auf Eis vorbereitet:

- in Reagiergefäß (S) wurden 5 µl Saccharose-Lösung vorgelegt
- in Reagiergefäß (P) wurden 5 µl Proteinase K-Lösung vorgelegt
- und in Reagiergefäß (T) wurden 5 µl Proteinase K/Triton X-100-Lösung vorgelegt

Zu jedem der 3 Eppendorf-Reagiergefäße wurde ein Aliquot des Transportansatzes von 5 µl zupipettiert und es folgte ein kurzes Vortexen. Der Proteinase K-Verdau erfolgte für 60 min bei 0 °C. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1/5 des Volumens an 100 mM PMSF (in Ethanol gelöst) zugegeben und der Ansatz wurde weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Lämmli-Puffer und dem Kochen der Proben für 5 min bei 95 °C wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt und die Reaktionen durch „Phosphorimaging“ analysiert.

Bei Modellsubstraten welche keine störenden Proteinase K resistente Fragmente erzeugen (alle aus Tab. III-05 außer ppcecA), wurde weitestgehend auf die Tritonkontrolle (Reagiergefäß T; s. oben) verzichtet.

PräprocecropinA erfordert auf Grund eines störenden Proteinase K resistenten Fragmentes, welches mit der prozessierten Form, dem ProcecropinA, verwechselt werden kann, eine Sonderbehandlung. In diesem speziellen Fall wurde der Proteaseverdau durch Zugabe einer zweiten Protease (Trypsin) versucht zu intensivieren; bedingt durch ein vergrößertes Spektrum potenzieller Proteaseschnittstellen.

Folgende Änderungen sind dabei zu beachten:

Proteinase K/Trypsin-Lösung:

162,5 mM Saccharose
 100 µg/ml Proteinase K
 100 µg/ml Trypsin
 in bidest. H₂O

Proteinase K/Trypsin/Triton X-100-Lösung:

162,5 mM Saccharose
 100 µg/ml Proteinase K
 100 µg/ml Trypsin
 0,2 % (w/v) Triton X-100
 in bidest. H₂O

PLAC-Lösung:

12 mg Pepstatin A
 12 mg Leupeptin
 12 mg Antipain
 12 mg Chymostatin
 alle in je 1 ml DMSO gelöst
 und vereinigt

Proteasen-Inhibitorlösung:

100 mM PMSF
 20 % (v/v) PLAC-Lösung
 in 100 % Ethanol

Zur Inaktivierung der Proteasen wurden pro Sequestrierungsansatz 1/5 des Volumens an Proteasen-Inhibitorlösung zugegeben und der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert.

III.5 Analysemethoden der Molekularbiologie und Nukleinsäurechemie

III.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Heutzutage ist die PCR die Methode der Wahl zur enzymatischen Amplifikation einer beliebigen, bis zu mehreren Kilobasen großen DNA-Sequenz und deren eindeutigem Nachweis. Voraussetzung zur Verwendung der *in vitro* stattfindenden PCR ist die Kenntnis der flankierenden Nukleotidsequenzen des DNA-Abschnitts von Interesse, die als kurze Oligonukleotide (Primer; s. Tab. III-02) vorliegen müssen. Die Sequenzen der synthetisierten Primer sind so gewählt, dass sie komplementär zu Anfang und Endbereich der zu vermehrenden DNA sind. Weitere Komponenten der PCR-Reaktion sind neben den Primern auch die zu amplifizierende DNA (das Template), ein dNTP-Gemisch, der Reaktionspuffer und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Als DNA-Polymerase wurde das Enzym *Pfu* verwendet, welches aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* stammt. Die thermostabile *Pfu*-Polymerase besitzt neben ihrer 5' → 3'-Polymeraseaktivität auch eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität zur Korrekturlesefunktion. Das Resultat ist eine

niedrige Fehlerrate und große Fidelität der Polymerase bei hohen Temperaturen, die während der einzelnen Zyklusschritte der PCR auftreten (Cline *et al.* 1996).

Ein PCR-Reaktionsmix wurde nach folgendem Schema pipettiert:

10x PCR-Puffer	5 µl
dNTPs [10 mM]	2 µl
stromaufwärts Primer [50 µM]	1 µl
stromabwärts Primer [50 µM]	1 µl
Template-DNA [1 µg/µl]	0,5 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase [2,5 U/µl]	0,5 µl

Aqua dest.	ad 50 µl

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden in den Thermocycler gestellt und das entsprechende PCR-Programm mit den gewünschten Parametern gestartet.

PCR-Programm:

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

Um den Erfolg der PCR-Reaktion zu testen, wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) versetzt und im einprozentigen Agarosegel aufgetrennt (s. Kapitel III.5.2).

III.5.2 Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

<u>DNA-Probenpuffer (6x):</u>	<u>TAE-Puffer (50x):</u>
0,25 % (w/v) Bromphenolblau	2 M Tris-Acetat; pH 8,0
0,25 % (w/v) Xylencyanol	50 mM EDTA
40,0 % (w/v) Saccharose	in bidest. H ₂ O
in bidest. H ₂ O	

Zur größenbasierenden Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Analog zu anderen Elektrophoresemethoden wird auch bei der Agarosegelelektrophorese der Analyt, in diesem Fall DNA, bedingt durch seine Nettoladung im elektrischen Gleichspannungsfeld aufgetrennt. Die negative Nettoladung biologischer Nukleinsäuremoleküle resultiert aus dem Phosphatrückgrat und dirigiert die Moleküle durch das poröse Agarosepolymer hin zur Anode, dem + Pol. Kleinere Moleküle passieren die Gelmatrix schneller als Größere. Somit ist die Porengröße des Gels ein determinierender Faktor, welcher abhängig von der verwendeten Agarosekonzentration variabel festgelegt werden kann. Innerhalb dieser Arbeit wurden einprozentige Agarosegele verwendet.

Zur Herstellung der Gele wurden 1,2 g Agarose in 120 ml TAE-Puffer gegeben. Durch Erhitzen der Lösung in einem Mikrowellengerät löste sich die Agarose im TAE-Puffer. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Handwärme wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und die Agarose-Lösung in eine mit einem Kamm versehene horizontale Flachbettkammer gegossen. Nach Polymerisation der Gelmatrix wurde vor Auftragen der Proben der Kamm entfernt. Das Agarosegel wurde mitsamt der Flachbettkammer in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, mit TAE-Puffer überschichtet und die zu analysierende Probe zusammen mit einem entsprechenden Marker zum Abschätzen der Fragmentgrößen aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 200 mA für 1 - 2 Stunden. Das zugegebene Ethidiumbromid interkaliert in die Helixstruktur der Nukleinsäuren und steigert deren Fluoreszenzemission bei Anregung unter UV-Licht um ein Vielfaches, wodurch Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden.

Gele mit den aufgetrennten Nukleinsäure-Fragmenten wurden im Image Master[®] VDS fotografiert und dokumentiert.

III.5.3 Medien und Platten zur Anzucht von Bakterienstämmen

LB-Medium:

25 g LB-Medium („lysogeny broth“)

ad 1 Liter H₂O bidest.

Medium autoklavieren

LB-Amp-Platten:

35 g LB-Agar (Lennox)

in 1 l Aqua dest. lösen

Medium autoklavieren

Nach Abkühlen auf Handwärme Zugabe von 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml)

Lösung in sterilen 10 cm Petrischalen verteilen und aushärten lassen

LB-Amp-Medium:

LB-Medium mit Ampicillin
(Endkonzentration 100 µg/ml)
Medium autoklavieren

TB-Medium:

50,8 g TB-Medium („terrific broth“)
in 1 l Aqua dest. lösen

Die Anzucht der *E. coli*-Zellen erfolgte in 100 ml LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator. Als Kulturgefäße dienten 500 ml Schüttelkolben, die einen ausreichenden Gasaustausch ermöglichten. Den jeweiligen Medien wurde 100 µg/ml Ampicillin beigemischt.

Für das Wachstum auf Nährböden wurden die verwendeten Bakterienstämme auf den LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

III.5.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen JM101 und DH5α

LB-Medium:

25 g LB-Medium („lysogeny broth“)
ad 1 Liter H₂O bidest.
Medium autoklavieren

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen (JM101 oder DH5α; vgl. Kapitel III.1.8.) auf Eis aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit 200 - 400 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min bei 0 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 90 s bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen (Aufnahme der Plasmid-DNA), gefolgt von einer einminütigen Abkühlung auf Eis. Zu den transformierten *E. coli*-Zellen wurden 500 µl LB-Medium gegeben und die Suspension für 1 Stunde bei 37 °C gerollt.

Die transformierten *E. coli*-Zellen boten zwei Möglichkeiten:

- (1) Den Ansatz komplett in 100 ml LB-Medium mit passendem Selektionsantibiotikum inokulieren, um das Plasmid für eine Plasmid-Midipräparation zu amplifizieren (s. Kapitel III.5.5)
- (2) Den Ansatz auf einer LB-Agar-Platte ausstreichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Mit einem sterilen Zahnstocher gepickte Einzelkolonien konnten wiederum für das Inokulieren größerer Volumina verwendet werden.

III.5.5 Plasmid-DNA Extraktion aus transformierten *E. coli*-Zellen („Midipräp“)

Bei der Plasmid-DNA-Midipräparation mit dem Jetstar-Kit der Firma Genomed erfolgt die Reinigung der DNA nach dem Prinzip des Anionenaustausches mit Hilfe einer Säule, an welche die DNA nach einer alkalischen Zellyse binden kann. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA dann durch Kompetition mit hohem Salzgehalt (1,25 M NaCl) mit großer Reinheit von der Säule eluiert werden.

Die Durchführung der Midipräparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

III.5.6 Quantifizierung und Reinheit von DNA-Präparationen

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer der Firma Peqlab (vgl. Kapitel III.2.8).

Die Quantifizierung der DNA-Präparation erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}). Um zusätzlich eine Aussage über mögliche Verunreinigungen der DNA-Lösung zu erhalten, vermisst das NanoDrop-Gerät zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm (OD_{280}) und ermittelt den Quotient aus OD_{260}/OD_{280} . Bei einer nicht mit Protein verunreinigten DNA-Lösung entspricht diese Ratio $\approx 1,8$. Ein niedrigerer Wert - als Folge einer höheren optischen Dichte bei 280 nm - deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine hin, ein höherer Wert hingegen spricht für eine Verunreinigung durch RNA, da diese aufgrund ihres niedrigeren Ordnungsgrades eine höhere Absorption bei 260 nm aufweist als doppelsträngige DNA.

Nach Bestimmung des Leerwertes wurde 1 μ l der DNA-Lösung vermessen und automatisch sowohl DNA-Konzentration als auch Reinheitsgrad bestimmt und digital ausgegeben.

III.6 Methoden der Zellkultivierung, -manipulation und -analyse

III.6.1 Kultivierung & Subkultivierung von Säugerzelllinien

Die Methode der Zellkultur beinhaltet die Kultivierung tierischer oder pflanzlicher Zellen in einem adäquaten Nährmedium außerhalb des lebenden Organismus. Es können sowohl immortalisierte (unsterbliche) Zelllinien als auch primäre Zellen in Kultur gehalten werden. Beide Zelltypen erlauben die Analyse biologisch relevanter Vorgänge unter annähernd *in vivo* Bedingungen.

Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass man den jeweiligen biologischen Prozess nicht im komplexen Gesamtsystem eines Organismus studiert, sondern auf Ebene eines isolierten Gewebes bzw. eines einzelnen Zelltyps, welcher gegebenenfalls im Zuge der Immortalisierung verschiedene genetische Transformationen erfahren hat.

Die verwendete Säugerzelllinie HeLa (s. Kapitel III.1.9) wurde in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und in der Regel alle drei Tage passagiert (= subkultiviert). Dazu wurden die adhärennten HeLa-Zellen zunächst einmal mit 1x PBS gewaschen und durch eine fünfminütige Behandlung mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) bei 37 °C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml Medium suspendiert und 1:6 in einem Endvolumen von 15 ml Medium verdünnt (Medium s. Kapitel III.1.9) und in einer 75 cm² Zellkulturflasche weiter kultiviert.

Die langfristige, zellteilungsfreie Lagerung der Kulturzellen erfolgte in flüssigem Stickstoff in 10 % DMSO-haltigem Kulturmedium ohne Antibiotikum angereichert mit 20 % FCS.

Durch rasches Auftauen bei 37 °C und Verdünnen mit vorgewärmtem Kulturmedium konnten in Stickstoff gelagerte Zellen wieder in Kultur überführt werden.

Wieder in Kultur gebrachte Zellen wurden routinemäßig mit Hilfe eines Mycoplasmentests auf eine mögliche Kontamination durch parasitäre Mycoplasmen getestet.

Um eine mögliche Vergleichbarkeit verschiedener Experimente, durchgeführt mit unterschiedlich lange in Passage befindlichen Zellen, zu gewährleisten, wurden am Vortag eines Versuchs die Kulturzellen stets 1:2 passagiert. Dadurch wurde bewirkt, dass die Zellen sich zu Beginn des Experiments immer in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden.

III.6.2 Zellzählungsmethoden

Im Zuge dieser Arbeit mussten für unterschiedliche Versuchsdurchführungen quantitative Aussagen über die Zellzahl getroffen werden. Eine genaue Kenntnis der Zellzahl wurde unter anderem benötigt für:

- (i) Verdünnungen vorgegebener Zellsuspensionen
- (ii) Aussäen definierter Zellzahlen für Zellmanipulationen jedweder Art
- (iii) Bestimmung der Zellproliferation und Zellviabilität an Hand lebender Zellen
- (iv) Präparation semi-permeabilisierter Zellen und Zelllysate

Die Zellzahl konnte mit zwei auf dem gleichen Prinzip basierenden Methoden bestimmt werden. Sowohl die mikroskopische Auswertung der Neubauerzählkammer als auch die

automatisierte Zellzählung mittels Countess bestimmen den Anteil trypanblaugefärbter und ungefärbter Zellen eines definierten Volumens. Neben der Gesamtzahl an Zellen lässt sich aus dem Quotienten an ungefärbten (lebend) und trypanblaugefärbten (tot) Zellen auch die Viabilität der untersuchten Zellsuspension bestimmen.

Der zytotoxische Farbstoff Trypanblau wird lediglich von Zellen mit ruptierter Plasmamembran aufgenommen, wo er durch die Zugänglichkeit zum Cytosol dort unspezifisch an Proteine bindet. Im Gegensatz zu farbstofffreien, ungefärbten Zellen mit intakter Zellmembran, werden die blaugefärbten Zellen auf Grund des Verlustes ihrer Membranintegrität als Tod angesehen.

III.6.2.1 Zellzählung mittels Neubauerzählkammer

Bei der Zellzählung mittels Neubauerzählkammer wurden adhärente Zellen durch Trypsinbehandlung (s. Kapitel III.6.1) abgelöst, in frischem Medium oder KHM-Puffer (s. Kapitel III.6.6.2) suspendiert und ein Aliquot im Verhältnis 1:4 mit Trypanblaulösung gemischt. Der errechnete Mittelwert der vier in der Neubauerzählkammer auszuzählenden Quadrate wurde dann mit vier (Verdünnungsfaktor) und 10.000 (Hochskalierungsfaktor des definierten Zählkammervolumens von 0,1 µl zu 1 ml) multipliziert, um die Zellzahl pro 1 ml zu bestimmen.

III.6.2.2 Zellzählung mittels „Countess® Automated Cell Counter“

Bei der Zellzählung mittels Countess wurden die adhärenen Zellen durch Trypsinbehandlung (s. Kapitel III.6.1) abgelöst, in frischem Medium oder KHM-Puffer (s. Kapitel III.6.6.2) suspendiert und ein Aliquot im Verhältnis 1:2 mit sterilfiltrierter Trypanblaulösung verdünnt. Die automatisierte Zellzählung durch das Countessgerät lieferte neben der Gesamt-, Lebend- und Todzellzahl auch den mittleren Zelldurchmesser der Zellpopulationen.

III.6.3 siRNA vermittelte Säugerzellmanipulation

Sogenannte „small interfering“ RNAs (siRNAs) vermitteln den Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi). Dieser in Pflanzen, Pilzen und Tieren natürlich vorkommende Mechanismus der posttranskriptionellen Genstilllegung (PTGS) dient neben der zelleigenen Genregulation auch der Abwehr von doppelsträngigen RNA Molekülen. Die Quelle solcher

doppelsträngiger RNA (dsRNA) ist vielfältig und kann sowohl endogen innerhalb der Zellen entspringen als auch exogen von außen eingebracht werden. Neben der doppelsträngigen RNA Zwischenstufe mobiler Genabschnitte (Transposons) und durch Infektion eindringende virale dsRNA können auch synthetisch hergestellte siRNAs durch passende Transfektionsmethoden in Zellen eingebracht werden.

Obgleich es sich bei den verschiedenen dsRNAs Spezies um Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge handelt, werden alle durch Aktivität des cytosolischen Dicer-Enzymkomplexes auf eine einheitliche Länge von 21 - 24 Nukleotiden (nt) getrimmt, welche zudem mit charakteristischen Dinukleotidüberhängen an beiden 3'-Enden versehen sind. Diese kurzen, siRNA genannten Nukleinsäurefragmente bestehen aus zwei komplementären Strängen, deklariert als *passenger* (= Sinnstrang) und *guide* (=Antisinnstrang) Strang. Beim Transfer des siRNA Moleküls vom Dicer-Enzymkomplex in den sich ebenfalls cytosolisch befindenden RISC (RNA induzierter Stilllegungskomplex) erfolgt innerhalb dieses heteromultimeren Enzymkomplexes durch dessen zentrale Komponente, ein Argonautprotein, die Spaltung und Entlassung des *passenger* Strangs. Der so entstehende Holo-RISC mit dem einzelsträngigen *guide* Strang im aktiven Zentrum kann nun komplementäre mRNA Moleküle erkennen, binden und mit Hilfe der RNaseH-ähnlichen PIWI-Domäne der Argonautuntereinheit spalten. Gespaltene mRNA Moleküle werden intrazellulär durch Nukleasen weiter degradiert. Es erfolgt letztlich ein durch RNA induzierter Block der Proteinsynthese bzw. der Translation der (m)RNA.

Bedingt durch die unterschiedliche Herkunft der dsRNA-Moleküle bietet die RNA Interferenz der Zelle eine Vielfalt an Reaktions- und Regulationsmöglichkeiten basierend auf einem einzigen Prinzip. RNAi unterstützt die Zelle bei viralen Infektionen, erhält die Genomstabilität durch Unterdrückung mobiler (Retro-) Transposons, unterdrückt die Proteinsynthese was eine Regulation von Entwicklungsprozessen erlaubt und selbst auf dem Level der Transkription und der Formation von Heterochromatin (piRNA) im Zuge epigenetischer Prozesse kann RNA Interferenz agieren (Hamilton & Baulcombe 1999; Elbashir 2001; Pressman *et al.* 2007; Jinek & Doudna 2009; Moazed 2009; Siomi & Siomi 2009).

In der dieser Arbeit wurden siRNAs lediglich als Werkzeug zur spezifischen Genexpressionsminderung verwendet. Durch Depletion der mRNA sollte unter Beachtung der Halbwertszeit des kodierten Proteins dessen Konzentration deutlich reduziert werden. Durch die theoretisch rund 21 nt lange Komplementarität des *guide* Strangs zur Ziel-mRNA, erweist sich die siRNA vermittelte Genstilllegung als hoch spezifisch, da eine 21 Nukleotide umfassende Sequenz statistisch nur einmal im 3,2 Gbp großen menschlichen Genom kodiert sein sollte. Zu

beachten ist jedoch, dass die tatsächlich über Watson-Crick-Basenpaarung stattfindende Komplementarität zwischen *guide* Strang und Ziel-mRNA innerhalb des RISC deutlich weniger Basenpaarungen ($\approx 6 - 10$ bp) umfasst, man spricht von der sogenannten *seed* Region des *guide* Strangs, was die mögliche Spezifität mindert (Parker *et al.* 2005; Jinek & Doudna 2009). Um dieser Problematik der Spezifität entgegenzuwirken und mögliche Sekundäreffekte einer einzelnen siRNA auszuschließen, wurden für die Zielgene (*SEC61A1*, *SEC62* und *BIP*) stets zwei verschiedene siRNAs separat verwendet, um auftretende Effekte und Phänotypen zu verifizieren und tatsächlich der Reduktion des gewünschten Zielgens zuzuschreiben.

Zur Transfektion der adhärenen Kulturzellen wurde das kationische Lipidtransfektionsreagenz HiPerFect verwendet. Nach separater Komplexbildung aus siRNA und Transfektionsreagenz kann dieser bei Zugabe zu Kulturzellen deren Plasmamembranen passieren und im Zellinneren die komplexierte siRNA wieder freigeben.

Einen Tag vor der Transfektion wurden HeLa-Zellen 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Die sich am Folgetag in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Zellen (etwa 80 % Konfluenz) werden durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Kulturmedium suspendiert, ausgezählt und auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. Im Anschluss wurde in einem Reagiergefäß die 20 μ M siRNA-Stocklösung in serumfreiem OptiMEM-Medium verdünnt, mit Transfektionsreagenz versetzt, kurz gemischt und zur Komplexbildung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (s. Tab. III-08). Währenddessen wurden 580.000 zu transfizierende Zellen (3,9 ml der $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) gleichmäßig in einer 6 cm Schale ausgesät. Zuletzt wurde der vorbereitete Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel und zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen nochmals mit dem nochmals vorbereiteten Transfektionsansatz behandelt, allerdings ohne erneute Trypsinisierung und Verdünnung der Zellen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die transfizierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tab. III-08: Pipettierschema der in der Arbeit verwendeten siRNA Transfektionsansätze

Angaben beziehen sich auf eine Transfektion in 6 cm Schalen; UTR = untranslatierte Region (alphabetische Auflistung; * = bei der *ERJ1* siRNA handelt es sich ebenfalls um eine siRNA der 3'-untranslatierten Region)

Name	Endkonzentration in 4 ml Medium [nM]	OptiMEM- Volumen [μ l]	siRNA- Volumen [μ l]	HiPerFect- Volumen [μ l]
------	--	-----------------------------------	---------------------------------	-------------------------------------

BIP siRNA	35 nM	79	7	20
BIP-UTR siRNA	35 nM	79	7	
*ERJ1 siRNA	25 nM	81	5	
Kontroll- siRNA	10 - 35 nM	79 - 84	2 - 7	
SEC61 siRNA	20 nM	82	4	
SEC61 siRNAs	10 nM (SEC61 siRNA) + 10 nM (SEC61-UTR siRNA)	82	2 + 2	
SEC61-UTR siRNA	20 nM	82	4	
SEC62 siRNA	10 nM	84	2	
SEC62-UTR siRNA	10 nM	84	2	

III.6.4 Plasmidgestützte Säugerzellmanipulation

Prinzipiell erlaubt ein eingebrachtes Plasmid die Zellmanipulation auf zwei unterschiedlichen Wegen:

(i) *Genexpressionsreduktion:*

Die Plasmidsequenz selbst verringert durch eine homologe oder heterologe Rekombination die zelluläre Genexpression oder aber der plasmidkodierte Effektor (siRNA, miRNA, shRNA, DNA-Methyltransferase, Toxin, Protease, etc.) greift in die Kette der Genexpression ein.

(ii) *Genexpression:*

Das plasmidkodierte Molekül stellt einen die Genexpression steigernden Effektor dar (Transkriptionsfaktor, DNA-Demethylase, DNA-Acetyltransferase, etc.) oder ergänzt bereits vorhandene bzw. verlorene genomisch kodierte Genprodukte.

In dieser Arbeit wurde die Plasmidtransfektion nur zum Zweck der vektorgetriebenen Genexpression verwendet. Dabei dienten die eingebrachten Vektoren (s. Tab. III-04) als separater Genlokus, welcher in einem bereits durch siRNA modifizierten zellulären Hintergrund (vgl. Kapitel III.6.3) die Expression eines wildtypischen oder mutanten Allels ermöglicht. Die plasmidbasierte Expression eines zuvor mittels siRNA depletierten wildtypischen Gens innerhalb der gleichen Zelle bezeichnet man als Rettungsexperiment.

Rettungsexperimente gelten als sicherster Beweis im Zuge der empfohlenen Kontrollen für RNA Interferenzexperimente (Gold-Standard).

Zur Plasmidtransfektion der Kulturzellen wurde das Reagenz FuGENE HD[®] der Firma Roche verwendet. Auch in diesem Fall beruht die Transfektionsmethode auf der Komplexbildung aus Transfektionsreagenz und Plasmid. Der gebildete Komplex erlaubt die Passage der Plasmamembran und die Freisetzung des Vektors im Zellinneren.

Die bereits zweimal durch siRNA transfizierten Zellen erhielten 32 h nach erster siRNA Transfektion einen erneuten Mediumwechsel (3,9 ml frisches Kulturmedium) gefolgt von der tropfenweise Zugabe des vorbereiteten Plasmid-Transfektionsansatzes. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurde eine möglichst gleichmäßige Plasmidverteilung/-transfektion gewährleistet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die transfizierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Zur Vorbereitung des Plasmid-Transfektionsansatzes wurden 4 µg aus *E. coli* DH5α aufgereinigte Plasmid-DNA in einem Reagiergefäß in 86 µl OptiMEM-Medium verdünnt, mit 16 µl FuGENE HD[®] versetzt, kurz gemischt und zur Komplexbildung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

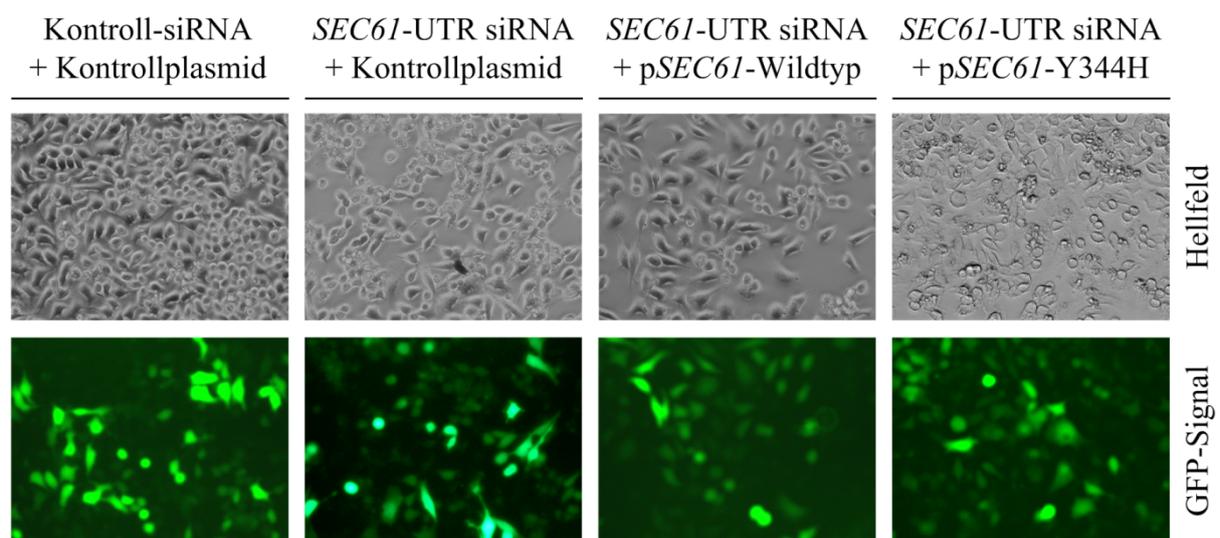


Abb. III-02: Bestimmung der Plasmidtransfektionseffizienz durch IRES-GFP Vektoren

Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 20 nM Kontroll-siRNA oder *SEC61*-UTR siRNA behandelt. 32 h nach Behandlung mit siRNA erfolgte eine Kotransfektion mit 4 µg Plasmid-DNA. 64 h nach Plasmidtransfektion durch die operonähnlich konzipierten IRES-GFP-Vektoren wurde deren Plasmidtransfektionseffizienz mit Hilfe einer Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie (Hellfeld bzw. GFP-Signal; 20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv) des gleichen Bildabschnittes bestimmt. Die unter der Kontrolle des CMV Promotor stehenden pCDNA3 Vektoren kodieren kein (Kontrollplasmid) oder ein weiteres Gen (p*SEC61*-Wildtyp, p*SEC61*-Y344H) stromaufwärts der parallel zu exprimierenden IRES-GFP-Sequenz. CMV = Cytomegalievirus; GFP = grünfluoreszierendes Protein; IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle

Wie Abbildung III-02 zu erkennen gibt, erreichte man mit allen pCDNA3 basierenden IRES-GFP Konstrukten (vgl. Tab. III-04), welche entweder kein (Kontrollplasmid) oder ein weiteres Gen (pSEC61-Wildtyp, pSEC61-Y344H) in der MCS (multiple Klonierungssequenz) vor der IRES-GFP-Sequenz (interne ribosomale Eintrittsstelle gefolgt von der kodierenden Sequenz für das grünfluoreszierende Protein) kodieren, eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von rund 75 - 80 %.

III.6.5 Toxinbasierende Säugerzellmanipulation

SubAB Stocklösung:

0,81 mg/ml SubAB
in PBS/50% Glycerin

SubAB Mutante Stocklösung:

0,97 mg/ml SubAB Mutante
in PBS/50% Glycerin

Die Applikation des AB₅ Zytotoxins Subtilase (s. Kapitel II.3.3.3) stellt eine weitere, einfache und direkte Methode der Zellmanipulation dar. Dabei ermöglicht die Toxinstruktur aus einer katalytischen A-Untereinheit und einem Pentamer aus regulatorischen B-Untereinheiten die Plasmamembranassoziation/-passage, den retrograden Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) und die enzymatische Spaltung des ER luminalen Chaperons BiP unabhängig von weiteren Hilfsfaktoren. Es bedarf weder einer Vorbehandlung der Zellen noch der Verwendung eines Transfektionsmediums. Die extreme Substratspezifität der Subtilase mit dem einzig bekannten Zielprotein BiP zeigt gleichzeitig aber auch den Nachteil der Methode auf. Leider ist die Säugerzellmanipulation durch dieses Toxin limitiert und nicht universell auf andere gewünschte Substrate übertragbar.

Analog zur siRNA Transfektion (s. Kapitel III.6.3) wurden HeLa-Zellen 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Die sich am Folgetag in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Zellen (etwa 80 % Konfluenz) werden durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Medium suspendiert, ausgezählt und auf eine Zellzahl von $1,3 \times 10^5$ Zellen/ml in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. 4 ml der Zellsuspension (= 520.000 Zellen) wurden in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach wurden die Zellen mit einer möglichst geringen Menge von 1,6 ml an frischem Kulturmedium überschichtet. In einer Vorverdünnung mit Kulturmedium wurde sowohl die aktive als auch die mutierte Form der Subtilase eingestellt auf eine Konzentration von 10 µg/ml. Durch Zugabe von 178 µl Vorverdünnung zu den 1,6 ml Medium pro 6 cm Schale wurde die jeweilige Toxinvariante zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Die

toxinbehandelten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die behandelten Zellen wurden entweder der semi-Permeabilisierung unterzogen für anschließende Transportstudien (s. Kapitel III.6.6.2 und III.3.2), oder aber für intrazelluläre Ca²⁺ Messungen (s. Kapitel III.6.9.4) verwendet.

Die Effektivität der AB₅ Subtilase wurde zunächst unter zeitlichen als auch konzentrationsabhängigen Aspekten ermittelt. Neben der zellmorphologischen Analyse via Durchlichtmikroskopie (s. Abb. III-03) wurde auch die Änderung/Depletion der *BIP* Expression auf Proteinebene mittels Western Blot analysiert (s. Abb. III-04).

Abbildung III-03 zeigt die morphologische Analyse von HeLa-Zellen mittels Auflichtmikroskopie nach Subtilasebehandlung. Zellen, welche für 24 h mit der höchsten getesteten Konzentration von 1 µg/ml mit der inaktiven Subtilase Mutante behandelt wurden, zeigten keinerlei Anzeichen eines Zellabsterbens oder einer morphologischen Veränderung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Wohingegen

- (i) die Behandlung mit steigenden Konzentrationen der aktiven Subtilase von 10 ng/ml bis 1 µg/ml für 2 h zu einer der Titrationsreihe entsprechenden Steigerung der Anzahl aufschwimmender, abgestorbener Zellen führte und
- (ii) die Behandlung mit einer einmaligen, niedrigen Dosis von 10 ng/ml Subtilase analog in einer mit der Inkubationsdauer ansteigenden Menge abgestorbener Zellen resultierte.

Die Analyse der BiP Proteindepletion mittels Western Blot (s. Abb. III-04) zeigte entsprechend zur morphologischen Unauffälligkeit der mit Subtilase Mutante behandelten Zellen (vgl. Abb. III-03), dass die Mutante auch 24 h nach ihrer Applikation mit 1 µg/ml keine Änderung der detektierbaren BiP Konzentration bewirkte im Vergleich zu völlig unbehandelten Zellen. Dahingegen resultiert eine steigende Konzentration der aktiven Subtilase beginnend von 100 ng/ml bis hin zu 1 µg/ml in einer immer effizienteren Proteolyse des BiP nach 2 h. Parallel mit der Reduktion des intakten BiP erhöht sich die Menge des erst mit der Subtilase Behandlung detektierbaren N-terminalen Fragmentes von BiP (BiP_N). Dieses Fragment ist weder bei unbehandelten noch bei Subtilase Mutante behandelten Zellen zu detektieren (s. Abb. III-04).

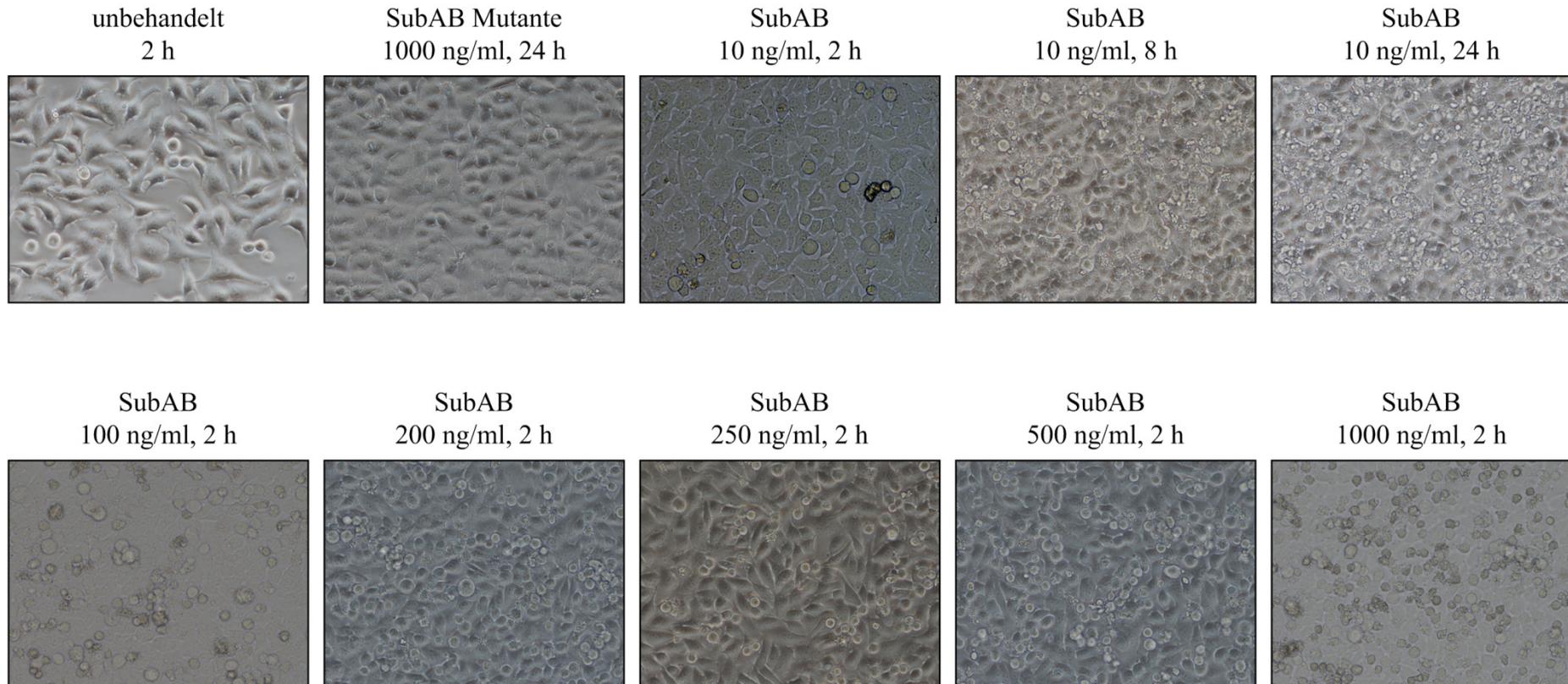


Abb. III-03: Titration und Kinetik der Behandlung von HeLa-Zellen mit aktiver und inaktiver Variante des Subtilasetoxins AB₅
3 x 10⁵ HeLa-Zellen wurden zur morphologischen Analyse mittels Auflichtmikroskopie (20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv) entweder für 2 h mit steigenden Konzentrationen von 10 ng/ml bis zu 1 µg/ml (oberes Paneel mittig und unteres Paneel) oder alternativ für längere Inkubationszeiten von 2 h bis 24 h (oberes Paneel ab Mitte) mit der aktiven Subtilase (SubAB) behandelt. Zur Kontrolle wurden neben völlig unbehandelten Zellen (oberes Paneel links) auch Zellen für die längste der getesteten Inkubationsdauern von 24 h mit der stärksten applizierten Konzentration von 1 µg/ml mittels inaktiver Subtilasevariante (SubAB Mutante) infiziert (oberes Paneel Bild 2).
Die zugehörige Western Blot Analyse zur Demonstration der Subtilaseaktivität (Spaltung des Subtilasesubstrates BiP) ist in Abb. III-04 gezeigt.

Interessanterweise reduzierte die Subtilase Behandlung in der geringen Konzentration von 10 ng/ml auch nach 24 h den Level an BiP nur marginal auf 86 %. Dennoch zeigte sich auch in diesem Fall die hohe katalytische Aktivität der Subtilase durch das mit der Zeit vermehrte Aufkommen des N-terminalen BiP Fragmentes. Dies ist ein anschauliches Beispiel für die Dynamik einer Zelle und ihrer Genexpression. Durch die stete (und möglicherweise aus kompensatorischen Gründen gesteigerte) *BIP* Expression auch in Gegenwart des aktiven Toxins genügt die Konzentration an 10 ng/ml Subtilase nicht, um alle BiP Moleküle im gegebenen Zeitraum zu fragmentieren (s. Abb. III-04). Die zelluläre BiP Synthese übersteigt die toxinvermittelte BiP Proteolyse.

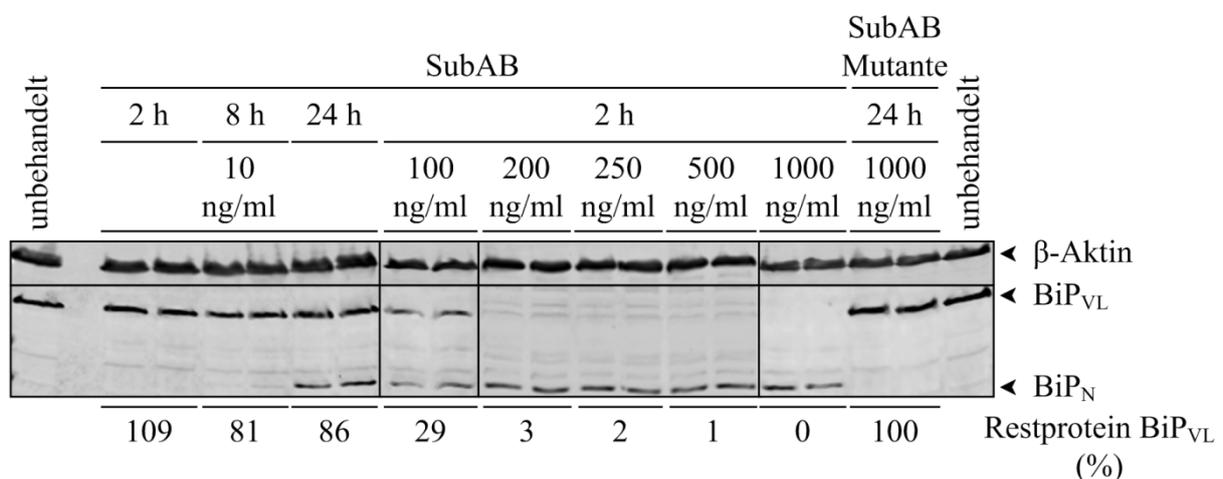


Abb. III-04: Western Blot Analyse der BiP Depletion einer Subtilasetitration/-kinetik

Jeweils in einer Doppelbestimmung aufgetragen, ist das in Lyse- und Lämmli-Puffer gekochte (10 min bei 56 °C) und mit Glasbeads geschüttelte (20 min bei 4 °C) Zellysate von 4×10^5 Zellen, welches nach SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörperdekorierung gegen β -Aktin (Ladepufferkontrolle) und BiP analysiert wurde. Vor der Zellernte wurden die Zellen wie in Abb. III-03 erläutert mit beiden Subtilasevarianten behandelt.

BiP_{VL} = intaktes, volle Länge BiP; BiP_N = N-terminales Fragment des gespaltenen BiP

III.6.6 Methoden zur Zellernte: Zellysate und semi-permeabilisierte Zellen (SPZ)

Je nach Bedarf und nachfolgender Prozedur wurden kultivierte Zellen auf zwei verschiedene Weisen geerntet. Entweder wurde aus intakten Zellen ein vollständiges Zellysate präpariert oder die Zellen wurden während der Zellernte durch einen Permeabilisierungsschritt an cytosolischen Komponenten depletiert.

III.6.6.1 Präparation von ZellysatLysepuffer (1x):

10 mM NaCl
 10 mM Tris/HCl; pH 8,0
 3 mM MgCl₂
 0,1 mM PMSF
 0,5 % Nonidet P40
 0,01 ‰ (v/v) PLAC-Lösung; pH 7,3

Lämmli-Probenpuffer (5x):

300 mM Tris/HCl; pH 6,8
 50 % (v/v) Glycerin
 10 % (w/v) SDS
 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

In Kultur befindliche Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Medium suspendiert und ausgezählt (s. Kapitel III.6.2). Durch eine dreiminütige Zentrifugation mit 4.000 rpm wurden die Zellen pelletiert und nach Absaugen des Überstands zu einer Konzentration von 25.000 Zellen/ml in Lysepuffer suspendiert. Zur Zellsuspension wurde ein Viertel des Volumens 5x Lämmli-Probenpuffer zugegeben, gefolgt von 20 - 30 Glasbeads (Konzentration 20.000 Zellen/μl). Nach 20 - 30 minütigem starken Schütteln durch den Vortex-Mixer bei 4 °C wurde das Zellysat 10 min bei 56 °C erhitzt. Gegebenenfalls wurde bei einer durch das Schütteln bedingten starken Schaumbildung das Zellhomogenat kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgetaut und wenige Sekunden zentrifugiert. Die Proben konnten dann zur SDS-PAGE verwendet werden (s. Kapitel III.2.1).

III.6.6.2 Präparation semi-permeabilisierter Zellen (SPZ)KHM-Puffer (1x):

110 mM Kaliumacetat
 2 mM Magnesiumacetat
 20 mM HEPES/KOH; pH 7,2 bei 2 °C

HEPES-Puffer (5x):

50 mM Kaliumacetat
 90 mM HEPES/KOH; pH 7,2 bei 2 °C

Trypsin-Inhibitor (Sojabohne):

50 mg/ml Trypsin-Inhibitor
 gelöst in Aqua dest.

Digitonin:

40 mg/ml Digitonin
 gelöst in Aqua dest. (erhitzen)

CaCl₂-Lösung:

200 mM Kalziumchlorid
 gelöst in Aqua dest.

EGTA-Lösung:

200 mM EGTA
 gelöst in Aqua dest.

Nuklease-Lösung:

4.000 U/ml S7 Nuklease (Mikrococcus)

gelöst in Aqua dest.

Um ein auf kultivierten Zellen basierendes Pendant zur Präparation von rauen Hundepankreasmikrosomen zu schaffen, wurde ein Protokoll nach Wilson *et al.* (1995) etabliert. In Kultur gehaltene Zellen werden durch eine Behandlung mit dem nicht-ionischen Detergenz Digitonin permeabilisiert. Dabei wird sich die hohe Affinität des verwendeten Digitonins für Cholesterin (Digitonin wird auch zur Präzipitation von Cholesterin verwendet) zu Nutze gemacht (Eilenberg *et al.* 1989). Auf Grund der heterogenen Verteilung von Cholesterin innerhalb des Membransystems einer Säugerzelle permeabilisiert Digitonin hauptsächlich die cholesterinreiche Plasmamembran, wohingegen die nahezu cholesterinfreie Lipiddoppelschicht des endoplasmatischen Retikulums (ER) intakt bleibt. Die durch die Digitoninbehandlung entstandenen semi-intakten oder auch semi-permeabilisierten Zellen (SPZ) sind durch mehrere Waschschrte frei an Cytosol und beinhalten im Idealfall, neben anderen Zellorganellen, intaktes und völlig funktionales ER. Ein Nukleaseverdau degradiert verbleibende, störende endogene Nukleinsäuren, wie z.B. mRNA. Im Zusammenwirken der SPZ mit dem für die *in vitro* Synthese verwendeten Kaninchen-Retikulozytenlysat (s. Kapitel III.3), welches letztlich Cytosol repräsentiert, lässt sich so ein zur Proteinsynthese, Proteinmodifikation und Proteintranslokation befähigtes System rekonstituieren. Somit ergibt sich durch Verwendung der SPZ die Möglichkeit analog zu Transportstudien von Vorläufer-substraten in Mikrosomen den Proteintransport in das ER zu analysieren.

Der große Vorteil der SPZ gegenüber rauen Mikrosomen liegt in der simplen und effizienten siRNA/Plasmid vermittelten Manipulationsmöglichkeit (vgl. Kapitel III.6.3 - III.6.5).

Die in einer 6 cm Zellkulturschale kultivierten/manipulierten Zellen wurden mit 4 ml PBS gewaschen und für 3 Minuten mit 300 µl Trypsin-Lösung bei RT inkubiert. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 2 ml eiskaltem KHM-Puffer mit 125 µg/ml Trypsin-Inhibitor gestoppt. Nach Überführen der suspendierten Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen wurde zunächst deren Zellzahl bestimmt; gefolgt von einer 3 minütigen Zentrifugation bei 4 °C mit 2.000 rpm in der Beckman-Zentrifuge GS-6KR, Rotor GH-3.8. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 6 ml eiskaltem KHM-Puffer suspendiert. Eine Abänderung zur 1995 von Wilson *et al.* publizierten Prozedur erfolgte bei der Digitoninzugabe. Um die Digitoninkonzentration den unterschiedlichen Zellzahlen, und somit deren unterschiedlichen Mengen an Membranen, verschiedener Ansätze anzupassen,

wurde die Digitoninstocklösung von 40 mg/ml nicht in einer festen Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben, sondern es erfolgte eine zellzahlabhängige Zugabe von 1 µl Digitonin pro 1×10^6 Zellen. Der Ansatz wurde zur Permeabilisierung 5 min auf Eis inkubiert, danach auf 14 ml mit eiskaltem KHM-Puffer aufgefüllt und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand (Cytosol) wurde verworfen und das Zellpellet (Membranorganellen) in 14 ml eiskaltem HEPES-Puffer suspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut wie zu Beginn zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl KHM-Puffer in Suspension gebracht, mit 0,5 µl CaCl_2 und 1 µl 4.000 U/ml Nuklease S7 versetzt und für 12 min bei RT inkubiert zur Degradation endogener Nukleinsäuren. Durch Zugabe von 2 µl EGTA-Lösung wird die Ca^{2+} -abhängige Nuklease inaktiviert. Nach Zentrifugation für 3 min bei 4 °C mit 2.000 rpm wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet in 1,5 ml eiskaltem KHM-Puffer suspendiert und nochmals deren Zellzahl bestimmt (6-fach Bestimmung). Gleichzeitig wurde durch die Färbung mit Trypanblau die Effizienz der Permeabilisierungsprozedur geprüft. Nahezu alle Zellen sollten bei Betrachtung im Mikroskop durch Trypanblau gefärbt sein. Abschließend wurde der Ansatz wie zuvor zentrifugiert, das Pellet in KHM-Puffer suspendiert, so dass sich eine Zelldichte von 40.000 Zellen/µl ergab und diese Suspension an SPZ in ein 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt. Diese Zellen konnten entweder einem *in vitro* Translationsansatz zugesetzt werden (s. Kapitel III.3.2 und III.3.3) oder auch nach Zugabe von Lämmli-Probenpuffer mittels SDS-PAGE und Western Blot (s. Kapitel III.2.1 und III.2.4) analysiert werden. Darüber hinaus bieten SPZ den Vorteil, dass durch den während der Präparation erfolgten Fraktionierungsschritt cytosolische Bestandteile weggewaschen werden. Der dadurch reduzierte Proteingehalt der Lösung erlaubt bei einigen stark kreuzreaktiven Antikörpern eine bessere Detektion im Zuge der Western Blot Analyse.

III.6.7 Echtzeit Zellanalyse (xCELLigence RTCA)

Die kontinuierliche Bestimmung der Zellwachstumskinetik adhärenter Zellen erfolgte mit Hilfe des „xCELLigence Real Time Cell Analyzer“ (xCELLigence RTCA SP) der Firma Roche. Das zu Grunde liegende Messprinzip beruht auf der fortlaufenden Aufzeichnung der Impedanz, also des durch die Zellen erzeugten Widerstandes und wird als dimensionsloser Parameter des Zellindexes gegen die Zeit aufgetragen. Die Detektion der Impedanz erfolgt durch die im Boden einer sogenannten E-Plate eingearbeiteten Goldelektroden, welche etwa 80 % der Bodenfläche jeder Kavität bedecken. Die Gegenwart adhärenter Zellen an der Elektrode beeinflusst das ionische Milieu nahe der Elektrode-Medium-Grenzfläche und führt

zu einer Änderung der messbaren Impedanz. Eine Erhöhung der Zellkonfluenz entweder durch Zellvermehrung oder Zellwachstum einzelner Zellen auf der Elektrode erhöht die gemessene Impedanz bzw. den Zellindex, was direkte Rückschlüsse auf biologisch relevante Faktoren wie Zellzahl, -viabilität und -morphologie erlaubt.

Der Vorteil dieser Sensortechnologie beruht neben der Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Systems auf der manipulations- und markierungsfreien Bestimmung einer Zellkinetik (im Brutschrank), d.h. man ist nicht auf eine festgelegte Endpunktbestimmung angewiesen.

Innerhalb dieser Arbeit wurde mit Hilfe des xCELLigence RTCA SP die Zytotoxizität des AB₅ Toxins Subtilase (s. Kapitel III.6.5) für drei verschiedene Zelllinien (HeLa, HEK-293 und PC3) bestimmt.

Wie bei einer siRNA Transfektion (s. Kapitel III.6.3) wurden HeLa-Zellen auch für diesen Zweck am Vortag des Experiments 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert, damit sie am Folgetag in der logarithmischen Wachstumsphase vorliegen (Konfluenz ≈ 80 %). Nach einer Initialmessung der E-Plate mit 50 µl Medium pro Kavität, wurden jeweils 10.000 Zellen in 100 µl pro Kavität der 96-Well E-Plate zugegeben, für 24 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert und dann einmalig mit der aktiven oder inaktiven Form der Subtilase behandelt bzw. einer Mediumkontrolle. Die in Kulturmedium verdünnte, aktive Form der Subtilase (SubAB) wurde in einer finalen Konzentration von 10, 100 bzw. 1.000 ng/ml zu den entsprechenden Kavitäten zugegeben. Zellen die mit der inaktiven Variante des Toxins (SubAB Mutante) behandelt wurden, erhielten lediglich eine Applikation mit der höchsten Konzentration von 1000 ng/ml zur Kontrolle. Das Messintervall für den Zeitraum von 0 h bis 24 h betrug 15 min und das Zeitfenster von 24 h bis 144 h wurde in 10 min Intervallen analysiert. Mit Ausnahme der unbehandelten Zellen erfolgten die Messungen als Triplikat.

III.6.8 „Pulse-chase“ Experimente in Kombination mit Proteinsyntheseinhibitoren

Puromycin:

12,5 mM Puromycin
gelöst in Aqua dest.

Cycloheximid:

8,875 mM Cycloheximid
gelöst in Aqua dest.

Emetin:

100 mM Emetin
gelöst in Aqua dest.

Die in der Naturwissenschaft als „pulse-chase“ Experiment bezeichnete Analyseverfahren beruht auf der (kinetischen) Verfolgung einer Isotop markierten Substanz, vorrangig von Proteinen. Durch die metabolische Markierung, in diesem Fall durch die radioaktiven Isotope [³⁵S]-Methionin und Cystein, lässt sich die Biologie eines bzw. aller markierten Entitäten im zellulären Kontext beobachten und verfolgen. Die Methode ermöglicht dem Experimentator sowohl die Untersuchung von Reifungs-, Sezernierungs- und Lokalisierungsprozessen als auch die Bestimmung der Lebensdauer einzelner Proteine oder Moleküle (Mechler & Vassalli 1975; Biermann *et al.* 2002).

Im Zuge dieser Arbeit wurden „pulse-chase“ Experimente zur Bestimmung der Effektivität verschiedener Proteinsyntheseinhibitoren (PSI) verwendet. Es wurde die Blockade der zellulären Proteinsynthese durch die Antibiotika Puromycin, Cycloheximid und Emetin analysiert.

Wie vor einer siRNA Transfektion (s. Kapitel III.6.3) wurden HeLa-Zellen 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Die sich am Folgetag in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Zellen (etwa 80 % Konfluenz) wurden durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Medium suspendiert, ausgezählt und auf eine Zellzahl von $1,33 \times 10^5$ Zellen/ml in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. 1,2 ml der Zellsuspension (= 160.000 Zellen) wurden in einer Kavität einer 12 well Zellkultur-Multiwell-Platte ausgesät und 24 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit 1,5 ml PBS gewaschen und zur Deprivation für 30 min bei 37 °C mit 5 % CO₂ in 1 ml Cystein und Methionin freiem Medium ohne FCS kultiviert. Nach Zugabe der PSI Puromycin (500 µM), Cycloheximid (355 µM) oder Emetin (100 µM) für 1 min, 2 min, 5 min und 20 min wurde der Kulturüberstand verworfen und durch 1 ml radioaktives Kulturmedium (Cystein und Methionin freies Medium mit 100 µCi/ml [³⁵S]-Methionin und Cystein) ersetzt. Der Puls durch das radioaktive Kulturmedium erfolgte für 20 min, gefolgt von einem zwanzigminütigem „chase“, erzeugt durch die Zugabe von 100 µl FCS. Durch den im FCS enthaltenen Überschuss an nicht-radioaktivem Cystein und Methionin werden beide [³⁵S]-Isotope stark verdünnt. Alle Schritte ab Zugabe der PSI erfolgten bei RT.

Abschließend erfolgte die Zellernte durch Präparation von Zelllysate (s. Kapitel III.6.6.1), welches mittels SDS-PAGE (s. Kapitel III.2.1) aufgetrennt wurde und im Anschluss an die Coomassiefärbung mit zugehöriger Geldokumentation (s. Kapitel III.2.3) der Autoradiographie mittels „Phosphorimaging“ (s. Kapitel III.2.6) zugeführt wurde.

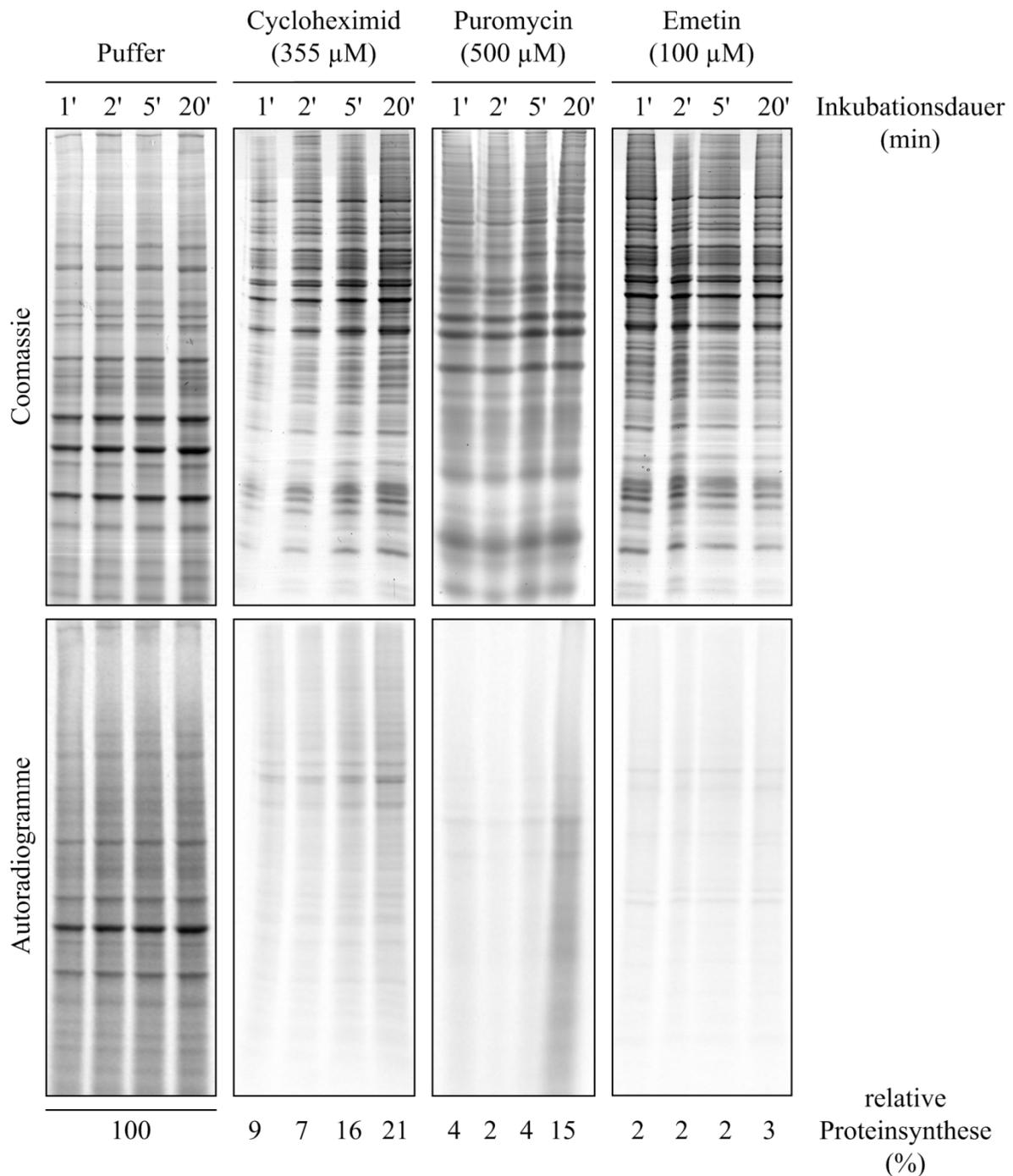
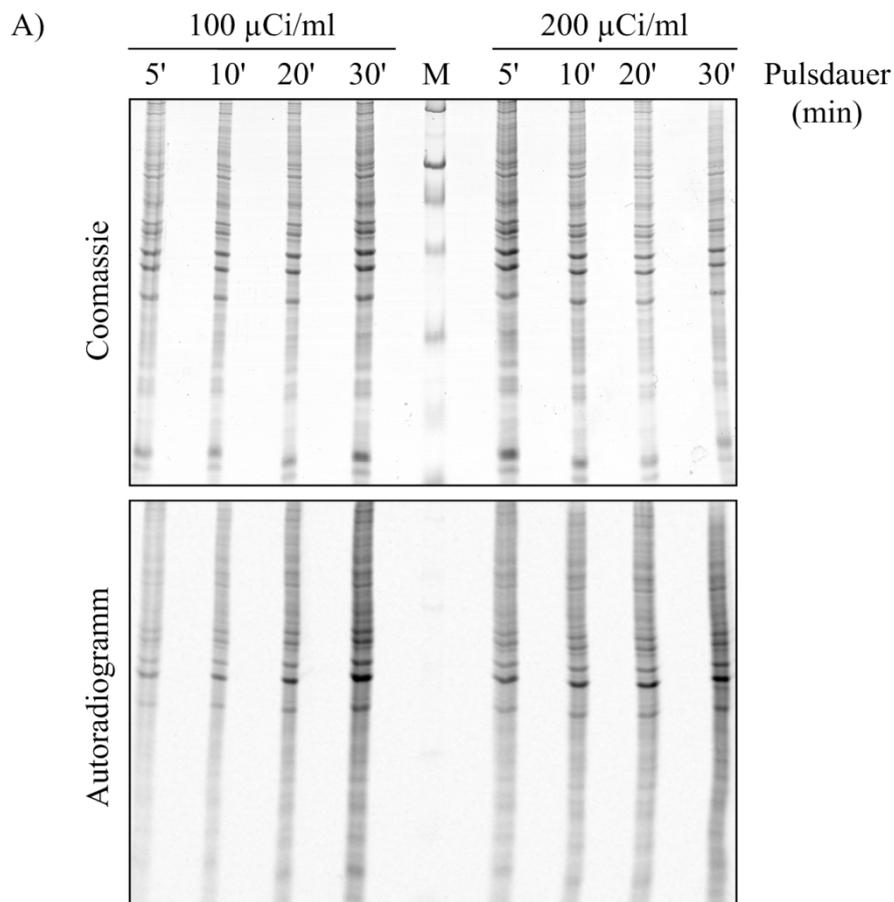


Abb. III-05: Analyse der Proteinsyntheseinhibitoraktivitäten durch „pulse-chase“ Experimente
 Gezeigt sind die in Lyse- und Lämmli-Puffer gekochten (10 min bei 56 °C) und mit Glasbeads geschüttelten (20 min bei 4 °C) Zellysate von 8×10^4 Zellen, welche nach SDS-PAGE mittels Coomassiefärbung (Coomassie) und anschließendem „Phosphorimaging“ (Autoradiogramme) analysiert wurden. Vor der Zellernte wurden die Zellen nach erfolgter Deprivation von 30 min in Cys/Met freiem Medium ohne FCS für 1 - 20 min mit einem Proteinsyntheseinhibitor (Cycloheximid, Puromycin oder Emetin) oder einer Pufferkontrolle behandelt und für 20 min einem Puls an 100 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S]-Methionin und Cystein ausgesetzt. Nach dem sich anschließenden „chase“ (20 min) durch Zugabe von FCS wurde das Zellysat präpariert. Unter jeder Spur ist die verbleibende relative Proteinsynthese (relativer Quotient aus Autoradiogrammsignal und Coomassiefärbung angeglichen auf die gemittelten Pufferspuren) nach entsprechender Inkubationsdauer gezeigt.

Alle drei Proteinsyntheseinhibitoren (s. Abb. III-05) zeigen in den verwendeten Konzentrationen eine effiziente Reduktion der Proteinsynthese. Für die beiden aus Streptomyceten stammenden Elongationshemmer Cycloheximid und Puromycin scheint die Blockade der Proteinsynthese reversibel, mit einer maximalen Repression 2 min nach Applikation. Dahingegen zeigt der Initiationshemmer Emetin im Zeitraum bis 20 min nach Zugabe keine Reversibilität bei fortwährender, effektiver Reduktion der Proteinsynthese.

Zur Ermittlung der für das beschriebene „pulse-chase“ Experiment geeigneten Pulsdauer und notwendigen Menge an Radioaktivität zur Markierung synthetisierter Proteine, musste zuvor ein analoges Experiment mit variabler Pulsdauer und -intensität durchgeführt werden. Nach der 30 Minuten dauernden Deprivation in 1 ml Cystein und Methionin freiem Medium ohne FCS wurde der Kulturüberstand verworfen und die Zellen für 5 min, 10 min, 20 min und 30 min einem Puls mit 100 $\mu\text{Ci/ml}$ oder 200 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S]-Methionin und Cystein ausgesetzt. Nach einem konstanten „chase“ von 20 min wurden die Zellen wie zuvor zur SDS-PAGE, Coomassiefärbung und Autoradiographie aufgearbeitet (s. Abb. III-06).



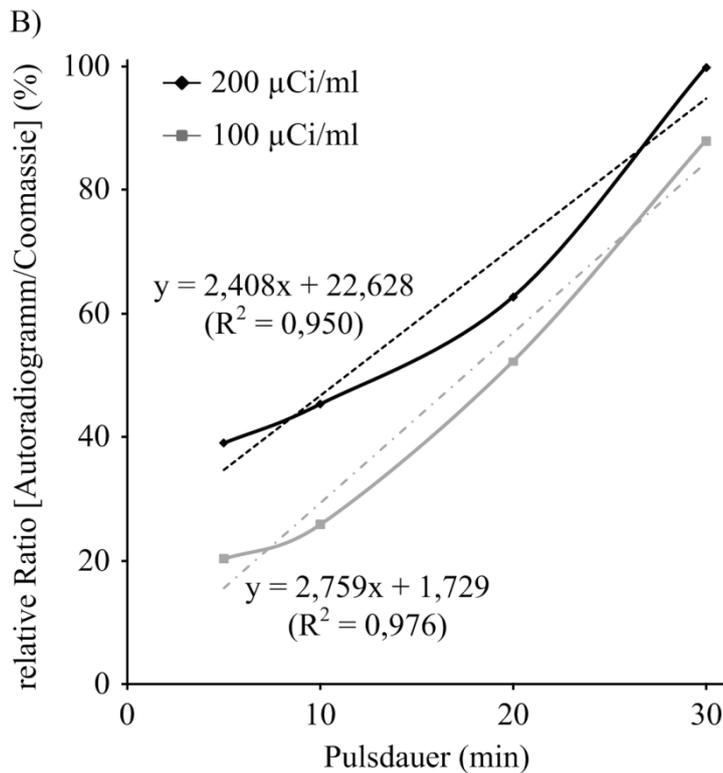


Abb. III-06: Bestimmung der optimalen Pulsintensität und -dauer für „pulse-chase“ Experimente

(A) Die Zellysatpräparation und -analyse erfolgte wie zuvor in Abb. III-05 beschrieben. Vor der Zellernte wurden die Zellen nach erfolgter Deprivation von 30 min in Cys/Met freiem Medium ohne FCS für 5 - 30 min einem Puls mit 100 oder 200 µCi/ml [³⁵S]-Methionin und Cystein ausgesetzt. Nach dem sich anschließenden „chase“ von 20 min durch Zugabe von FCS wurde das Zellysat präpariert. (B) Dargestellt ist die graphische Auftragung der radioaktiven Markierung (Quotient aus Autoradiogrammsignal und Coomassiefärbung) mit 100 und 200 µCi/ml korreliert gegen die Pulsdauer. Die in Excel ermittelten linearen Regressionsgeraden (gestrichelt) sind inklusive ihrer zugehörigen Funktionsgleichung angegeben.

Die vorhergehende Abbildung III-06 gibt zu erkennen, dass bei Durchführung der radioaktiven Markierung mit 100 µCi/ml [³⁵S]-Methionin und Cystein und einer Pulsdauer von 20 min die detektierbare Signalstärke nach „Phosphorimaging“ einerseits ausreichend ist (Teil A) und sich andererseits, wie Teil B der Abbildung illustriert, noch im linearen Bereich der Proteinmarkierung bewegt. Somit war die 20 minütige Markierung mit 100 µCi/ml Radioaktivität, welche in Abbildung III-05 verwendet wurde, zum Testen der Effektivität der Proteinsyntheseinhibitoren völlig ausreichend.

III.6.9 Fluoreszenzbasierende Methoden der Zellanalyse

Im Verlauf dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche auf dem Prinzip der Fluoreszenz beruhende Methoden zur Zellanalyse angewendet. Diese umfassten:

- (i) die Auswertung der Plasmidtransfektionseffizienz an Hand der *GFP* Expression
- (ii) die Bestimmung der Zellviabilität (und Zellzahl) durch das Nuclear-ID™ Reagenz
- (iii) die Beobachtung der Zytoskelettmorphologie mit Hilfe von FITC-Phalloidin
- (iv) die Untersuchung der ER-Morphologie mittels Immunfluoreszenz gegen Sec62
- (v) die kinetische Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase via Fura-2

Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission von Licht, welche beim Übergang eines zuvor angeregten Systems/Moleküls zurück in seinen Grundzustand bzw. einen Zustand niedrigerer Energie erfolgt. Fluorophore bzw. Fluorochrome beinhalten (i. d. R.) konjugierte Doppelbindungen deren delokalisierte π -Elektronen leicht durch absorbierte Photonen auf ein energetisch höheres Orbitalniveau angehoben und somit angeregt werden können. Beim Transfer der angeregten Elektronen auf ein niedrigeres oder ihr ursprüngliches Orbital wird die freiwerdende Energie in Form von Wärme und Photonen (Fluoreszenzlicht) abgegeben.

Alle fünf oben genannten Methoden bedürfen zur notwendigen Auflösung der jeweiligen Prozesse auf zellulärer Ebene der Verwendung eines passenden Fluoreszenzmikroskops inklusiver geeigneter Filtersets.

Für die unter (i) bis (iv) genannten Methoden wurde das Nikon Eclipse TE 2000-S Mikroskop verwendet. Das zugehörige Filterset umfasste folgende Filter:

<u>Filter</u>	<u>Anregung</u>	<u>dichroische Trennung</u>	<u>Emission</u>
DAPI	340 - 380 nm	400 nm	435 - 485 nm
GFP	465 - 495 nm	505 nm	515 - 555 nm
TRITC	528 - 552 nm	565 nm	582 - 627 nm
TexR	540 - 580 nm	595 nm	600 - 660 nm

Als Objektive standen das Nikon Plan Fluor 10x/0,3 sowie das Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0,45 zur Verfügung. Die digitale Auswertung erfolgte mit Hilfe der NIS Elements AR 3.0 Software.

Zur Analyse der Ca^{2+} -Homöostase (v) wurde das mit freundlicher Genehmigung von Professor Adolfo Cavalié (Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellte iMIC Fluoreszenzmikroskop der Firma TILL photonics in Kombination mit dem Monochromator Polychrome V verwendet. Das im iMIC Mikroskop integrierte Fura-2 Filterset beinhaltet die Komponenten DCLP410 und LP470. Es wurde das Fluor 20x/0,75 M27 Objektiv der Firma Zeiss verwendet. Die Analyse, digitale Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe der TILLvisION Version 4.5 Software und Microsoft Excel 2007 oder OriginPro 8.5G.

III.6.9.1 Bestimmung der Zellviabilität durch das Nuclear-ID™ Reagenz

Nuclear-ID Lösung:

1 µl Nucelar-ID™ reagent (1 mM)

verdünnt in 1 ml PBS

Das Nuclear-ID™ Reagenz bietet eine attraktive Möglichkeit zur Bestimmung der Zellviabilität. Das Reagenz stellt eine Mischung zweier verschiedener Fluorophore dar: ein blaufluoreszierender, *zellpermeabler* Nukleinsäurefarbstoff und ein grünfluoreszierender, *zellimpermeabler* Nukleinsäurefarbstoff. Der blaue Farbstoff färbt ungeachtet der Viabilität der analysierten Zellpopulation alle Nuklei, wohingegen der grüne Farbstoff lediglich Nuklei toter, genauer gesagt plasmamembranpermeabler, Zellen färbt. Die Ratio aus grün- und blaugefärbten Zellen erlaubt den Rückschluss auf die Viabilität der mikroskopierten Zellen.

Einen Tag vor der Behandlung wurden HeLa-Zellen 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Am Folgetag wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Kulturmedium suspendiert, ausgezählt und auf eine Zellzahl von $1,33 \times 10^5$ Zellen/ml in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. Zuvor wurde in einer 6 cm Zellkulturschale ein steriles 25 mm Deckglas ausgelegt und für die Dauer von 1 h mit 200 µl Poly-L-Lysin beschichtet. Das Deckglas wurde im Anschluss mit sterilem Aqua dest. oder PBS abgespült. Nach Aussäen und Manipulation von 520.000 Zellen (z.B. durch siRNA) wurde das Deckglas zum gewünschten Zeitpunkt in eine 3,5 cm Zellkulturschale transferiert und nach Zugabe von 1 ml Nuclear-ID Lösung (1 µM) für 30 min bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung und dem einmaligen Waschen der Zellen mit 2 ml PBS wurde das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt und mit Hilfe des Nikon Eclipse TE 2000-S sowohl im Hellfeld (Durchlicht) als auch mittels DAPI- und GFP-Filter mikroskopiert.

III.6.9.2 Beobachtung der Aktinmorphologie mit Hilfe von FITC-Phalloidin

FITC-Phalloidin Lösung (1:25):

60 µl FITC-Phalloidin

1,5 ml PBS⁺ Lösung

Mowiol 4-88 / n-Propylgallat:

s. Vorschrift des Herstellers

PBS⁺ Lösung:

58 mM Na₂HPO₄

17 mM NaH₂PO₄

83 mM NaCl

pH 7,4

<u>Stopplösung:</u>	<u>PSS-Lösung:</u>
PBS ⁺ Lösung	PBS ⁺ Lösung
100 mM Glycin	5,0 % (v/v) FCS
4 mM MgCl ₂	0,1 % (v/v) Saponin

Bei der FITC-Phalloidininfärbung macht man sich die chemischen Eigenschaften des Toxins Phalloidin zu Nutze. Das bizyklische Alkaloid des Grünen Knollenblätterpilzes, besitzt eine hohe Affinität an filamentöses Aktin (F-Aktin). Nach Bindung des Phalloidins an F-Aktin in stöchiometrischen Verhältnissen inhibiert es dessen ATP Hydrolyse und damit die Depolymerisation. Allerdings muss auf Grund der Zellimpermeabilität des Phalloidins zunächst das Zytoplasma einer Zelle durch eine entsprechende Permeabilisierung für Phalloidin zugänglich gemacht werden.

Einen Tag vor der Behandlung wurden HeLa-Zellen 1:2 in einer 75 cm² Zellkulturflasche passagiert. Am Folgetag wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst, in frischem Kulturmedium suspendiert, ausgezählt und auf eine Zellzahl von $1,33 \times 10^5$ Zellen/ml in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen verdünnt. Zuvor wurde in einer 6 cm Zellkulturschale ein steriles 25 mm Deckglas ausgelegt und für die Dauer von 1 h mit 200 µl Poly-L-Lysin beschichtet. Das Deckglas wurde im Anschluss mit sterilem Aqua dest. oder PBS abgespült. Nach Aussäen und Manipulation von 520.000 Zellen (z.B. durch siRNA) wurde das Deckglas nach 96 h in eine 3,5 cm Zellkulturschale transferiert und mit 2 ml PBS⁺ gewaschen. Die anschließende Zellfixation mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS⁺) erfolgte lichtgeschützt für 20 min bei 4 °C. Zum Abstoppen der Fixation wurden fixierte Zellen 3 min mit 2 ml Stopplösung gewaschen und weitere zweimal mit PBS⁺ Lösung. Die nachfolgende Zellpermeabilisierung mit Saponin erfolgte für die Dauer von 1 h, lichtgeschützt bei 4 °C durch Zugabe von 2 ml frischer PSS-Lösung. Die PSS-Lösung wurde durch 1,5 ml FITC-Phalloidin Lösung ersetzt und der Ansatz lichtgeschützt für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 2 ml PBS⁺ Lösung à 5 min erfolgte eine zusätzliche Kernfärbung mittels DAPI. Dazu wurde das Präparat im Dunkeln für 5 min bei RT mit DAPI (1:1.000 in PBS⁺ Lösung verdünnt) gefärbt, gefolgt von drei weiteren Waschschritten wie zuvor.

Abschließend wurde das Präparat eingebettet. Dazu wurde das angetrocknete Deckglas mit der Zellseite nach unten zeigend auf einen zuvor T-förmig mit 15 µl Mowiol4-88/n-Propylgallat präparierten Objektträger aufgelegt. Das Deckglas wurde peripher durch zwei Punkte Nagellack fixiert, lichtgeschützt für 30 min bei RT getrocknet und dann am Fluoreszenzmikroskop mittels DAPI- sowie GFP-Filter mikroskopiert.

III.6.9.3 Untersuchung der ER-Morphologie mittels Immunfluoreszenz

Primäre Antikörperlösung:

10 µl Sec62-Antikörper (affinitätsgereinigt)
in 1 ml PSS (s. III.6.9.2.)

Sekundäre Antikörperlösung:

1 µl Alexa Fluor[®] 594 α-Kaninchen IgG
in 1 ml PSS

Zur Untersuchung der ER-Morphologie in Abhängigkeit einer gegebenen Zellmanipulation wurde eine Immunfluoreszenz gegen das ER Membranprotein Sec62 durchgeführt.

Wie bereits unter Punkt III.6.9.2 (2. Abschnitt) beschrieben, wurden die Zellen auf einem Poly-L-Lysin beschichtetem Deckglas ausgesät, entsprechend manipuliert und nach 96 h fixiert. Nach der Permeabilisierung durch Saponin erfolgte die einstündige, lichtgeschützte Inkubation mit 1 ml primärer Antikörperlösung (α-Sec62). Nach drei Waschschrritten mit PSS à 2 ml wurde das Präparat lichtgeschützt für 1 h mit 1 ml der sekundären Antikörperlösung (α-Kaninchen Alexa 594) inkubiert. Zu diesem Volumen wurde 1 ml einer DAPI-Lösung (1:500 in PBS⁺ Lösung verdünnt) hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert (lichtgeschützt), gefolgt von drei weiteren Waschschrritten mit je 2 ml PBS⁺ Lösung à 5 min. Abschließend wurde das Deckglas wie unter III.6.9.2 auf einem Objektträger eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop mittels DAPI- sowie TexR-Filter mikroskopiert.

III.6.9.4 Analyse der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase (Ca²⁺-„imaging“)

Ca²⁺-freier Puffer:

140 mM NaCl
5 mM KCl
1 mM MgCl₂
10 mM Glukose
0,5 mM EGTA
10 mM HEPES/KOH
pH 7,35

Ca²⁺-Lösung:

140 mM NaCl
5 mM KCl
1 mM MgCl₂
10 mM Glukose
10 mM CaCl₂
10 mM HEPES/KOH
pH 7,35

Fura-2 AM Lösung:

4 µM Fura-2 AM
in Kulturmedium

Die kinetische Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Verteilung und der zugehörigen Ca^{2+} -Homöostase erfolgt durch ein Abbildungssystem zur Darstellung der Änderungen von Ca^{2+} -Konzentrationen, im Folgenden als Ca^{2+} -„imaging“ bezeichnet. Mittels Ca^{2+} -„imaging“ lassen sich sowohl Ca^{2+} -Fluktuationen beziehungsweise – nach entsprechender Kalibrierung – quantitative Ca^{2+} -Konzentrationen eines Gewebes, einer Zelle oder eines Mediums bestimmen. Da Ca^{2+} -Ionen selbst nicht direkt sichtbar gemacht werden können, greift man auf sogenannte Ca^{2+} -Indikatorsubstanzen zurück. Neben den seltener verwendeten genetisch kodierten Ca^{2+} -Indikatoren stellen chemische Indikatoren eine zweite Klasse dar. Im Verlauf dieser Arbeit wurden alle Analysen der Ca^{2+} -Homöostase mit Hilfe des chemischen Ca^{2+} -Indikators Fura-2 durchgeführt. Dieses bereits 1985 von Roger Tsien etablierte Molekül ist ein Derivat des bekannten Ca^{2+} -Chelators BAPTA (Grynkiewicz *et al.* 1985). Der besondere Vorteil des Fura-2 liegt in seinen spektroskopischen Eigenheiten. Nach Chelation eines Ca^{2+} -Ions erfährt das Fura-2 Fluoreszenzanregungsmaximum eine Blauverschiebung von 362nm (Ca^{2+} -frei) zu 340 nm (Ca^{2+} -gesättigt), während die Fluoreszenzemission weiterhin bei 510 nm erfolgt. Dies verleiht Fura-2 die Eigenschaft eines ratiometrischen Ca^{2+} -Sensors. D.h. bei sich erhöhenden Ca^{2+} -Konzentrationen steigt die Fluoreszenzemission nach Anregung mit 340 nm an, wohingegen sich die Fluoreszenzintensität bei Anregung durch 380 nm verringert. Der Quotient (= Ratio, R) der Emissionen (510 nm) nach Anregung mit 340 nm und 380 nm repräsentiert eine lediglich von der freien Ca^{2+} -Konzentration abhängige Messgröße. Weitere, die Fluoreszenzintensität oder -emission beeinflussende Faktoren, wie Konzentration des Farbstoffes, Ausbleichen des Farbstoffes, Dicke der Zelle und optische Eigenschaften der Messapparatur werden durch die Division der beiden Intensitäten eliminiert. Darüber hinaus eignet sich die hohe Ca^{2+} -Affinität des Fura-2 ($K_D \approx 220$ nM) ideal um cytosolische Ca^{2+} -Änderungen zu vermessen, welche in Größenordnungen von etwa 50 - 1.000 nM erwartet werden. Da allerdings die Ca^{2+} -Affinität des Fura-2 Moleküls auf vier negativ geladenen Carboxylgruppen basiert, muss zur Beladung intakter Zellen, das Derivat Fura-2 AM verwendet werden. Auf Grund der angefügten maskierenden Seitengruppen vermag Fura-2 AM effizient die Plasmamembran zu passieren. Intrazellulär werden diese Acetomethylesterseitengruppen durch ubiquitär vorhandene Esterasen abgespalten, wodurch „aktives“ Fura-2 freigesetzt wird und innerhalb der Zelle verbleibt.

Wie zuvor unter III.6.9.1 (2. Abschnitt) beschrieben wurden HeLa-Zellen passagiert, auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas ausgesät, entsprechend manipuliert und zum gewünschten Zeitpunkt in eine 3,5 cm Zellkulturschale transferiert, worin die Zellen durch Zugabe von 1 ml Fura-2 AM Lösung (4 μM) für 45 min bei RT mit dem Ca^{2+} -Indikator beladen wurden. Nach zweimaligem waschen der Zellen mit 300 μl Ca^{2+} -freiem Puffer,

wurde das bewachsene Deckglas in die ringförmige, bodenlose Metallkammer eingedreht, mit 300 μl Ca^{2+} -freiem Puffer überschichtet und in die Halterung im Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt. Alle durchgeführten Messungen verliefen entsprechend des nachfolgend illustrierten Schemas:

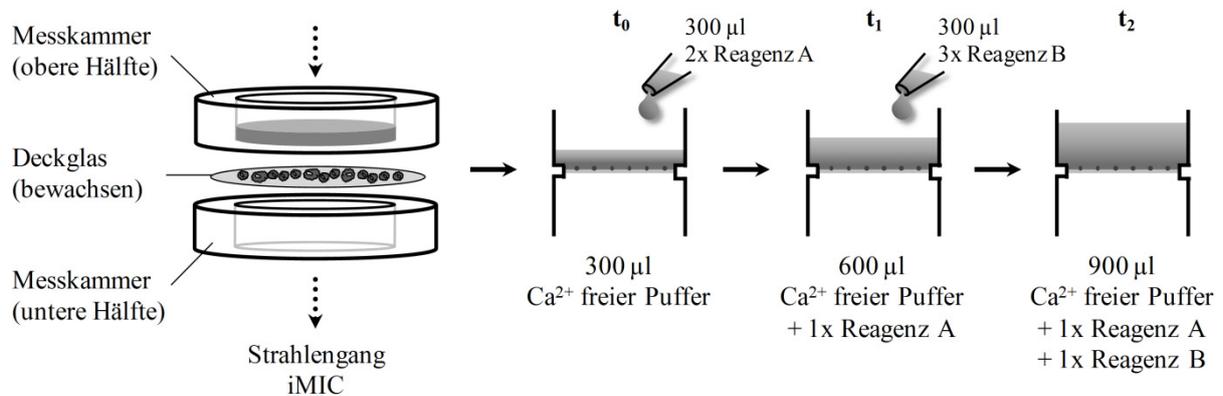


Abb. III-07: Vereinfachtes Perfusionsschema eines Ca^{2+} -„imaging“ Experiments

Links ist der Aufbau der im iMIC eingespannten Metallkammer inklusive eingedrehtem Deckglas als Explosionsansicht schematisch illustriert. Die nachfolgenden Querschnitte rechts davon zeigen distinkte Zeitpunkte ($t_0 - t_2$) mit möglichen Applikationen eines doppelt oder dreifach konzentrierten Reagenz während eines stilisierten Ca^{2+} -„imaging“ Experiments. (Die durch Zugabe von 300 μl 3x ReagenzB erfolgende Verdünnung von ReagenzA wurde, wie unter t_1 gezeigt, vernachlässigt)

Alle in der Arbeit durchgeführten Ca^{2+} -„imaging“ Experimente lassen sich in fünf Kategorien unterteilen, deren weitere Durchführung nach Einspannen der Messkammer nachfolgend im Einzelnen beschrieben wird. Generell wurden alle Fura-2 Signale als F340/F380 Ratios aufgezeichnet, wobei F340 bzw. F380 den hintergrundkorrigierten Fluoreszenzemissionen bei 510 nm entsprechen, gemessen nach der im sehr kurzen zeitlichen Abstand alternierenden Anregung bei 340 nm und 380 nm. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Bildaufzeichnungsrate mit einer Frequenz von $\frac{1}{3}$ Hz (ein Bild alle drei Sekunden) pro Anregungskanal.

A) Proteinsyntheseinhibitor-Experimente (Puromycin)

Eine Minute nach Beginn der ratiometrischen Messung wurden Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer zunächst für 2 min mit Puromycin (Endkonzentration 500 μM) behandelt. Zellen eines zugehörigen Kontroll-experiments erhielten für die gleiche Dauer lediglich Ca^{2+} -freien Puffer. Daran anknüpfend erfolgte die Applikation des im gleichen Puffer verdünnten Thapsigargin (Endkonzentration 1 μM) bis zum Ende der Messung nach 12,5 min.

Zur Bestimmung einer effektiven Puromycinkonzentration, welche Einfluss auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase nehmen kann, wurde diese mittels einer Titrationsreihe und simplen Kinetik ermittelt. Das Resultat ist in der nachfolgenden Abbildung III-08 illustriert. Alle getesteten Puromycinkonzentrationen von 250 μM bis 1 mM führen bereits nach einer kurzen Einwirkzeit von 2 oder 4 min zu einer Erniedrigung des durch Thapsigargin freisetzbaren ER luminalen Kalziums im Vergleich zur Pufferkontrolle (s. Abb. III-08 Teil A). Das gleiche Bild vermittelt auch die statistische Analyse in Teil B der zugehörigen Abbildung. So sind alle getesteten Puromycinkonzentrationen in der Lage signifikanten Einfluss auf den Ca^{2+} -Leckstrom zu nehmen. Zugehörige „pulse-chase“ Experimente (vgl. Abb. III-05) zeigten, dass Puromycin zu diesen Zeitpunkten bereits effizient die ribosomale Proteinsynthese reduzierte. Daher wurde für alle im Ergebnisteil gezeigten Messungen in Zusammenhang mit Puromycin eine Konzentration von 500 μM mit einer Wirkdauer von 2 min vor der sich anschließenden Applikation gewählt.

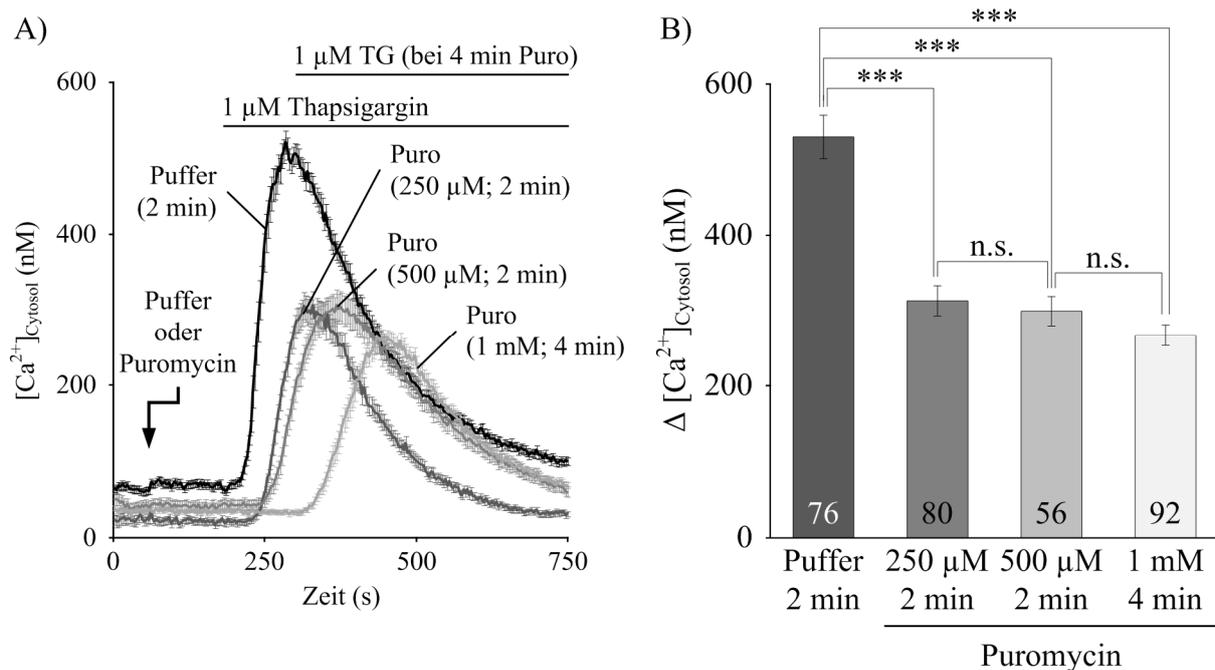


Abb. III-08: Einfluss der Puromycinkonzentration und Wirkdauer auf die Ca^{2+} -Homöostase

(A) Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden für 45 min bei RT mit 4 μM Fura-2 AM inkubiert. Beladene Zellen wurden in Ca^{2+} -freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung für zwei oder vier Minuten mit Puffer oder Puromycin [250 μM - 1 mM] behandelt, gefolgt von einer Thapsigarginzugabe (TG) von 1 μM .

(B) Das Säulendiagramm zeigt die Quantifizierung der Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nach Thapsigarginzugabe mit oder ohne (Puffer) Puromycinbehandlung (Puro). Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen. P-Werte < 0,001 wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. n.s. = nicht signifikant

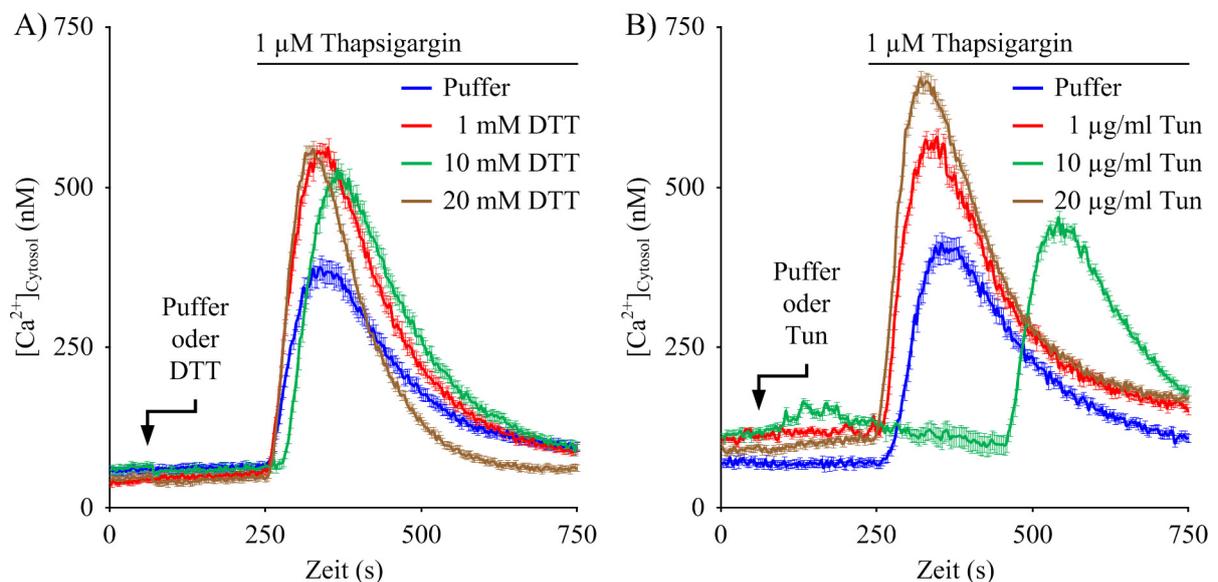
B) Proteinfaltungsantagonist-Experimente (DTT, Tunicamycin)

Eine Minute nach Start der ratiometrischen Messung wurden Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer zunächst für 3 min mit DTT (Endkonzentration 1 mM) oder Tunicamycin (Endkonzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Zellen eines zugehörigen Kontroll-experiments erhielten für die gleiche Dauer lediglich Ca^{2+} -freien Puffer. Es folgte die Zugabe des im gleichen Puffer verdünnten Thapsigargins (Endkonzentration 1 μM) bis zum Ende der Messung nach 12,5 min.

Da Tunicamycin im Gegensatz zu DTT nicht in Aqua dest. sondern DMSO gelöst war, wäre in diesem Fall die korrekte Kontrolle eine Lösung aus Ca^{2+} -freiem Puffer mit 0,1 % DMSO (entspricht der Menge an DMSO im Tunicamycin Ansatz). Auf Grund der Tatsache, dass eine 0,1 %ige DMSO Konzentration/Lösung aber keinen Einfluss auf die Thapsigargin Antwort nimmt (Daten nicht gezeigt; Adolfo Cavalié, persönliche Mitteilung), wurde auf diese zusätzliche Kontrolle weitestgehend verzichtet.

Genauso wie für Puromycin in einem vorhergehenden Experiment die zu applizierende Konzentration austitriert wurde, erfolgte eine solche Konzentrationsreihe für beide Faltungsantagonisten DTT und Tunicamycin (s. Abb. III-09). In beiden Fällen genügte eine kurzzeitige Einwirkung von 3 min vor Thapsigargin-gabe aus, um zu einer Steigerung des durch Thapsigargin demaskierten Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER zu führen.

Davon ausgehend wurden die Zellen der im Ergebnisteil illustrierten Experimente 3 min mit 1 mM DTT bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin behandelt vor der nachfolgenden Applikation (s. auch IV.1.4.4).



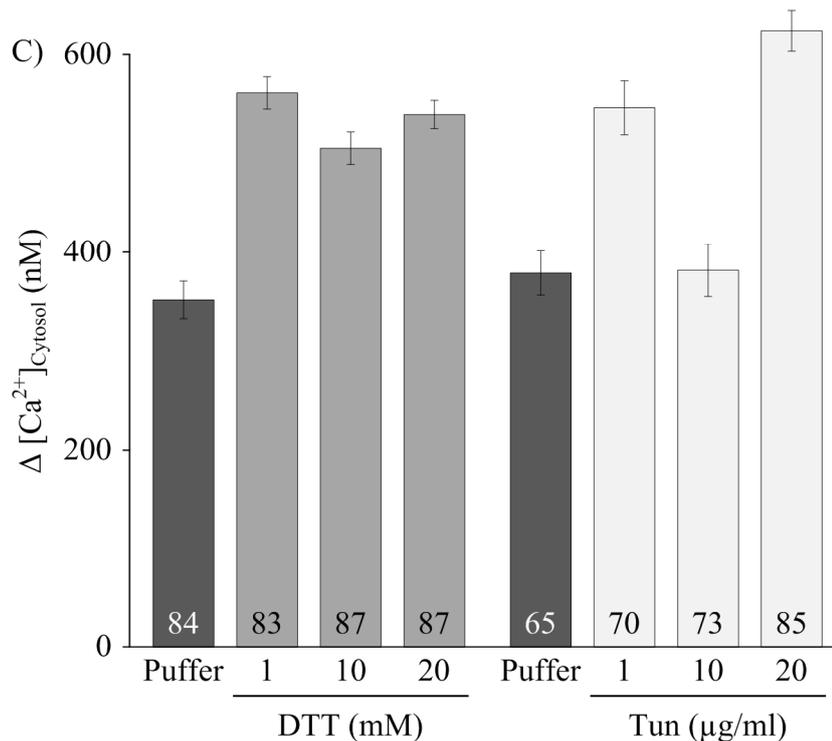


Abb. III-09: Einfluss der Faltungsantagonistkonzentration (DTT, Tunicamycin) auf die Ca²⁺-Homöostase
 Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden für 45 min bei RT mit 4 µM Fura-2 AM beladen. Die Zellen wurden in Ca²⁺-freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und 1 min nach Start der kalibrierten Messung mit Puffer, 1 - 20 mM DTT (A) oder 1 - 20 µg/ml Tunicamycin (Tun, B) behandelt. Nach weiteren 3 min wurde durch die Gabe von 1 µM Thapsigargin die Ca²⁺-Freisetzung initiiert. Das Säulendiagramm (C) zeigt die Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration (Δ [Ca²⁺]_{cytosol}) nach Thapsigargingabe mit (DTT, Tun) oder ohne (Puffer) Faltungsantagonist. Die Diagramme (A-C) zeigen Mittelwerte inklusive Standardfehler. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen.

C) Experimentelle Bestimmung der Menge an freiem Ca²⁺ (Ionomycin)

Eine Minute nach Beginn der ratiometrischen Messung wurden Zellen in Ca²⁺-freiem Puffer mit Ionomycin (Endkonzentration 5 µM) behandelt. Die Messung erfolgt in der Regel für 7,5 min.

Zusätzlich wurde in einigen Vorexperimenten 5 min nach Applikation des Ionomycins noch für weitere 6,5 min Thapsigargin (Endkonzentration 1 µM) verabreicht, um eine völlige Freisetzung an ungebundenem Ca²⁺ zu demonstrieren. Da diese zusätzliche Thapsigarginbehandlung keine erneute Erhöhung der Ratio mit sich führte, wurde in den Folgeexperimenten darauf verzichtet, es sei denn, in der Legende wird auf die zusätzliche Thapsigarginbehandlung hingewiesen.

D) „Store operated calcium entry“ (SOCE) Experimente (Ca^{2+})

SOCE konnte auf zwei verschiedene Weisen erzeugt werden.

Im Experimenttyp (i) wurden die Zellen 1 min nach Start der ratiometrischen Messung zunächst für 7 min mit Thapsigargin (Endkonzentration $1 \mu\text{M}$) in Ca^{2+} -freiem Puffer behandelt. Es folgte die Applikation einer Ca^{2+} -Lösung, so dass sich eine theoretische Endkonzentration an Ca^{2+} von $2,5 \text{ mM}$ einstellt bis zum Ende der Messung nach $12,5 \text{ min}$.

Im Experimenttyp (ii) wurden die Zellen 1 min nach Beginn der ratiometrischen Messung zunächst für 6 min mit Ca^{2+} -Lösung (Endkonzentration $2,5 \text{ mM}$) inkubiert, gefolgt von einer Thapsigarginapplikation (Endkonzentration $1 \mu\text{M}$) bis zum Ende der Messung nach 11 min .

E) Toxin basierende Experimente (Subtilase AB_5)

Für diese Variante der Ca^{2+} -Analyse wurde die Bildaufzeichnungsrate auf eine Frequenz von $1/6 \text{ Hz}$ (ein Bild alle sechs Sekunden) pro Anregungskanal reduziert und auf eine Messdauer von 60 min ausgedehnt.

Eine Minute nach Beginn der ratiometrischen Messung wurden Zellen in Ca^{2+} -freiem Puffer entweder mit der aktiven Variante SubAB oder der inaktiven Form SubAB Mutante (Endkonzentration je $1 \mu\text{g/ml}$) behandelt.

III.6.9.5 Kalibrierung der Fura-2 Messungen Ca^{2+} -Puffer:

140 mM NaCl

5 mM KCl

1 mM MgCl_2

10 mM Glukose

52 mM CaCl_2

10 mM HEPES/KOH

pH 7,35

Um die experimentell ermittelten Ratiowerte zu vereinheitlichen und in quantitative Ca^{2+} -Konzentrationen umzurechnen, wurde eine Kalibrierung analog zu Lomax *et al.* (2002) durchgeführt. Eine solche Kalibrierung beruht einerseits auf der Bestimmung der systemspezifischen K_d von Fura-2 zu Ca^{2+} und andererseits auf der Ermittlung der zelltypspezifischen minimal und maximal detektierbaren Ratiowerte (R_{\min} und R_{\max}).

Zur Bestimmung der systemspezifischen K_d wurde mit Hilfe einer definierten Ca^{2+} -Konzentrationsreihe (Molecular Probes) gearbeitet. Die im Kit enthaltenen Ca^{2+} -Standards sind jeweils mit $50 \mu\text{M}$ Fura-2 sowie $15 \mu\text{m}$ Polystyren-Mikrosphären gemischt. Dadurch ergibt sich eine konstante, vorgegebene Fura-2 Konzentration und durch die Mikrosphären ein einheitlicher, dünner Film eingeschlossen zwischen zwei Deckgläsern. Zudem erleichtern die enthaltenen Mikrosphären das Auffinden der adäquaten Fokusebene, die Ebene mit dem größten detektierbaren Mikrosphärendurchmesser.

$5 \mu\text{l}$ eines jeweiligen Ca^{2+} -Standards [$39 \mu\text{M}$ Ca^{2+} ohne Fura-2; $0 \mu\text{M}$ - $39 \mu\text{M}$ Ca^{2+} mit $50 \mu\text{M}$ Fura-2] wurden auf ein bereits in der Metallkammer eingespanntes Deckglas ($\varnothing 25 \text{ mm}$) aufgebracht und mit einem zweiten kleineren Deckglas ($\varnothing 10 \text{ mm}$) bedeckt. Für jede der so vorbereiteten Ca^{2+} -Standards erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei 510 nm nach Anregung mit 340 nm (F_{340}) und 380 nm (F_{380}). Zur letztlichen Berechnung der Ca^{2+} -Konzentrationen aus empirisch ermittelten Ratiowerten (R) waren folgende sechs Messresultate bestimmend:

- ✓ $F_{340} \text{ BG}$: F_{340} des $39 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Standards ohne Fura-2 (= Hintergrundfluoreszenz $_{340 \text{ nm}}$)
- ✓ $F_{380} \text{ BG}$: F_{380} des $39 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Standards ohne Fura-2 (= Hintergrundfluoreszenz $_{380 \text{ nm}}$)
- ✓ $F_{380 \text{ max}}$: F_{380} des $0 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Standards mit $50 \mu\text{M}$ Fura-2
- ✓ $F_{380 \text{ min}}$: F_{380} des $39 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Standards mit $50 \mu\text{M}$ Fura-2
- ✓ R_{min} : Ratio des $0 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Standards mit $50 \mu\text{M}$ Fura-2
- ✓ R_{max} : Ratio des $39 \mu\text{M}$ Ca^{2+} -Standards mit $50 \mu\text{M}$ Fura-2

Mit Hilfe dieser Konstanten lässt sich der Zusammenhang der freien Ca^{2+} -Konzentration und der experimentell ermittelten Fluoreszenzemissionsintensitäten nach der durch Grynkiewicz etablierten Formel [2] wie folgt ermitteln (Grynkiewicz *et al.* 1985):

$$[1] \quad R = \frac{F_{340} - F_{340 \text{ BG}}}{F_{380} - F_{380 \text{ BG}}}$$

$$[2] \quad [\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = K_d \times \left(\frac{F_{380 \text{ max}}}{F_{380 \text{ min}}} \right) \times \left(\frac{R - R_{\text{min}}}{R_{\text{max}} - R} \right)$$

Durch Logarithmieren und Umstellen der Formel [2] ergibt sich eine lineare Geradengleichung der Form $y = mx + b$. Die Nullstelle dieser Geraden ($y = 0$) gibt nach passender Umformung die systemspezifische K_D von Fura-2 für Ca^{2+} .

Zur Bestimmung der zelltypspezifischen minimal und maximal detektierbaren Ratiowerte (R_{\min} und R_{\max}) wurden die auf einem Deckglas kultivierten und entsprechend manipulierten Zelltypen nach ihrer 45 minütigen Beladung mit Fura-2 in die Metallkammer eingedreht. Darin wurden sie vor Beginn der Messung nach doppeltem waschen mit Ca^{2+} -freiem Puffer zweimal 5 min mit Ionomycin (Endkonzentration 5 μM) im gleichen Puffer vorbehandelt. Zu diesen an Ca^{2+} depletierten Zellen wurden 2 min nach Start der Messung 300 μl Ca^{2+} -Puffer (Endkonzentration ≈ 25 mM) zugegeben bis zum Ende des Experiments nach 7,5 min.

Der Mittelwert aus den drei Zellen mit den niedrigsten Ratiowerten im Zeitraum von 0 - 2 min wurde als R_{\min} angesehen und die mittlere Ratio dreier Zellen mit der höchsten Fluoreszenz nach Applikation des Ca^{2+} -Puffers als R_{\max} deklariert.

Durch den notwendigen Austausch des Polychromators V musste auch für beide Geräte die systemspezifische K_d von Fura-2 zu Ca^{2+} berechnet werden. (Literatur: $K_d = 224$ nM)

Polychromator V #1: $K_d = 716,4$ nM

Polychromator V #2 (SN 1007): $K_d = 484,8$ nM

Als $K'_d = K_d \times \left(\frac{F_{380 \max}}{F_{380 \min}} \right)$ Werte wurden für die Polychromatoren folgende Zahlen ermittelt:

Polychromator V #1: $K'_d = 3,54$ μM

Polychromator V #2 (SN 1007): $K'_d = 3,62$ μM

Die gleiche Problematik gilt prinzipiell für die Bestimmung der zelltypspezifischen minimal und maximal detektierbaren Ratiowerte (R_{\min} und R_{\max}), welche sich genau wie die K_d im Zuge des Polychromatorwechsels ändern können. Für den Polychromator V#1 wurden für alle verwendeten Zelltypen die R_{\min} - und R_{\max} -Werte ermittelt und zur Berechnung verwendet.

Folgende (R_{\min}/R_{\max})-Werte wurden mittels Polychromator V #1 ermittelt:

ERJ1 siRNA (196/2396), Kontroll-siRNA (235/2385), *SEC61* siRNA (199/2332), *SEC61* siRNAs (178/2502), *SEC61*-UTR siRNA (185/2453), *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid (185/2214), *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp (175/2173), *SEC62* siRNA (206/2317), *SEC62*-UTR siRNA (197/2613), unbehandelt (229/2528)

In Kombination mit Polychromator V#2 (SN 1007) konnten allerdings nur für einen Großteil der verwendeten Zelltypen die R_{\min} - und R_{\max} -Ratios ermittelt werden. Daher wurde im Falle einer Messung mit dem Polychromator V#2 (SN 1007) zur Umrechnung der experimentell ermittelten Ratiowerte aller Zelltypen ein gemeinsamer R_{\min} - bzw. R_{\max} -Mittelwert gewählt. Diese resultieren aus dem Satz der tatsächlich bestimmten R_{\min} - und R_{\max} -Werte von insgesamt 17 verschiedenen „Zelltypen“.

Folgender (R_{\min}/R_{\max})-Mittelwert wurde durch Polychromator V #2 (SN 1007) ermittelt:
(275/3163)

Dieser R_{\min} - bzw. R_{\max} -Wert resultiert aus der Mittelung von 17 verschiedenen Zelltypen: *BIP* siRNA (1 - 4 d), *BIP*-UTR siRNA (1 - 4 d), Kontroll-siRNA (1 - 4 d), Kontroll-siRNA + Kontrollplasmid, *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid, *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp, *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H, unbehandelt

III.7 Methode der statistischen Analyse

Im Falle einer durchgeführten statistischen Analyse wurde auf den ungepaarten t-Test zurückgegriffen. Berechnete Wahrscheinlichkeitswerte (p) wurden in verschiedene Klassen eingeteilt zur Bestätigung oder Widerlegung der Nullhypothese:

$p > 0,05$ \Rightarrow n.s. (nicht signifikant)

$0,05 > p > 0,01$ \Rightarrow *

$0,01 > p > 0,001$ \Rightarrow **

$p < 0,001$ \Rightarrow ***

In der Regel handelt es sich bei allen angezeigten Fehlerbalken stets um den zugehörigen Standardfehler der Stichprobenmenge.

IV ERGEBNISSE

Eine Aufgabenstellung zu Beginn dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines zuverlässigen, exakten und reproduzierbaren experimentellen Systems zur Analyse der Proteintranslokation in das endoplasmatische Retikulum (ER). Um sowohl Effizienz als auch Genauigkeit der Messmethode zu überprüfen, bedurfte es einer passenden Positivkontrolle, welche in ihrer An- bzw. Abwesenheit deutlichen Einfluss auf die Proteintranslokation nimmt. Basieren sollte das Messverfahren auf der Präparation semi-permeabilisierter Zellen (SPZ), welche im Vorfeld mittels RNA Interferenz (RNAi) analog zu Wilson *et al.* (1995) manipuliert werden können. Als Positivkontrolle und einflussreichste Messgröße der Proteintranslokation in das ER wurde, der Demonstration von Görlich und Rapoport (1993) folgend, die zentrale Untereinheit der Proteintranslokase selbigen Organells, das Sec61 α Protein, ausgewählt und mittels RNAi depletiert. Bevor allerdings der Beitrag des *SEC61A1* Gens an Proteintransportprozessen ermittelt werden konnte, musste eine adäquate RNAi basierende Depletions- und Komplementationsstrategie gefunden und etabliert werden.

IV.1 Zelluläre Phänotypen der *SEC61A1* Expressionsmodulation

Der erste und entscheidende Schritt zur Bestimmung zellulärer Phänotypen einer rückwärts gerichteten genetischen Analyse besteht in der bestmöglichen Genexpressionsminderung des gewünschten Zielgens, in diesem Fall die siRNA vermittelte Reduktion der *SEC61A1* Expression. Erst auf Basis einer solch verminderten Genexpression erfolgt die Untersuchung möglicher, resultierender zellulärer Phänotypen.

IV.1.1 Etablierung der siRNA vermittelten Sec61 α Depletion

Die effiziente und möglichst vollständige Reduktion der *SEC61A1* Genexpression mittels RNAi wurde auf zwei empfohlene Weisen demonstriert. Parallel zum Nachweis auf mRNA Ebene via quantitativer „real-time“ PCR (qRT-PCR) wurde die verringerte Genexpression des *SEC61A1* auch auf Stufe des synthetisierten Genprodukts per semi-quantitativem Western Blot verifiziert.

IV.1.1.1 Kinetik der siRNA vermittelten *SEC61A1* Genexpressionsminderung

Um die Effektivität der siRNA Behandlung gegen *SEC61A1* zu ermitteln, bedurfte es einer kinetischen Analyse der mRNA Degradation mit Hilfe einer quantitativen „real-time“ PCR (qRT-PCR in Zusammenarbeit mit Birgit Klemmer, Klinik für Urologie, UKS).

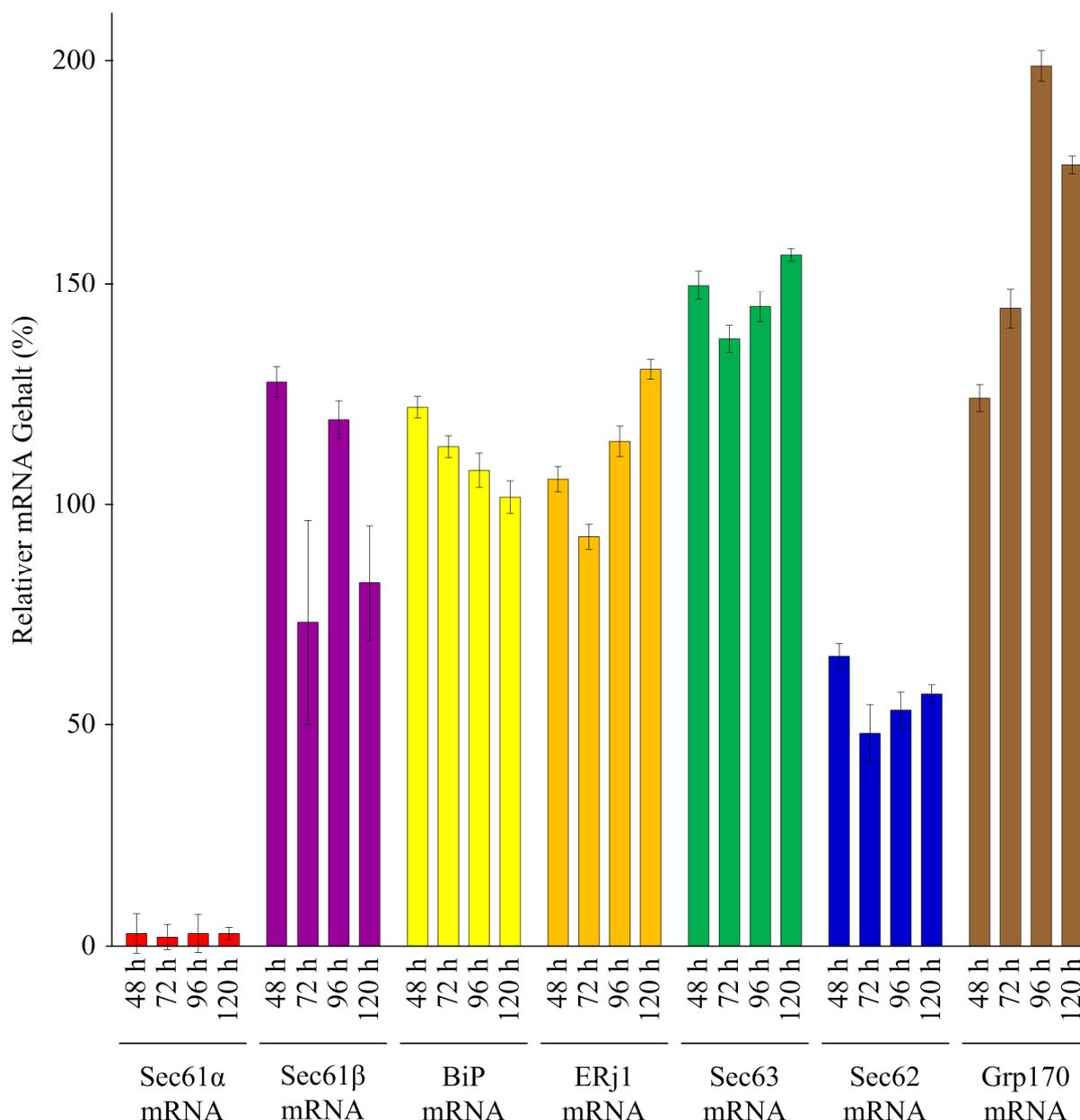


Abb. IV-01: Quantitative „real-time“ PCR Analyse der siRNA induzierten Sec61α mRNA-Reduktion
 48 - 120 h nach Transfektion von HeLa-Zellen mit einer Mischung der *SEC61* und *SEC61*-UTR siRNA (je 10 nM) wurden die Zellen geerntet und deren mRNA mittels NucleoSpin RNA II Kit isoliert. Die reverse Transkription erfolgte mittels SuperScript II und Oligo-dT Primer. Der TaqMan® Gene Expression Assay diente der quantitativen „real-time“ PCR für die mRNAs Sec61α, Sec61β, BiP, ERj1, Sec63, Sec62 und Grp170. Act-Werte und die daraus abgeleiteten relativen mRNA Gehalte wurden mit Hilfe der Standards *SOX* und *BMI-1* ermittelt und zu entsprechenden Kontroll-siRNA (20 nM) transfizierten HeLa-Zellen normalisiert. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Abbildung IV-01 zeigt die Korrelation zwischen verschiedenen relativen mRNA-Gehalten und der Dauer der *SEC61* siRNA Transfektion von 48 bis 120 h. Die Kombination aus *SEC61* und *SEC61*-UTR siRNA führte während der gesamten Dauer der Analyse zu einer nahezu vollständigen Degradation der Sec61 α mRNA mit Werten unter 5 % verglichen mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Wenig beeinflusst, bzw. im Rahmen tolerabler Grenzen der qRT-PCR (100 ± 50 %), durch die *SEC61* und *SEC61*-UTR siRNA Transfektion hingegen erschien auf mRNA-Ebene das Expressionsmuster weiterer translokaseassoziiierter Gene wie *SEC61B*, *BIP*, *ERJ1* und *SEC63*. Ausnahmen bildeten die mRNA-Level von Sec62 und Grp170. Während sich der Gehalt an Sec62 mRNA nach 48 h auf etwa 50 % verminderte, erschien umgekehrt die Konzentration an Grp170 mRNA ab 96 h mit über 150 % leicht erhöht.

Die resultierende Frage war, ob und v.a. wann sich die Degradation der Sec61 α mRNA auch auf Proteinebene auswirkt. Daher wurde eine analoge Kinetikanalyse unterschiedlich transfizierter HeLa-Zellen mittels Western Blot durchgeführt. Deren Resultat ist in Abbildung IV-02 illustriert.

Bereits 24 h nach Applikation der verschiedenen *SEC61A* siRNA Behandlungsmethoden (*SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder die Kombination beider *SEC61* siRNAs) zeigte sich die deutliche Reduktion des zugehörigen Genprodukts in allen drei Fällen auf etwa die Hälfte beim Vergleich mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Mit andauernder Inkubationsdauer der siRNA sank der Gehalt an Sec61 α weiter ab mit einer maximalen Proteindepletion nach 96 h bzw. 120 h. Minimale Restproteingehalte an Sec61 α bewegten sich zwischen 10 - 20 % nach 96 h bzw. 120 h Depletion (s. Abb. IV-02).

Dass es sich bei einer solchen siRNA basierenden Reduktionsstrategie lediglich um ein transientes Phänomen handelt, verdeutlichte der wiederkehrende leichte Anstieg des Sec61 α Proteins im Falle der *SEC61* und *SEC61*-UTR siRNA Behandlung im Zeitraum von 96 bis 120 h. Dies deutete sich auch auf Transkriptomebene an. Nach maximaler Reduktion des Sec61 α mRNA-Levels bei 72 h stieg dessen Konzentration im anknüpfenden Zeitfenster wieder minimal an (vgl. Abb. IV-01).

Schlussfolgernd ließ sich festhalten, dass die gewählte siRNA basierende *SEC61A1* Genexpressionsreduktion sowohl auf Ebene des Transkriptoms als auch des Proteoms die effiziente Depletion der jeweiligen Sec61 α Entität (mRNA bzw. Protein) demonstrierte. Zur weiteren grundlegenden Charakterisierung dieser RNAi-Strategie erfolgte auch eine Untersuchung des Proliferationsverhaltens und der Viabilität behandelter Zellen.

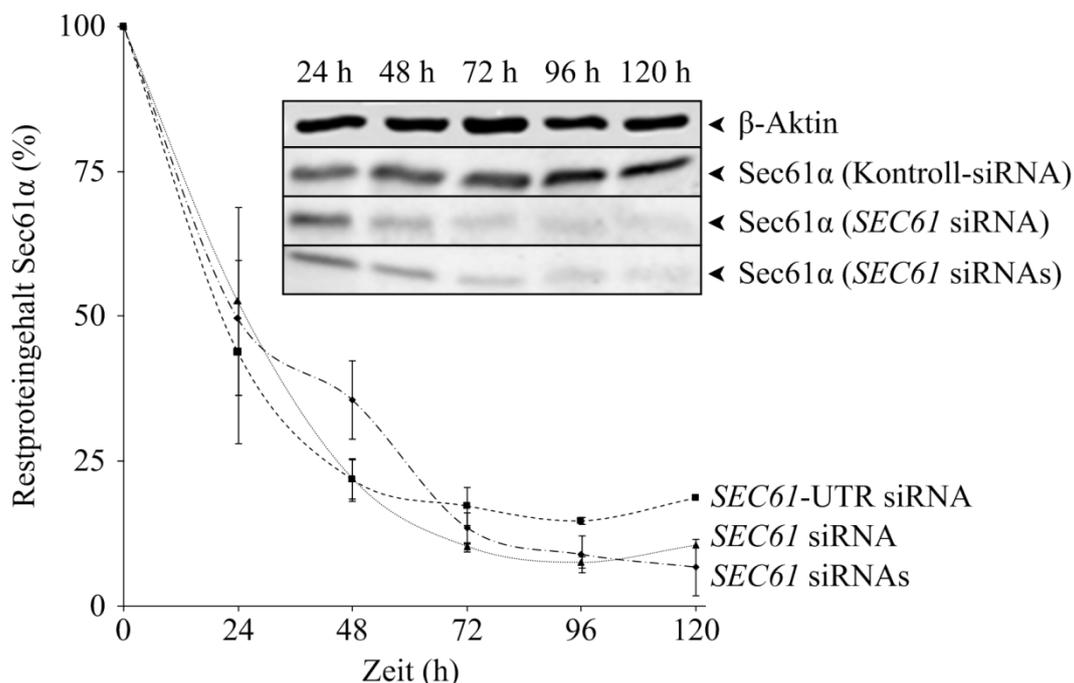


Abb. IV-02: Kinetische Analyse der siRNA induzierten Sec61 α Depletion mittels Western Blot
 24 - 120 h nach Transfektion von HeLa-Zellen durch *SEC61*-UTR siRNA (20 nM), *SEC61* siRNA (20 nM) oder der Kombination beider siRNAs (je 10 nM) wurden die Zellen geerntet und mit Digitonin sowie Nuklease behandelt. In Lämmli-Puffer gekochte Proben wurden nach SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörperdekoratation gegen β -Aktin (Ladekontrolle) und Sec61 α analysiert (Inlay). Nach deren densitometrischer Auswertung erfolgte die graphische Darstellung der an β -Aktin abgeglichenen und an Kontroll-siRNA behandelten Zellen (20 nM) normalisierten Signalstärken gegen die Zeit. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

IV.1.1.2 Proliferations- und Viabilitätskinetik während der Sec61 α Reduktion

Um das Zeitfenster für Untersuchungen resultierender Phänotypen möglichst einzugrenzen, mussten sowohl das Proliferationsverhalten als auch die Viabilität siRNA behandelter Zellen in Abhängigkeit des Sec61 α -Gehaltes bestimmt werden.

Wie Teil A der Abbildung IV-03 zu erkennen gibt, zeigte jede der siRNA basierenden Zellmanipulationen über den gesamten Beobachtungszeitraum (0 - 120 h) eine geringere Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Während unbehandelte Zellen ab dem Zeitpunkt des Aussäens einer zelltypischen, logarithmischen Proliferationsrate folgten, wiesen alle vier Varianten der transfizierten Zellen eine verlangsamte/verzögerte Proliferation auf. Möglicherweise war die verringerte Zellproliferation auf die „harschen“ Bedingungen während des Transfektionsprozesses zurückzuführen. Im Zeitraum zwischen 72 h und 96 h begannen dann auch Kontroll-siRNA transfizierte Zellen sich von *SEC61A* depletierten Zellen bezüglich der Zellvermehrung zu unterscheiden. Diese Differenz im Proliferationsverhalten

wurde noch ausgeprägter im Zeitabschnitt nach 96 h; inklusive beginnendem Proliferationsstopp und Absterben *SEC61A* depletierter Zellen.

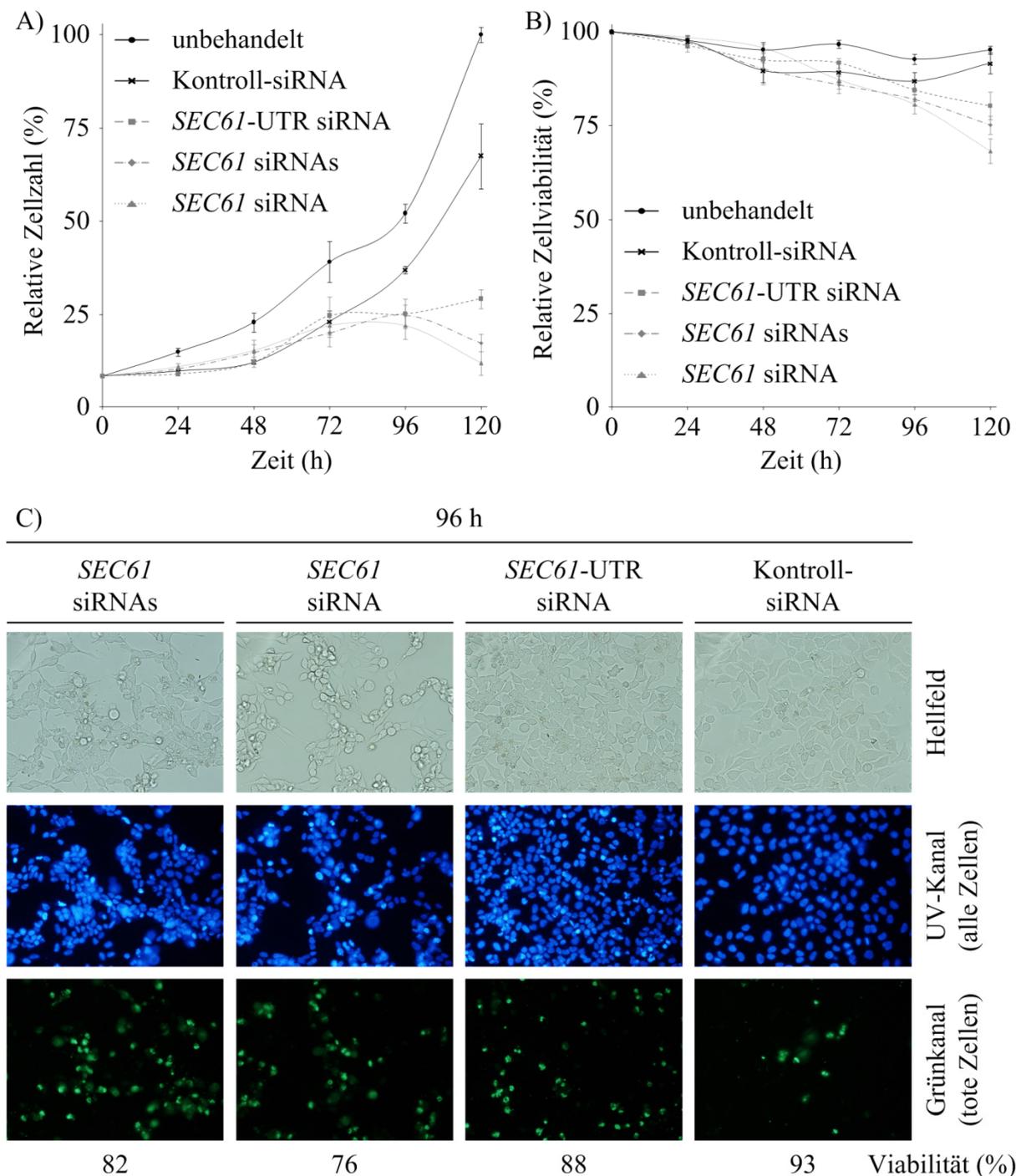


Abb. IV-03: Effekte der *Sec61a* Depletion auf die Zellproliferation und Zellviabilität

Dargestellt sind die relative Zellzahl (A) und Zellviabilität (B) unbehandelter und siRNA behandelter HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten von 0 bis 120 h. Zellen wurden mit 20 nM *SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA, einer Kombination beider *SEC61* siRNAs oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte sowohl durch eine manuelle Zellzählung als auch unter Verwendung des „Countess® Automated Cell Counter“. Die Zellzahlen sind normiert auf den 120 h-Wert unbehandelter Zellen. Die Messung der Zellviabilität erfolgte sowohl durch das „Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability reagent“ (C) als auch unter Verwendung des „Countess® Automated Cell Counter“. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

(C) zeigt die mikroskopische Analyse der Zellviabilität nach 96 h siRNA Behandlung der auf einem Deckglas kultivierten HeLa-Zellen mittels des „Nuclear-ID™ Blue/Green cell viability reagent“. 30 min nach Färbung der Zellen mit dem Reagenz (1 µM) wurde das bewachsene Deckglas einmal mit PBS gespült und sowohl im Hellfeld (Durchlicht) als auch mittels DAPI-(UV-Kanal) und GFP-Filter (Grünkanal) mikroskopiert (20x/0,45 Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv). Die daraus abgeleitete Viabilität $[1 - \frac{\Sigma(\text{Grünkanal})}{\Sigma(\text{UV-Kanal})}]$ ist unterhalb jeder Spalte in Prozent festgehalten.

Desweiteren war zur Eingrenzung des Zeitfensters für die Untersuchungen der aus dem *SEC61A* „silencing“ resultierenden Phänotypen nicht nur die Proliferationskinetik der manipulierten Zellen ausschlaggebend, sondern auch deren Viabilität (s. Abb. IV-03B).

Während unbehandelte Zellen im Beobachtungszeitraum von 0 h bis 120 h eine konstante, hohe Viabilität von rund 95 % aufwiesen, zeigten alle transfizierten Zellen bis 72 h nach Beginn der Manipulation einen leichten Rückgang der Viabilität auf 85 - 90 %. Analog zum Verhalten bezüglich der Proliferation begann auch ab dem Zeitraum von 72 h bis 96 h nach Transfektion sich die Viabilität der Kontroll-siRNA behandelten Zellen von der Viabilität der *SEC61A* depletierten Zellen zu unterscheiden. Diese Differenz der Viabilität wurde noch ausgeprägter im Zeitabschnitt nach 96 h. Während Kontroll-siRNA transfizierte Zellen sich der hohen Viabilität unbehandelter Zellen anglichen, zeigten alle drei *SEC61A* depletierten „Zelltypen“ eine weitere Verringerung der Viabilität auf einen durchschnittlichen Wert von 75 % nach 120 h (s. Abb. IV-03B).

Um den Verlauf der Zellviabilität auch optisch nachzuvollziehen, sind in der Abb. IV-03C beispielhaft Mikroskopiebilder der Nuclear-ID™ reagent Messung nach 96 h dargestellt. Die Begutachtung der Mikroskopiebilder dieser Messungen verdeutlicht beide zum Teil A und B der Abbildung beschriebenen Aspekte. Sowohl die Proliferation (erkennbar an der Anzahl blauer Nuklei im UV-Kanal) als auch die Viabilität der Kontrollzellen und *SEC61A* depletierten Zellen sind bis zum Zeitpunkt von 96 h nur marginal unterschiedlich. Erst danach zeigen sich drastische Unterschiede in puncto Proliferation und Viabilität.

Zusammenfassend betrachtet, zeigen Zellviabilität (s. Abb. IV-03B) und Zellproliferation (s. Abb. IV-03A) ein kongruentes Muster nach der Transfektion. Trotz des sich stetig reduzierenden Sec61α Proteingehaltes bis zum Zeitpunkt von 96 h post *SEC61A* siRNA Behandlung (vgl. Abb. IV-02), erfahren diese depletierten Zellen erst im anknüpfenden Zeitfenster nach 96 h eine deutliche Beeinträchtigung bezüglich der Viabilität und Proliferation im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

IV.1.1.3 Auswirkungen der *SEC61A* Expressionsmodulation auf Proteomebene

Durch die kinetischen Analysen der Auswirkungen der Sec61 α Depletion auf Proteinebene (s. Kapitel IV.1.1.1) sowie auf Ebene der Proliferation und Viabilität (s. Kapitel IV.1.1.2) wurde der Zeitpunkt von 96 h als optimal für nachfolgende Versuchszwecke festgelegt. Ein weiterer Vorteil dieses ausgedehnten Zeitfensters der Sec61 α Depletion lag in der Idee der vektorgestützten Rettungsexperimente nach siRNA Behandlung (s. Kapitel III.6.4). Je länger die siRNA Behandlung toleriert wird, desto größer ist das Zeitfenster der möglichen Expression plasmidkodierter Gene im Zuge einer Komplementation.

Bedenkt man den Umstand das Sec61 α die Schlüsselkomponente der ER Translokase repräsentiert (vgl. Kapitel II.3.2), sollte gerade die Reduktion dieser zellulären Komponente Auswirkungen auf den Gehalt weiterer Proteine nehmen, welche die Translokase im Laufe ihrer Biogenese passieren. Dies betrifft rund ein Drittel aller genomisch kodierten Proteine (Kaufman 1999). Davon ausgehend war es von Interesse, welche Änderungen verschiedener Proteingehalte sich zum Zeitpunkt der maximalen Sec61 α Reduktion (nach 96 h) ergeben. Für diese Untersuchung (Western Blot) wurden neben den drei Varianten *SEC61A* depletierter Zellen noch drei weitere Zelltypen einbezogen. In diesen wurde die siRNA vermittelte *SEC61A* Depletion durch unterschiedliche Plasmidexpressionen komplementiert. Im ersten Fall erfolgte die Komplementation durch ein nicht-kodierendes Kontrollplasmid, im Zweiten durch einen *SEC61A1* Wildtyp kodierenden Vektor und im dritten Fall durch Expression des Diabetes mellitus assoziierten *SEC61A1-Y344H* Allels (Lloyd *et al.* 2010).

Die Auswirkung der Sec61 α Depletion nach 96 h ist in der nachfolgenden Abbildung IV-04 illustriert. In nahezu allen Fällen zeigten die drei gewählten *SEC61A* RNAi-Strategien (orange, blaue und hellrote Balken) das identische Resultat. Simultan mit der Reduktion des Sec61 α Proteins auf rund 11 % (*SEC61* siRNA: 11 ± 1 % (n = 46); *SEC61*-UTR siRNA: 12 ± 1 % (n = 50); *SEC61* siRNAs: 9 ± 1 % (n = 45)) wurden auch beide assoziierten Untereinheiten des heterotrimeren Sec61 Komplexes, das Sec61 β (*SEC61* siRNA: 22 ± 2 % (n = 29); *SEC61*-UTR siRNA: 25 ± 2 % (n = 31); *SEC61* siRNAs: 17 ± 2 % (n = 22)) und Sec61 γ Protein (*SEC61* siRNA: 13 ± 3 % (n = 11); *SEC61*-UTR siRNA: 14 ± 2 % (n = 11); *SEC61* siRNAs: 11 ± 3 % (n = 7)), deutlich in ihrem Gehalt gemindert. D.h. durch die alleinige Reduktion der α -Untereinheit kam es zum Verlust des multimeren Sec61 Komplexes. Desweiteren reduzierte sich auch die Menge des putativen translokonassoziierten Proteins ERj1 auf Werte um die 36 % (*SEC61* siRNA: 40 ± 3 % (n = 25); *SEC61*-UTR siRNA: 32 ± 3 % (n = 28); *SEC61* siRNAs: 36 ± 3 % (n = 19)). Andere Translokonkomponenten, wie Sec62 und Sec63, blieben hingegen auch 96 h nach Fehlen des Sec61 α Proteins in ihrer Abundanz unverändert. Selbiges gilt auch für die an der „unfolded protein

response“ (UPR) oder dem Ca^{2+} -Leckstrom beteiligten Proteine BiP, Grp170, SERCA2 und Presenelin1 (Psn1). Auch die im Western Blot getesteten Proteine der großen (Rpl23a) und kleinen ribosomalen Untereinheit (Rps3) zeigten keine Änderung in ihrer Menge verglichen mit den Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Bei Analyse der ER „targeting“ Maschinerie wiesen Sec61 α depletierte Zellen einen erhöhten Gehalt an SR β und SR α auf. Besonders SR β wies eine deutlich gesteigerte Synthese für alle drei *SEC61A* Depletionsstrategien auf (*SEC61* siRNA: 304 ± 20 % (n = 34); *SEC61*-UTR siRNA: 282 ± 20 % (n = 36); *SEC61* siRNAs: 345 ± 38 % (n = 16)). Gleiches gilt prinzipiell für SR α , doch schien es sich in diesem Fall, um einen *SEC61*-UTR siRNA spezifischen Effekt zu handeln. Während die Synthese des SR α nach der *SEC61* siRNA Behandlung nicht gesteigert war (111 ± 11 % (n = 21)), war bei der Kombination beider *SEC61A* siRNAs der SR α Proteinlevel bereits erhöht (184 ± 23 % (n = 15)) und nochmals deutlich gesteigert bei der alleinigen Applikation der *SEC61*-UTR siRNA (227 ± 15 % (n = 26)).

Zudem sind in Abb. IV-04 auch zugehörige Western Blot Analysen der Komplementationen mit Kontrollplasmid (dunkelrot), *SEC61A* Wildtyp (grün) und *SEC61A-Y344H* (grau) exprimierenden Vektoren zusammengefasst im Abgleich zu den Kontroll-siRNA und Kontrollplasmid kotransfizierten Zellen.

Da sich die Änderung der *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid transfizierten Zellen auf Proteomebene wie erwartet (weitestgehend) mit denen der *SEC61*-UTR siRNA behandelten Zellen deckten, werden sie nicht gesondert beschrieben (vgl. oben). Auffällig schien die noch ohne Signifikanz zu beurteilende Reduktion der *SEC62* Expression auf 78 ± 11 % (n = 10).

Beide exprimierenden Vektoren steigerten im Vergleich zum *SEC61*-UTR siRNA Hintergrund die Sec61 α Synthese wieder um das Fünffache (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-WT: 61 ± 4 % (n = 19); *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H: 55 ± 5 % (n = 13)). Gleichzeitig führte diese partielle „Rettung“ der *SEC61A* Expression auch zur Aufhebung der verminderten Menge an Sec61 β (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-WT: 73 ± 9 % (n = 14); *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H: 73 ± 11 % (n = 9)) und ERj1 (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-WT: 87 ± 5 % (n = 16); *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H: 82 ± 7 % (n = 12)). Passend zu diesem Resultat zeigte sich auch, dass die durch die Sec61 α Depletion provozierte Überexpression der ER „targeting“ Maschinerie sowohl durch Expression des *SEC61A* Wildtyp als auch des *SEC61A-Y344H* Allels wieder gedämpft wurde. Proteine welche durch das *SEC61A* „silencing“ unverändert synthetisiert wurden (Sec62, Sec63, BiP, Grp170 und SERCA2) zeigten auch keine Beeinflussung durch beide Komplementationsweisen. Aus diesem Grund wurde für die komplementierten Zellen zunächst auf eine nähere Analyse der ribosomalen Proteine und des Presenelin1 verzichtet.

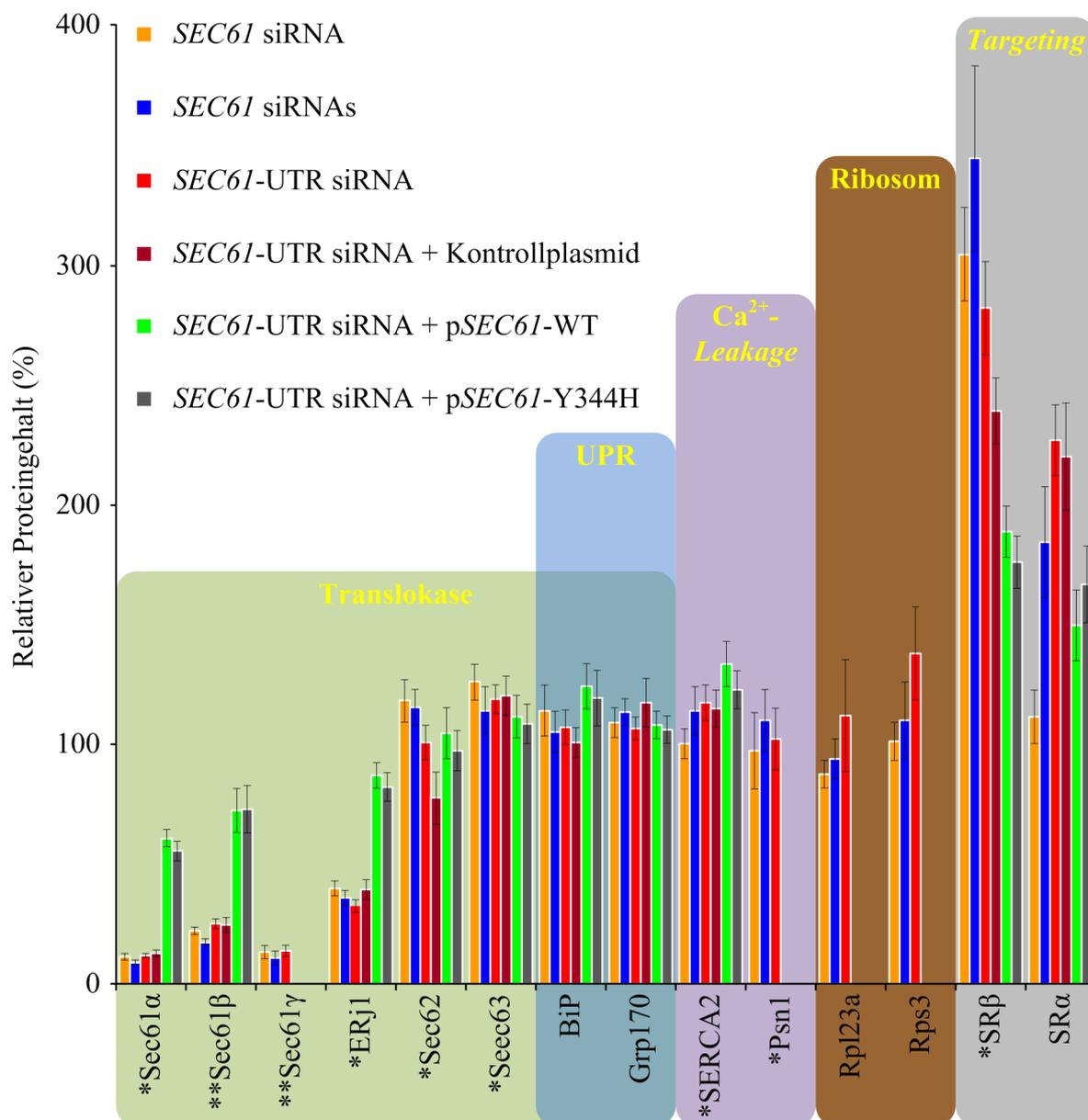


Abb. IV-04: Relativer Proteingehalt nach 96 stündiger *SEC61A* Depletion/Komplementation

Das Diagramm zeigt die statistische Analyse der mittels Western Blots ermittelten relativen Proteinsynthese verschiedener depletierter und komplementierter HeLa-Zellen abgeglichen auf deren β -Aktinegehalt und normalisiert zu den jeweiligen Kontrollzellen. Kontrollzellen wurden zur RNA Interferenz für 96 h mit 20 nM Kontroll-siRNA behandelt und zur Komplementation erfolgte nach 32 h zusätzlich eine Transfektion mit 4 μ g Kontrollplasmid. Das *SEC61A* „silencing“ resultierte wie angezeigt aus der Transfektion mit *SEC61* siRNA (orange), *SEC61*-UTR siRNA (rot) oder einer Kombination beider *SEC61* siRNAs (blau) in einer Endkonzentration von 20 nM für 96 h. Die *SEC61*-UTR siRNA vermittelte Gendepletion wurde nach 32 h entweder durch ein Kontrollplasmid (dunkelrot), einen *SEC61* Wildtyp exprimierenden Vektor (p*SEC61*-WT, grün) oder den *SEC61A*-Y344H kodierenden Vektor (p*SEC61*-Y344H, grau) komplementiert (jeweils 4 μ g). Die im Western Blot dekorierten Zielproteine wurden entsprechend einer möglichen Einordnung als Bestandteil der Translokase, der „unfolded protein response“ (UPR), des „Ca²⁺-Leakage“ Mechanismus, des Ribosoms oder der ER „targeting“ Maschinerie kategorisiert (gelbe Beschriftung). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. * = Membranprotein; ** = „tail-anchor“ Membranprotein; Psn1 = Presenelin1; Rp = ribosomales protein; SR = SRP Rezeptor

Retrospektiv kann man zusammenfassen, dass die durch die Sec61 α Depletion generierten Änderungen in der Proteinmenge, großenteils durch die partielle Komplementation sowohl mit wildtypischem als auch der Y344H mutierten Version des Sec61 α Proteins aufgehoben werden konnten.

In Anbetracht dieser Endpunktbestimmung des veränderten Proteinmusters nach 96 h, stellte sich die Frage nach dem zeitlichen Verlauf der möglichen Veränderungen. Daher wurde in einer kleineren kinetischen Analyse von 48 h bis 96 h auch das Expressionsmuster der zuvor ermittelten und weiterer interessanter Kandidatengene mittels Western Blot auf Proteinebene über die Zeit bestimmt (s. Abb. IV-05).

Wie in der nachfolgenden statistischen Analyse zu erkennen ist, zeigten alle drei *SEC61A* siRNA Behandlungen nahezu kongruente Änderungen des Proteinmusters im Verlauf des betrachteten Zeitfenster von 48 h bis 96 h. Mit dem stetig sinkenden Sec61 α Gehalt von durchschnittlich $32 \pm 6 \%$ nach 48 h (*SEC61* siRNA: $24 \pm 4 \%$ (n = 5); *SEC61*-UTR siRNA: $35 \pm 9 \%$ (n = 6); *SEC61* siRNAs: $36 \pm 7 \%$ (n = 3)) auf $12 \pm 3 \%$ nach 96 h (*SEC61* siRNA: $10 \pm 2 \%$ (n = 3); *SEC61*-UTR siRNA: $16 \pm 3 \%$ (n = 4); *SEC61* siRNAs: $9 \pm 3 \%$ (n = 4)) sanken auch die Konzentrationen an Sec61 β und ERj1 im Beobachtungsintervall ab. Dies deckt sich mit der vorherigen Endpunktbestimmung (vgl. Abb. IV-04).

Darüber hinaus konnte auch eine mit dem Sec61 α Verlust einhergehende Reduktion des plasmamembranständigen Proteins Integrin β 1 ermittelt werden. Zudem war der nahezu „unveränderte“ - d.h. innerhalb tolerierbarer Messschwankungen bei kleineren Stichprobengrößen - Gehalt der ER Proteine Sec62, Sec63, BiP, Grp170 und SERCA2 in Übereinstimmung mit der Endpunktbestimmung nach 96 h (vgl. Abb. IV-04 und Abb. IV-05). Ebenso zeigte das in dieser Kinetik integrierte luminaire ER Protein Grp94 keine, der Sec61 α Depletion folgende, starke Änderung im Proteinmuster. Zuletzt konnte auch bei der kinetischen Analyse die gesteigerte Synthese des SR β verifiziert werden. Mit dem sich reduzierenden Gehalt an Sec61 α stieg im Analysezeitraum von 48 bis 96 h die Abundanz des membranständigen SR β Proteins mehr und mehr an (s. Abb. IV-05).

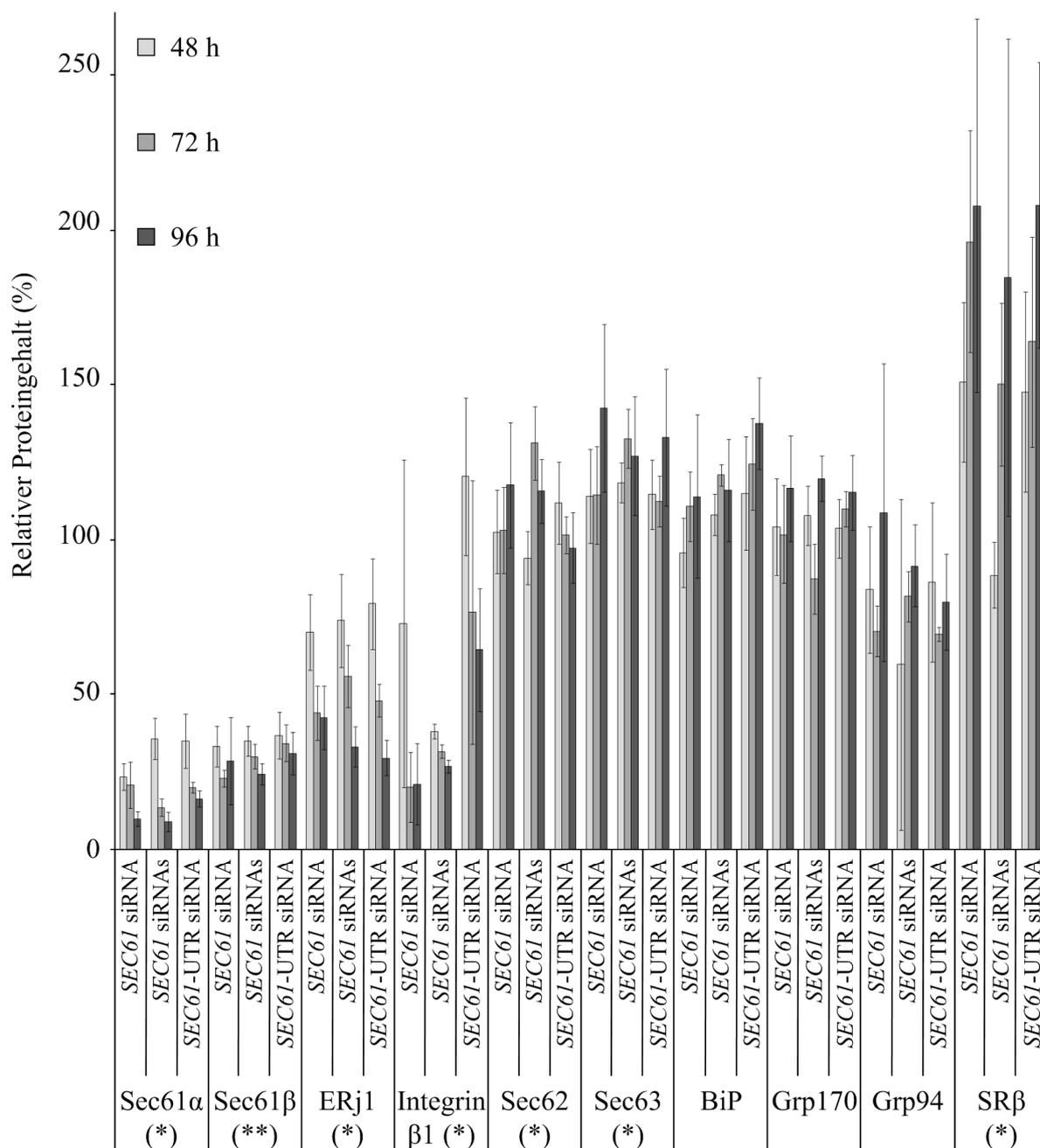


Abb. IV-05: Relativer Proteingehalt der *SEC61A* Depletionskinetiken von 48 - 96 h

Das Diagramm zeigt die statistische Analyse der mittels Western Blots ermittelten relativen Proteinsynthese der verschiedenen depletierten HeLa-Zellen abgeglichen auf deren β -Aktin Gehalt und normalisiert zu Kontroll-siRNA (20 nM) transfizierten Zellen. Die *SEC61A* Genexpressionsminderung resultierte aus der Transfektion mit *SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder einer Kombination beider *SEC61* siRNAs in einer Endkonzentration von jeweils 20 nM für 48 h (hellgraue Balken), 72 h (mittelgraue Balken) und 96 h (dunkelgraue Balken). Fehlerbalken symbolisieren den Standardfehler.

(*) = Membranprotein; (**) = „tail-anchor“ Membranprotein; SR = SRP Rezeptor

Beim Vergleich der kinetischen Analyse (s. Abb. IV-05) und der Endpunktbestimmung nach 96 h siRNA vermittelter Sec61 α Depletion (s. Abb. IV-04) ergaben sich quasi identische bzw. zueinander passende Resultate:

- (i) Alle drei verwendeten siRNA basierenden *SEC61A* Reduktionsstrategien zeigten ein homogenes Bild, sprich einheitliche Effekte bezüglich der Sec61 α Depletionseffizienz/-kinetik und den daraus resultierenden sekundären Änderungen auf Proteomebene.
- (ii) Durch die Verminderung der zellulären Sec61 α Konzentration kam es zur simultanen Abnahme an Sec61 β , Sec61 γ (Daten der Kinetik nicht gezeigt), ERj1 und Integrin β 1.
- (iii) Unverändert bezüglich ihrer Syntheserate bis 96 h nach Sec61 α Verringerung waren die Proteine Sec62, Sec63, BiP, Grp170, SERCA2, Presenelin1, Grp94 und die ribosomalen Proteine Rpl23a und Rps3 (Daten der Kinetik nicht gezeigt).
- (iv) Mit beginnender Reduktion des Sec61 α Proteingehaltes erhöhte sich die Synthese der beiden SRP Rezeptor Untereinheiten SR α (Daten der Kinetik nicht gezeigt) und SR β .

IV.1.2 Analyse der Zell- und ER-Morphologie nach *SEC61A* „silencing“

Nach Etablierung der adäquaten RNAi-Strategie inklusive der Analysen auf Transkriptom-, Proteom-, Proliferations- und Viabilitätsebene, folgte die Untersuchung der Sec61 α Depletion auch unter morphologischen Aspekten. Dabei wurde das Augenmerk vorrangig auf die Analyse der Zell- und ER-Morphologie gelegt. Dazu wurden drei Methoden verwendet:

- (1) Immunfluoreszenz eines ER Membranproteins (s. Kapitel IV.1.2.1)
- (2) Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung des Zytoskeletts (s. Kapitel IV.1.2.2)
- (3) Elektronenmikroskopie intakter Zellen (s. Kapitel IV.1.2.3)

Im Zuge aller drei methodischen Herangehensweisen wurden stets *SEC61A* siRNA depletierte Zellen mit zugehörigen Kontroll-siRNA behandelten Zellen verglichen.

IV.1.2.1 ER-Morphologie Sec61 α depletierter HeLa-Zellen

Als zentrale Komponente der ER Translokase besitzt Sec61 α das Potential Einfluss auf die Insertion bzw. die Translokation der überwiegenden Mehrzahl ER ständiger Proteine zu nehmen. Unter Beachtung dieses Umstandes stellte sich die Frage einer möglichen Änderung der ER Morphologie in Folge der effizienten *SEC61A* Expressionsreduktion.

Eine erste Analyse der ER Morphologie erfolgte per Immunfluoreszenzmikroskopie permeabilisierter Zellen (Saponin) gegen das ER Membranprotein Sec62 (s. Abb. IV-06A). Sec62 wurde bewusst als Zielprotein der Immunfluoreszenz gewählt, da, wie in Abb. IV-04 zu erkennen ist, dessen relativer Proteingehalt 96 h nach Sec61 α Reduktion nicht verändert war. Zudem zeigt Sec62 eine homogene Verteilung bezüglich glattem und rauem ER und

dient somit als adäquater Indikator für den Verlauf der ER Membran (Meyer *et al.* 2000; Müller *et al.* 2010).

Vergleichbar zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zeigten auch alle drei *SEC61A* siRNA manipulierten Zellen ein ausgeprägtes retikuläres Netzwerk (rotes Fluoreszenzsignal) ausstrahlend von der Kernmembran zur Zellperipherie. Sowohl die ER „Menge“ als auch dessen Verteilung, mit einer Akkumulation um den Nukleus (blaues Fluoreszenzsignal) und zur Zellmembran hin ausdünnend, schien nach Sec61 α Depletion unverändert. Desweiteren blieben auch die Parameter Größe und Form sowie Anzahl der Nukleolie des Zellkerns in den Kontroll- bzw. *SEC61A* siRNA behandelten Zellen unverändert (vgl. Abb. IV-06A).

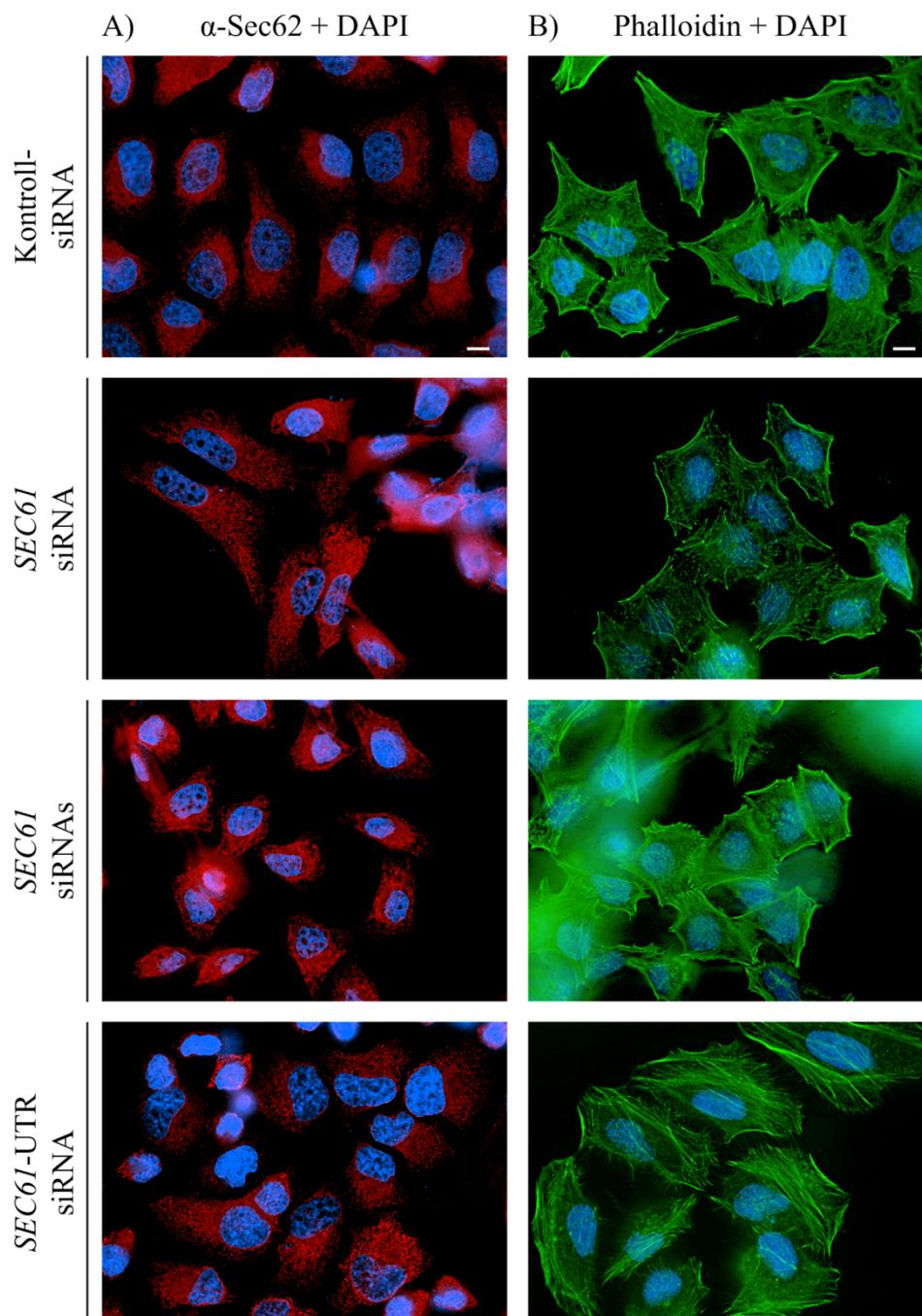


Abb. IV-06: ER- und Zell-Morphologie 96 h nach siRNA vermitteltem *SEC61A* „silencing“

(A) Für die Immunfluoreszenz gegen das ER Membranprotein Sec62 wurden Zellen auf einem Poly-L-Lysin beschichtetem Deckglas ausgesät und für 96 h mit 20 nM Kontroll-siRNA, *SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder einer Kombination beider *SEC61* siRNAs (je 10 nM) behandelt. Nach Fixation mittels Paraformaldehyd (4 %) und Permeabilisierung durch Saponin (0,1 %) erfolgten die Antikörperdekorationen (α -Sec62, α -Kaninchen Alexa 594) und eine DAPI-Färbung. Eingebettete Deckgläser wurden am Fluoreszenzmikroskop mittels DAPI- sowie TexR-Filter mikroskopiert und mit Hilfe der verwendeten NIS Elements AR 3.0 Software einander überlagert (α -Sec62 + DAPI).

(B) Für die Fluoreszenzmikroskopie des Aktin-Zytoskellets wurden Zellen wie unter (A) beschrieben behandelt. Lediglich die Antikörperdekorationen entfielen und stattdessen wurden die Zellen mit Hilfe von FITC-Phalloidin (1:25) gefärbt. Nach DAPI-Färbung und Einbettung des Präparates erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mittels DAPI- und GFP-Filter und die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle (Phalloidin + DAPI). Weiße Balken im ersten Bild jeder Spalte repräsentieren eine Länge von 10 μ m und gelten für alle Bilder der entsprechenden Spalte.

IV.1.2.2 Zytoskelettstruktur Sec61 α depletierter HeLa-Zellen

Da die immunologische Analyse der ER Struktur keinen näheren Aufschluss über eine mögliche Änderung der Zytoskelettstruktur oder der Zellstruktur gab (vgl. Kapitel IV.1.2.1), erfolgte eine FITC-Phalloidin basierende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dieser Größen 96 h nach Sec61 α Depletion (s. Abb. IV-06B).

Auch die Prüfung der Zytoskelettmorphologie ergab keine offensichtliche Änderung beim Vergleich der Kontroll-siRNA und den mit verschiedenen *SEC61A* siRNAs transfizierten Zellen. Zudem demonstrierte die FITC-Phalloidin Analyse durch den oftmals gut erkennbaren Verlauf der Plasmamembran (Aktinfilamente liegen gehäuft an der Plasmamembran) keine besondere Struktur- oder Größendifferenz zwischen den untersuchten Entitäten.

Zusammengenommen lieferten beide fluoreszenzbasierende Methoden keine erkennbare Änderung bezüglich Zell-/Zytoskelett-/ER- oder Kern-Morphologie trotz effizienter Sec61 α Depletion. Dies mag vermutlich zum Teil in der verhältnismäßig geringen Auflösung solch einfacher Mikroskopietechniken begründet liegen. Doch auch deutlich höher aufgelöste Fluoreszenzbilder mittels SIM („structured illumination microscopy“) führten zum identischen Resultat (Daten nicht gezeigt; Stefan Schorr, persönliche Kommunikation).

IV.1.2.3 Ribosomenverteilung Sec61 α depletierter HeLa-Zellen

Die in Zusammenarbeit mit Claudia Schirra (Physiologie, UdS) durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung verfolgte zwei Ziele. Zum Einen wollte man die zuvor unter IV.1.2.1 und IV.1.2.2 demonstrierte Ähnlichkeit Sec61 α depletierter HeLa-Zellen zu den Kontroll-Zellen bezüglich Zellstruktur(-en) bei höherer Auflösung verifizieren. Zum Anderen sollte die *in vitro* etablierte Ribosomenbindungskapazität des Sec61 Komplexes auch *in vivo* bestimmt werden (Raden *et al.* 2000; Song *et al.* 2000; Schaletzky & Rapoport 2006).

Bei der Betrachtung einzelner Zellen wurde darauf geachtet, dass bei niedriger Auflösung sowohl Kern- als auch Plasmamembran zu erkennen sind, welche durch ihre Form und Intaktheit Aufschluss über die Zellviabilität geben. Bei höherer Auflösung wurde der Fokus auf intrazelluläre, ribosomassoziierte Membranen (raues ER) gelegt.

Die nachfolgende Abbildung IV-07 illustriert das Resultat der elektronenmikroskopischen Analyse von HeLa-Zellen 96 h nach deren Transfektion durch verschiedene siRNAs.

Bei einer niedrigen Vergrößerung (23.000x; Abb. IV-07 ober Zeile) zeigten die untersuchten Kontrollzellen und an Sec61 α Protein reduzierten Zellen keine auffällige Änderung in Form oder Ausprägung sowohl der Kern- als auch der Plasmamembran. Desweiteren schienen auch die Organellen, allen voran die leicht identifizierbaren Mitochondrien, in Aussehen und Häufigkeit unverändert. Diese Gesichtspunkte standen somit in Übereinstimmung zur (fast) unveränderten Zellviabilitätsbestimmung (vgl. Abb. IV-03) 96 h nach der *SEC61A* Genexpressionsreduktion. Ebenfalls unverändert nach Sec61 α Depletion erschien auch der Gehalt an Ribosomen, welche als kleine schwarze Punkte zuverlässig zu bestimmen waren. Diese Beobachtung deckt sich mit den unveränderten relativen Proteingehalten ribosomaler Proteine (Rpl23a, Rps3) der Western Blot Analyse (s. Abb. IV-04).

Steigert man allerdings die Auflösung (49.000/68.000x; Abb. IV-07 mittlere/untere Zeile), erkennt man im Detail die *in vitro* postulierte Änderung der Ribosomenverteilung in Abwesenheit des Sec61 α Proteins bzw. des Sec61 Komplexes. Während die Kontroll-siRNA transfizierten Zellen deutliche Membranstrukturen mit assoziierten Ribosomen aufwiesen, wahrscheinlich raues ER, war diese biologische Kenngröße bei Sec61 α depletierten Zellen deutlich gemindert. Stattdessen zeigten sich in selbigen Ansätzen gehäuft Membranstrukturen frei oder nur rar besetzt an Ribosomen (vgl. weiße Pfeilspitzen Kontroll-siRNA und *SEC61* siRNA bzw. *SEC61*-UTR siRNA Abb. IV-07).

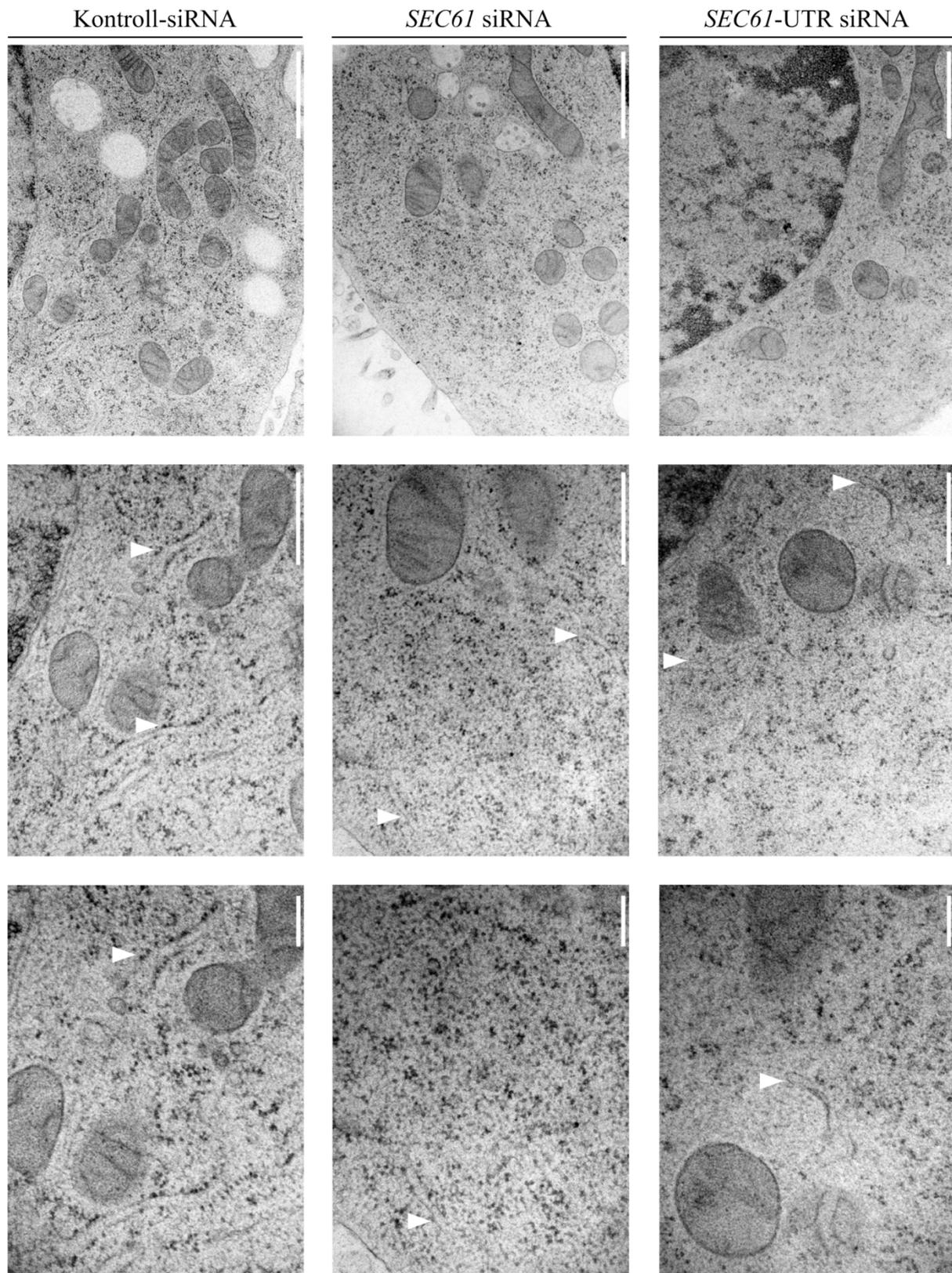


Abb. IV-07: Elektronenmikroskopie 96 h nach siRNA vermittelter *SEC61A* Genexpressionsreduktion
 Transfizierte HeLa-Zellen (Kontroll-siRNA, *SEC61* siRNA oder *SEC61*-UTR siRNA je 20 nM) wurden 96 h nach Anzucht auf Poly-L-Lysin beschichteten Saphirscheiben ($\text{\O} = 1,4 \text{ mm}$) mittels Hochdruckgefrierverfahren (EMPACT2, Leica, Wetzlar) vitrifiziert und nach Kryosubstitution (2 % OsO_4) in Epon-812 eingebettet. Ultradünnschnitte ($\approx 70 \text{ nm}$; EMUC7 Leica, Wetzlar) parallel zum Zellmonolayer wurden auf pioloformbeschichteten Kupfer-Trägerrosten gesammelt, durch Uranylacetat und Bleicitrat

kontrastiert und mittels Tecnai 12 Biotwin EM analysiert (vgl. Edelmann *et al.* 2007; Liu *et al.* 2010). Pro Transfektionsansatz ist eine repräsentative Zelle bei verschiedenen Vergrößerungen gezeigt. Weiße Pfeilspitzen zeigen zu putativen ER Zisternen. Weiße Messbalken entsprechen 1 μm (obere Zeile), 0,5 μm (mittlere Zeile) und 0,2 μm (untere Zeile).

Um diese Differenz der Anzahl membrangebundener Ribosomen zu quantifizieren, wurde in Zusammenarbeit mit Detlef Hof eine auf „EasyCell“ aufbauende Software erarbeitet. Durch die Software erfolgte die Bestimmung der Länge der in einem Bildausschnitt vorgezeichneten Membranen. Mit Hilfe der Anzahl der an dieser Membranlänge gebundenen Ribosomen ergab sich eine Ratio membranassoziierter Ribosompartikel pro 1 μm Membranlänge.

Wie die Grafik IV-08 schließen lässt, war der Gehalt membrangebundener Ribosomen pro 1 μm analysierter (ER-) Membran von rund 17 Ribosomen in Kontroll-siRNA behandelten Zellen auf etwa 7 Ribosomen in den Sec61 α depletierten Zellen abgesunken. Gänzlich unbehandelte Zellen (EM-Bilder nicht gezeigt) waren bezüglich ihrer morphologischen Erscheinung und der Verteilung membrangebundener Ribosomen nicht von Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu unterscheiden (vgl. Abb. IV-08).

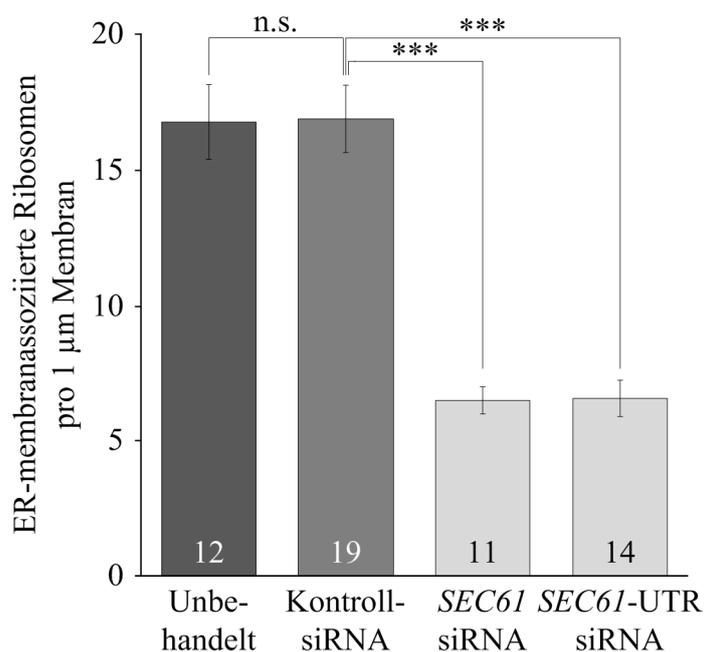


Abb. IV-08: Quantifizierung (ER-) membrangebundener Ribosomen 96 h nach Sec61 α Depletion

Gezeigt ist die mit Hilfe der von Detlef Hof programmierten Software erstellte Analyse der elektronenmikroskopischen Bilder (EM-Bilder) unbehandelte und 96 h transfizierter HeLa-Zellen (vgl. Abb. IV-07). Dazu wurden die manuell eingezeichneten Membranlängen analysierter EM-Bilder berechnet und ins Verhältnis zu der Anzahl daran assoziierter Ribosomen gesetzt deren Distanz zur Membran unter vier Pixeln lag. Der daraus ermittelte, durchschnittliche Quotient membranassoziierter Ribosomen pro 1 μm Membran ist inklusive des zugehörigen Standardfehlers und der Anzahl an analysierten Bildern festgehalten. P-Werte < 0,001 wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. n.s. = nicht signifikant;

n = Anzahl analysierter EM-Bilder

(analysiert wurden für (a) unbehandelt: 578 Ribosomen, 36,2 µm Membran; (b) Kontroll-siRNA: 1319 Ribosomen, 82,5 µm Membran; (c) *SEC61* siRNA: 531 Ribosomen, 69,5 µm Membran und (d) *SEC61*-UTR siRNA: 375 Ribosomen, 55,7 µm Membran)

IV.1.3 Effekte der *SEC61A* Expressionsmodulation auf den Proteintransport ins ER

Zur Untersuchung der Proteintranslokation ins endoplasmatische Retikulum bedurfte es der Etablierung einer geeigneten experimentellen Versuchsanordnung. Analog dem Steckkastenprinzip wurde aus dem der *in vitro* Synthese dienenden Kaninchen-Retikulozytenlysat (= Cytosol) und den intakten Organellen semi-permeabilisierter Zellen (SPZ) eine für verschiedene Belange quasi funktionale Zellen rekonstituiert. Der Vorteil des Systems liegt in der Manipulationsfähigkeit beider Teilkomponenten. Retikulozytenlysat, welches frei an eigenen Organellen und Boten-RNAs ist, kann durch Zugabe der gewünschten mRNA zur *in vitro* Synthese definierter Vorläuferpolypeptide programmiert werden. Durch eine der semi-Permeabilisierung vorangehende, geeignete Manipulationsstrategie (s. Kapitel III.6.3 - III.6.5) können auch die SPZ nach Wunsch beeinflusst werden. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung radioaktiver Aminosäureisotope (z.B. [³⁵S]-Methionin) eine hohe Sensitivität des Auslesesystems.

IV.1.3.1 Einwirkung auf die ER Membraninsertion C-terminal verankerter Substrate

Die spezielle Klasse der Proteine mit lediglich einer am C-Terminus der Polypeptidsequenz gelegenen Transmembrandomäne (= Signalanker) bezeichnet man auch als sogenannte „tail-anchor“ Membranproteine (s. Kapitel II.2.1.3). Solche mit ihrem C-Terminus in der ER Membran verankerten Proteine exponieren ihre die (katalytische) Funktion ausführende N-terminale Domäne stets cytosolisch. Die besondere Konstellation aus (ER-) Membranlokalisation trotz Fehlen einer Signalsequenz während der Proteinsynthese postuliert eine posttranslationale Insertion des terminalen Membranankers (Wang *et al.* 2010; Borgese & Fasana 2011). Aus der Literatur bekannt sind drei verschiedene Zielsteuerungsmechanismen der „tail-anchor“ Membranproteine, unter anderem durch das SRP (Rabu *et al.* 2009). Daher stand die Frage offen, ob auf Grund dieser Analogie zur cotranslationalen Proteininsertion auch im Falle der posttranslationalen Insertion C-terminal verankerter Substrate der Sec61 Komplex als die putative membranständige Integrase fungieren könnte.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden drei verschiedene C-terminal verankerte Substrate auf ihre Membraninsertionsfähigkeit in An- und Abwesenheit des Sec61 Komplexes getestet. Die analysierten Substrate waren Cytochrom b5 (Colombo *et al.* 2009), Sec61 β und Synaptobrevin2 (Rabu *et al.* 2008), welche unterschiedliche Zielsteuerungsmechanismen zur ER Membran beanspruchen (vgl. Kapitel II.2.1.3). Sec61 β (Sec61 β -ops13) kann wie Cytochrom b5 (cytb5-ops28) die Hsp40/Hsc70 Route zur ER Membran verwenden oder aber es wird TRC40 abhängig integriert. Synaptobrevin2 (Syb2-ops13) hingegen wird über den SRP oder TRC40 abhängigen Zielsteuerungsmechanismus zur ER Membran dirigiert. Da alle C-terminal verankerten Proteine nur eine wenige Aminosäuren umfassenden luminalen Rest besitzen, wurde der C-Terminus der Testsubstrate – ohne eine Beeinflussung der Insertionskompetenz (Brambillasca *et al.* 2006) – verlängert, um die Konsensussequenz einer N-Glykosylierungsstelle anzufügen. Dadurch war die korrekte Membraninsertion der „tail-anchor“ Substrate mittels Glykosylierung im Testsystem der SPZ nachvollziehbar.

Alle drei getesteten C-terminal verankerten Membranproteine (cytb5, Syb2 und Sec61 β) wurden ungeachtet des *SEC61A* Genexpressionslevels gleichermaßen effizient glykosyliert, d.h. in die Membran integriert (s. Abb. IV-09). Sowohl Kontroll-siRNA transfizierte SPZ als auch die drei Varianten der siRNA vermittelten *SEC61A* Depletion zeigten eine identische Glykosylierung der „tail-anchor“ Substrate mit etwa 15 % (cytb5), 50 % (Syb2) bzw. 65 % (Sec61 β). Somit schien die effiziente Membraninsertion der Klasse der C-terminal verankerten Proteine unabhängig vom Sec61 Translokasekomplex zu erfolgen.

Das Resultat der Sec61 α unabhängigen Insertion C-terminal verankerter Proteine war unter Beachtung vorheriger Veröffentlichungen nicht unerwartet (Yabal *et al.* 2003; Brambillasca *et al.* 2005). Jedoch war die alternative Interpretation dieses Befundes von ebenso entscheidender Bedeutung. Da alle drei *SEC61A* „silencing“-Strategien 96 h nach der siRNA Transfektion in gleichem Ausmaß wie Kontroll-siRNA behandelte Zellen die „tail-anchor“ Substrate glykosylierten, konnte man auch von einer vergleichbaren ER Membranintegrität betrachteter Proben ausgehen. Nur bei intakter ER Membran ist es der Oligosaccharyltransferase möglich das über Dolicholphosphat membranassoziierte und präassemblierte Oligosaccharid auf Asparaginreste zu übertragen. Folglich ergab sich so die Möglichkeit für alle *in vitro* Synthesen die Menge an zugesetzten Membranen zu vergleichen, da wie gezeigt, die Glykosylierung der C-terminal verankerten Substrate nicht vom Proteingehalt bzw. der Proteinkonstitution der Membran abhängt, sondern lediglich – sofern man sich im linearen Messbereich der Vesikelkonzentration befindet – vom Anteil an der der Reaktion zugesetzten Lipidbilayern (vgl. Abb. IV-09 und Abb. III-01). Man erhielt dadurch „Referenzsubstrate“,

welche als interne Kontrolle der beigefügten Membranmenge fungierten, analog dem immunologischen Nachweis von Referenzproteinen (GAPDH, β -Aktin) bei Western Blots.

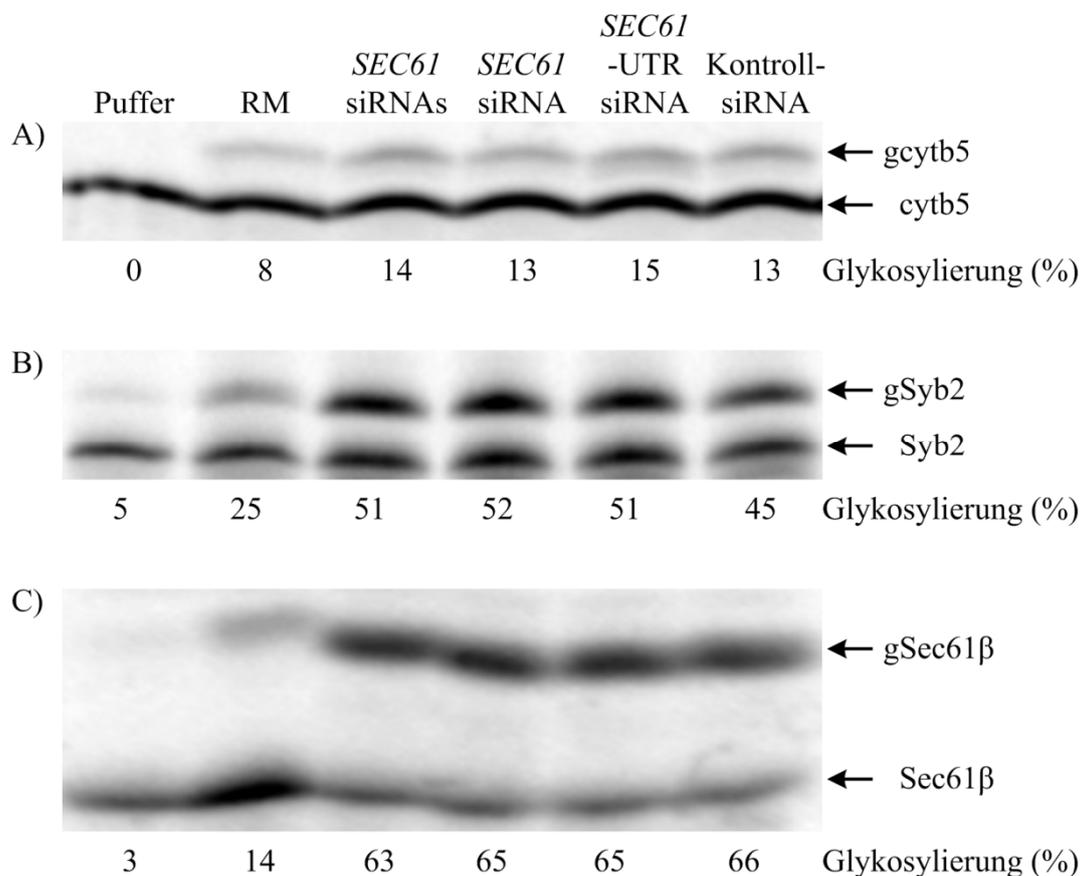


Abb. IV-09: Proteintransport C-terminal verankerter Substrate ins ER 96 h nach Sec61 α Depletion
 96 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 20 nM Kontroll-siRNA, *SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder einer Kombination beider *SEC61A* siRNAs wurden daraus semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter posttranslationalen Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. Nach 15 minütiger *in vitro* Synthese wurde selbige für 30 min ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) inkubiert und anschließend einer SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie unterzogen. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Cytochrom b5 (cytb5), (B) Synaptobrevin2 (Syb2) und (C) Sec61 β . Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form. Beachte, Retikulozytenlysat enthält minimale Mengen an ER Membranen, welche auch in der Pufferkontrolle eine geringe Glykosylierung der Vorläuferproteine katalysieren können.

Da offensichtlich die Membraninsertion der C-terminal verankerten Substrate unabhängig des Sec61 Komplexes erfolgte, sollte auch die Komplementation mit dem *SEC61A* Wildtyp oder *SEC61A-Y344H* Allel im genetischen Hintergrund der Sec61 α Depletion keine Änderung der Glykosylierungseffizienz solcher „tail-anchor“ Substrate bewirken.

Um diese Forderung experimentell zu beweisen, wurde die Insertionskompetenz der C-terminal verankerten Proteine mit dem identischen Versuchskonzept wiederholt. Als ER Fraktion dienten jedoch siRNA transfizierte Zellen, welche durch die vektorgetriebene Genexpression mit wildtypischem oder mutiertem *SEC61A* komplementiert wurden (s. Kapitel III.6.4). Das Resultat der Insertion der „tail-anchor“ Membranproteine in die ER Membran der vier Varianten an kotransfizierten Zellen ist in der nachfolgenden Abbildung IV-10 festgehalten.

Wie erwartet, lieferten auch die komplementierten ER Fraktionen (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp, *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H) eine ebenso effiziente Substratglykosylierung wie zugehörige Kontrollzellen (Kontroll-siRNA + Kontrollplasmid) oder *Sec61α* depletierte Zellen (*SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid). Cytochrom b5 wurde zu ungefähr 13 % glykosyliert (s. Abb. IV-10A), Synaptobrevin2 zu rund 25 % (s. Abb. IV-10B) und *Sec61β* zu knapp 80 % (s. Abb. IV-10C).

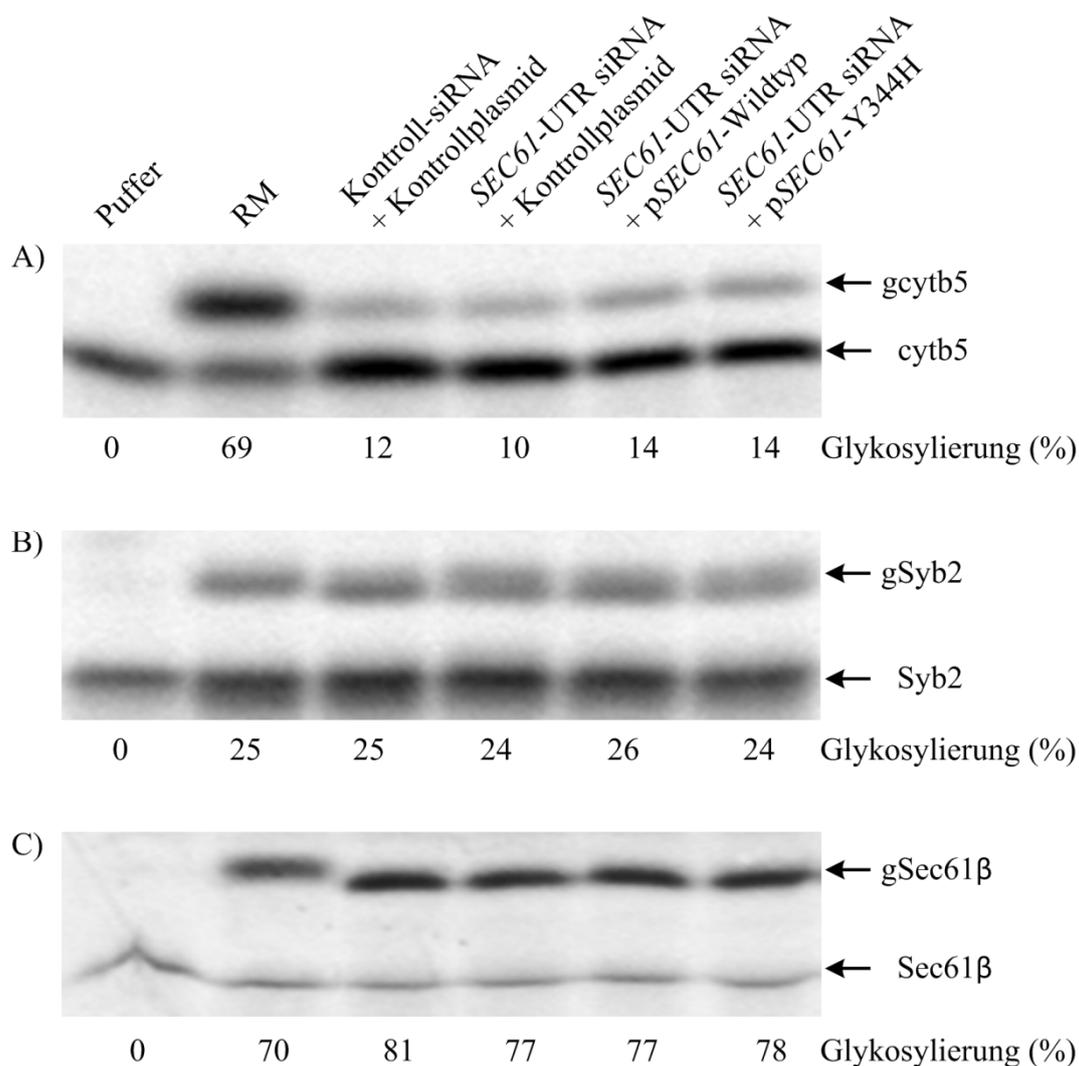


Abb. IV-10: „Tail-anchor“ abhängiger Proteintransport ins ER 96 h nach *Sec61α* Komplementation

32 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 20 nM Kontroll-siRNA oder *SEC61*-UTR siRNA erfolgte eine zusätzliche Plasmidtransfektion mit 4 µg Plasmid. Verwendete Plasmide kodierten kein (Kontrollplasmid), das wildtypische (*pSEC61*-Wildtyp) oder das Diabetes mellitus assoziierte (*pSEC61-Y344H*) *SEC61A* Allel. Nach 96 h wurden semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter post-translationalen Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. Nach 15 min *in vitro* Synthese wurde selbige für 30 min ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) inkubiert und anschließend einer SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie unterzogen. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Cytochrom b5 (cytb5), (B) Synaptobrevin2 und (C) Sec61β. Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form.

Es lies sich aus den Untersuchungen der speziellen Klasse der C-terminal verankerten Membranproteine schlussfolgern, dass

- (i) keine der Plasmidtransfektionen im genetischen Hintergrund der Sec61α Depletion eine Änderung der Glykosylierungseffizienz der „tail-anchor“ Substrate bewirkte.
- (ii) die Membranintegrität auch nach einer zusätzlichen Plasmidtransfektion, welche unter Verwendung eines weiteren Transfektionsreagenz (vgl. Kapitel III.6.3 und III.6.4) erfolgte, weiterhin gewährleistet blieb.
- (iii) die Glykosylierungsaktivität der Oligosaccharyltransferase durch keine der (Ko-) Transfektionsmethoden beeinflusst wurde.

Als nächstes rückte die Analyse der Substrate mit N-terminaler Signalsequenz (vgl. Kapitel II.2.1.1 und II.2.1.2) in den Fokus. Zeigt diese Proteinklasse die zu erwartende Abhängigkeit ihres Proteintransportes von der Schlüsselkomponente der Translokase, dem Sec61α Protein?

IV.1.3.2 Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER Sec61α depletierter Zellen

Um die Beeinflussung des signalpeptidabhängigen Proteintransportes ins ER in Abhängigkeit des Expressionsgrades an *SEC61A* zu bestimmen, wurden mit Hilfe der zuvor beschriebenen Versuchsanordnung ein Set diverser *in vitro* synthetisierter Modellsubstrate getestet. Dabei wurde die Transportaktivität von Kontroll- bzw. *SEC61A* siRNA behandelten Zellen 96 h nach Transfektion bestimmt und verglichen. Neben Präprolaktin (ppl) wurden zusätzlich weitere Typen an Modellsubstraten getestet. Diese umfassten in der ersten Instanz das ebenfalls sekretorische PräprocecropinA (ppcecA), die membranständige invariante Kette des humanen Klasse II Haupthistokompatibilitätskomplexes (ivc) und das ER luminal lokalisierte lösliche ERj3 Protein.

Die Translokation oder Insertion der Vorläufersubstrate konnte mit Hilfe zwei verschiedener, ausschließlich ER luminal katalysierter, posttranslationaler Modifikationen verfolgt werden. Geeignete Modellsubstrate waren entweder durch eine abspaltbare Signalsequenz oder/und durch ein glykosylierbares Sequon charakterisiert. Während sich das Molekulargewicht eines Vorläufersubstrates beim Abspalten seiner Signalsequenz durch den Enzymkomplex Signalpeptidase verringerte, führte die an Asparaginresten erfolgende Anheftung eines vorgefertigten Oligosaccharids durch die heteromultimere Oligosaccharyltransferase zur Erhöhung der molekularen Masse. Beide Modifikationen resultierten in einer detektierbaren Änderung des Laufverhaltens des transportierten Modellsubstrates nach der SDS-PAGE.

Abbildung IV-11A demonstriert die strikte Abhängigkeit des zu transportierenden Substrates Präprolaktin vom Sec61 Komplex bzw. der kanalbildenden Sec61 α Untereinheit. Beide Positivkontrollen (SPZ aus Kontroll-siRNA transfizierten Zellen und raue Mikrosomen) gaben eine deutliche Transporteffizienz (33 % bzw. 65 %) an Hand der Abspaltung der Signalsequenz und der Proteinase K Resistenz der reifen Prolaktin (pl) Form zu erkennen. Im Gegensatz dazu war das Translokationsvermögen der drei Varianten Sec61 α depletierter SPZ genau wie das der Negativkontrolle (Puffer) für Präprolaktin gleich null.

Ein ähnliches Ergebnis zeichnete sich auch bei Betrachtung der Translokation des posttranslational transportierten Substrates PräprocecropinA ab. Hier war die Reduktion des ppcecA Transports in Folge der Sec61 α Depletion jedoch weniger stark ausgeprägt als zuvor für Präprolaktin beobachtet. Im gezeigten Fall (Abb. IV-11B) sank die Transportrate ermittelt aus der verminderten Prozessierung von 17 % der Kontrollzellen auf etwa 4 % der Sec61 α depletierten Zellen ab. Was allerdings bei Betrachtung der Pufferkontrolle mit 3 % Prozessierung als deutliche Minderung der Translokation angesehen werden konnte.

Zudem zeigte sich die verminderte Transportkompetenz der Sec61 α defizienten SPZ Typen auch bei Analyse der Translokation oder Membraninsertion mittels Glykosylierung. In Anwesenheit der Kontroll-siRNA behandelten SPZ wurde die invariante Kette glykosyliert (40 %, Abb. IV-11C) und teilweise durch die gegen die zugesetzte Protease abschirmende ER Membran geschützt. In Gegenwart der *SEC61A* siRNA transfizierten Zellen wurde die *ivc* deutlich weniger effizient glykosyliert (durchschnittlich 10 %) auf Grund der verminderten Membraninsertion.

In vergleichbarem Umfang zu ppl war auch die Translokation des ERj3 Vorläuferproteins bei Reduktion des Expressionslevels an *SEC61A* nach siRNA Behandlung drastisch reduziert auf Werte ≤ 10 % (s. Abb. IV-11D). Zugehörige Kontroll-siRNA manipulierte SPZ konnten das ERj3 Protein jedoch sehr effizient zu gezeigten 70 % glykosylieren, also transportieren.

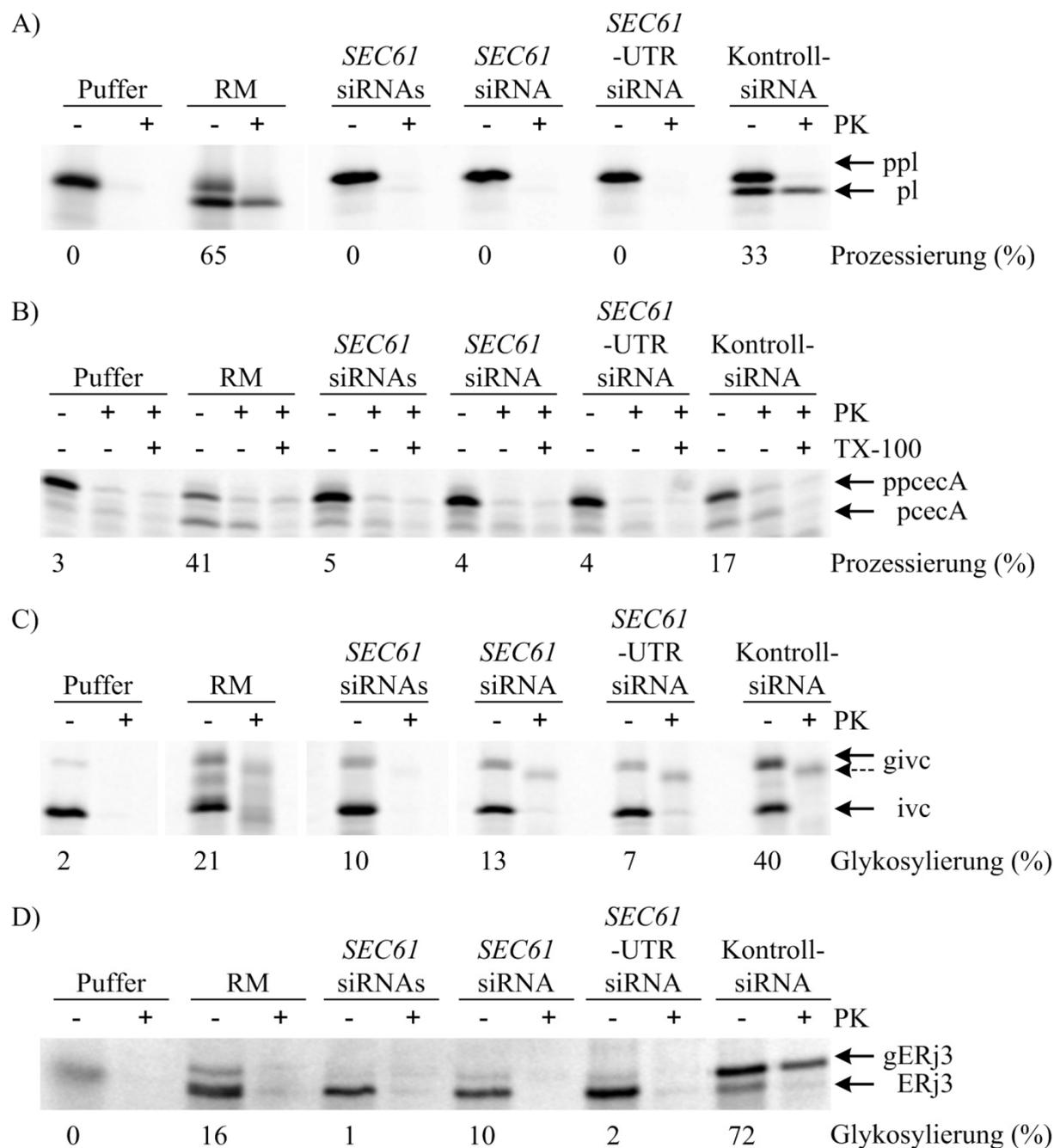


Abb. IV-11: Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER 96 h nach *Sec61α* Depletion (Teil 1)
 96 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 20 nM Kontroll-siRNA, *SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder einer Kombination beider *SEC61A* siRNAs wurden daraus semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter co- (A, C und D) oder posttranslationalen (B) Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. *In vitro* Synthesen ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) wurden einer Proteinase K (PK) Proteolyse (= Sequestrierung) mit anschließender SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie unterzogen. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Präprolaktin (ppl), (B) mutiertes PräprocecropinA (ppcecA), (C) prä-MHC Klasse II invariante Kette (ivc) und (D) ERj3. Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (prozessierte oder glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form. Beachte, Retikulozytenlysate enthält minimale Mengen an ER Membranen, welche auch in der Pufferkontrolle eine geringe Prozessierung der Vorläuferproteine katalysieren können.

RM = raue Mikrosomen; TX-100 = Triton X-100 (Detergenz)

Alle in Abbildung IV-11 illustrierten Substrate zeigten eine verminderte Proteintransportrate in Gegenwart der durch die siRNA Behandlung an Sec61 α reduzierten semi-permeabilisierten Zellen. Der Nachweis der geminderten Proteintransporteffizienz war ungeachtet des Transportmodus (cotranslational oder posttranslational) oder der Modifikation (Prozessierung bzw. Glykosylierung) des betrachteten Vorläuferpolypeptids nachweisbar.

Darüber hinaus wurden weitere Substrate bezüglich ihrer Translokationskompetenz in Abhängigkeit des Sec61 α Proteins untersucht. Bei den nachfolgenden Substraten wurde im gezeigten Gelausschnitt (s. Abb. IV-12) auf die Sequestrierung (s. Kapitel III.4.3) verzichtet.

Beide zu sezernierenden Proteine Präproinsulin (ppinsulin) und der Hefe Präpro- α -Faktor (pp α F) zeigten ungeachtet der im ER katalysierten posttranslationalen Modifikation eine reduzierte Translokation nach dem „silencing“ des *SEC61A* (s. Abb. IV-12A, B). Bei Präproinsulin sank die Transporteffizienz von 65 % für Kontroll-siRNA behandelte SPZ auf rund 26 % in Gegenwart der Sec61 α depletierten ER Fraktionen. Für den pp α F, war die Reduktion der Transportrate weniger deutlich ausgeprägt. Die Werte fielen von 24 % in den Kontrollzellen auf Werte zwischen 9 % (*SEC61* siRNAs) und 17 % (*SEC61*-UTR siRNA).

Das polytope Membranprotein Aquaporin2 (AQP2) wurde im ER der Kontrollzellen zu 36 % glykosyliert, was unter den gegebenen Bedingungen mit Insertion in die ER Membran zu interpretieren war. Im Gegensatz dazu wurde in den drei Typen Sec61 α depletierter Zellen AQP2 lediglich zu 12 - 15 % inseriert (s. Abb. IV-12C). Auffällig ist hier die schlechte Synthese des Vorläuferproteins AQP2 in Abwesenheit jeglicher Membranen (Puffer).

Teil D und E der Abbildung IV-12 legen die Translokation der Serpine (**Ser**in-**P**rotease **I**nhibitoren) α_1 -Antichymotrypsin (α_1 -ACT) und der krankheitsassoziierten Z-Variante des α_1 -Antitrypsins (α_1 -AT (Z*)) dar. Beide Akute-Phase-Proteine sind Glykoproteine, welche im Zuge eines Entzündungsprozesses vermehrt von der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert werden. α_1 -ACT zeigte, mit starken Schwankungen einhergehend, eine mehr oder weniger ausgeprägte Abhängigkeit seiner Translokation vom Proteinlevel an Sec61 α . Für das gezeigte Gelbild (s. Abb. IV-12D) ergab sich eine Reduktion der Glykosylierung des α_1 -ACT von 36 % der Kontrollzellen auf etwa 15 % in *SEC61A* siRNA transfizierten SPZ. Dieses deutliche Bild der Sec61 α abhängigen Translokation des α_1 -ACT konnte jedoch nicht schlüssig verifiziert werden (vgl. Tab. IV-01). Interessanterweise ergab sich bei Analyse der Translokation des zweiten Akute-Phase-Proteins α_1 -AT (Z*) ein sehr deutliches Bild. α_1 -AT (Z*) wurde mehrfach *unabhängig* des Grades der *SEC61A* Expression ins ER Lumen transloziert. Abb. IV-12E wies die vergleichbare Glykosylierung des α_1 -AT (Z*) in Kontroll- oder *SEC61A* siRNA behandelten Zellen mit Effizienzen um 80 % auf.

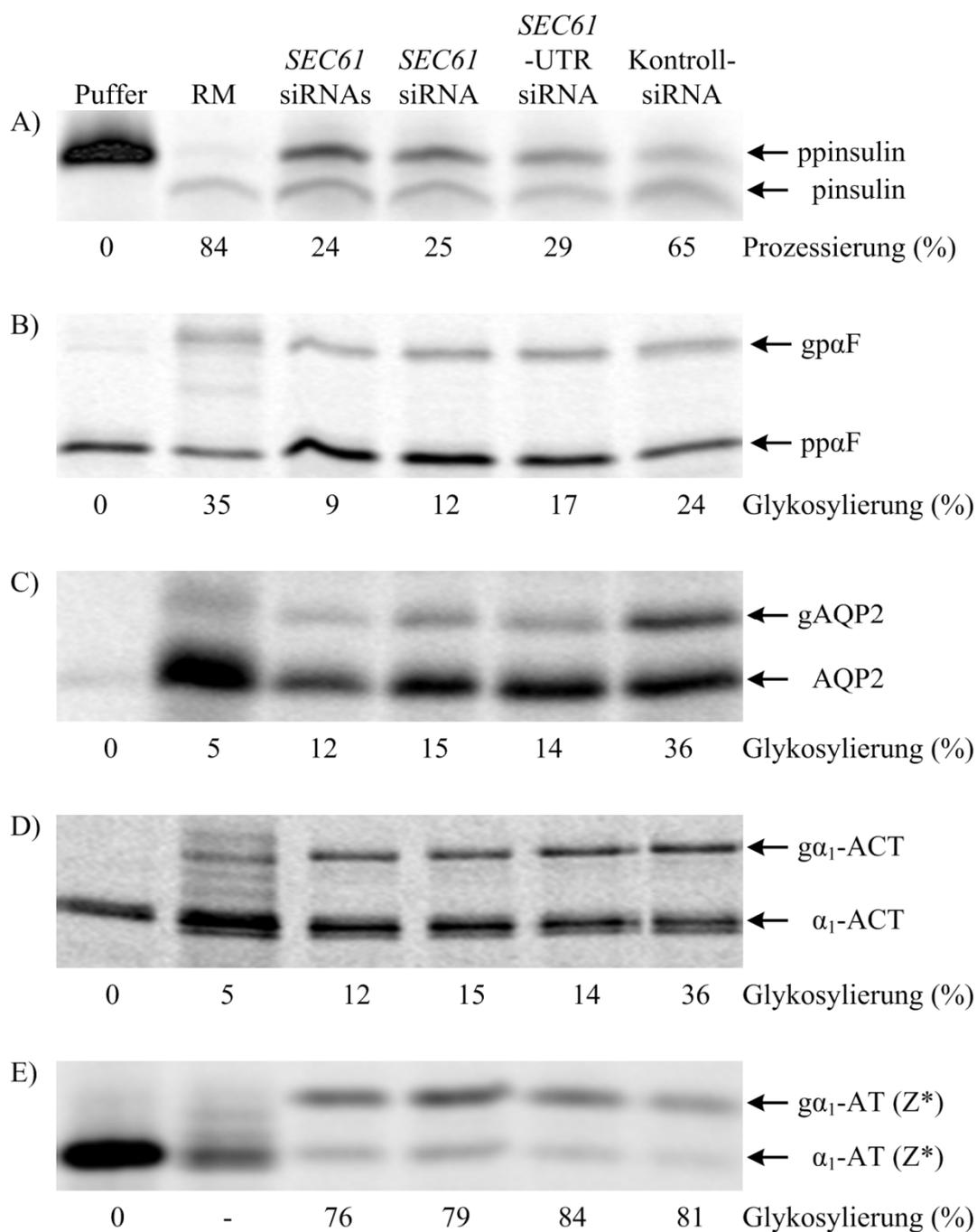


Abb. IV-12: Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER 96 h nach Sec61 α Depletion (Teil 2)

96 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 20 nM Kontroll-siRNA, *SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder einer Kombination beider *SEC61A* siRNAs wurden daraus semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter cotranslationalen Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. Nach der *in vitro* Synthese ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) erfolgte die SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie der Proben. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Präproinsulin (ppinsulin), (B) Präpro- α -Faktor (pp α F), (C) Aquaporin2 (AQP2), (D) α_1 -Antichymotrypsin (α_1 -ACT) und (E) Z-Variante des α_1 -Antitrypsins (α_1 -AT (Z*)).

Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (prozessierte bzw. glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form.

Betrachtet man zusammenfassend die durchgeführten *in vitro* Transporte der Abbildungen IV-11 und IV-12 ergaben sich neben den bereits beschriebenen Schlussfolgerungen zwei weitere Auffälligkeiten:

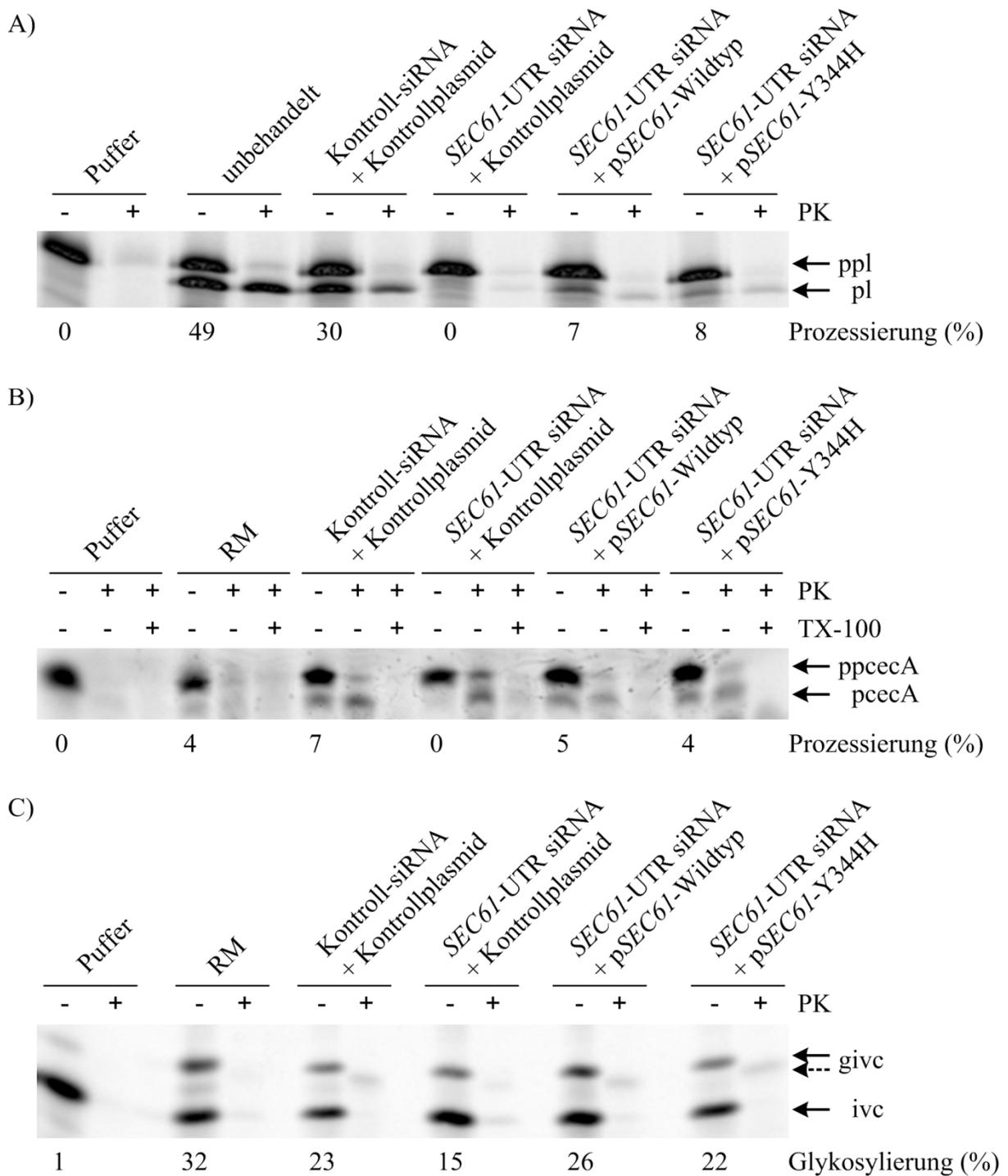
- (i) Zum Einen zeigte sich, dass die unterschiedlichen Substrate mit variabler Effizienz in das ER Lumen transloziert werden bzw., bei Betrachtung von Membranproteinen, in die Membran des endoplasmatischen Retikulums inseriert werden. Die Transportraten Kontroll-siRNA behandelter Zellen schwankten dabei zwischen ungefähr 15 % (PräprocecropinA) und rund 80 % (Z-Variante des α_1 -Antitrypsins).
- (ii) Zum Anderen erlauben die durchgeführten *in vitro* Synthesen diverser Modellproteine den Rückschluss, dass die Translokation einiger Substrate (z.B. Präprolaktin, PräprocecropinA oder ERj3) stärker von der Sec61 α Depletion betroffen war als der Transport anderer Substrate (z.B. Präpro- α -Faktor, Z-Variante des α_1 -Antitrypsins).

Nachdem bereits mit Hilfe der C-terminal verankerten Substrate die Membranintegrität und Glykosylierungskompetenz der *SEC61A* komplementierten Zellen demonstriert werden konnte (s. Abb. IV-10), drängte sich die Frage auf, ob die Komplementation auch funktionaler Natur sei. Ist die im Western Blot detektierte wiederkehrende *SEC61A*-Expression (s. Abb. IV-04) fähig Sec61 α abhängige Transportsubstrate zu transportieren? D.h. waren die komplementierten Zellen in der Lage quantitativ und qualitativ ausreichend Sec61 α Moleküle zu synthetisieren, welche den durch die Sec61 α Depletion eingeschränkten Proteintransport signalpeptidabhängiger Substrate rückgängig machen könnten? Um somit das Verständnis der Sec61 α abhängigen Proteintranslokation weiter zu vertiefen und gleichzeitig die durch die *SEC61*-UTR siRNA vermittelte Proteindepletion gewonnenen Daten zu verifizieren, sollte dieser genetische Hintergrund durch die plasmidgebundene Expression des *SEC61A1* Wildtyp Gens oder des *SEC61A1-Y344H* Allels komplementiert werden.

Daher wurde in analoger Weise wie zuvor mit Hilfe der Kombination aus Retikulozytenlysat und semi-permeabilisierten Zellen die Proteintranslokation signalpeptidabhängiger Substrate in das endoplasmatische Retikulum der verschiedenen *SEC61A* komplementierten Zellen studiert.

IV.1.3.3 Einfluss der *SEC61A* Komplementation auf den signalpeptidabhängigen Proteintransport ins ER

Die nachfolgende Abbildung IV-13 veranschaulicht die Funktionalität der vektorbasierenden *SEC61A* Komplementationen für die vier verschiedenen signalpeptidabhängigen Substrate Präprolaktin (ppl), PräprocecropinA (ppcecA), invariante Kette (ivc) und ERj3 (vgl. Kapitel IV.1.3.2).



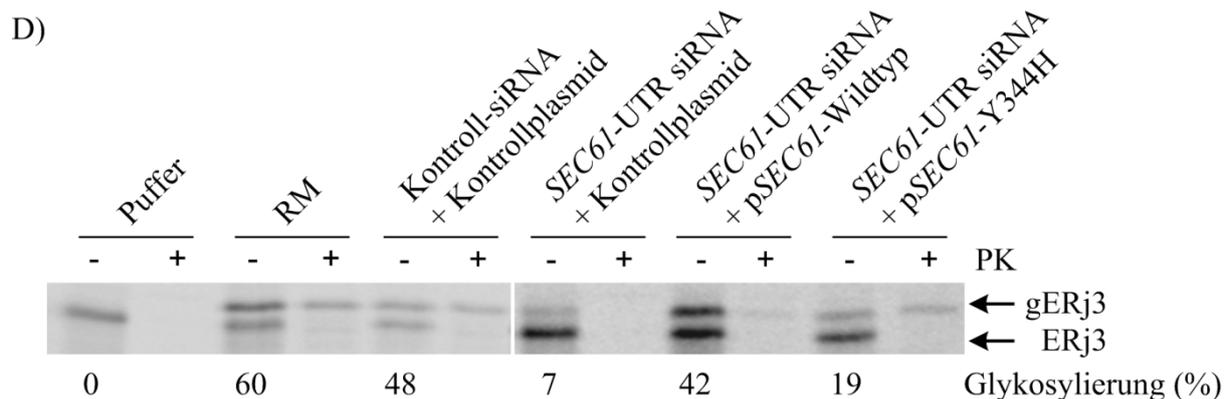


Abb. IV-13: Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER 96 h nach *Sec61 α* Komplementation
 32 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 20 nM Kontroll-siRNA oder *SEC61*-UTR siRNA erfolgte eine zusätzliche Plasmidtransfektion mit 4 μ g Plasmid. Verwendete Plasmide kodierten kein (Kontrollplasmid), das wildtypische (p*SEC61*-Wildtyp) oder das Diabetes mellitus assoziierte (p*SEC61*-Y344H) *SEC61A* Allel. Nach 96 h wurden semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter co- (A, C und D) oder posttranslationalen (B) Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. *In vitro* Synthesen ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) wurden einer Proteinase K (PK) Proteolyse (= Sequestrierung) mit anschließender SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie unterzogen. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Präprolaktin (ppl), (B) mutiertes PräprocecropinA (ppcecA), (C) prä-MHC Klasse II invariante Kette (ivc) und (D) ERj3. Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (prozessierte bzw. glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form. Beachte, Retikulozytenlysate enthält minimale Mengen an ER Membranen, welche auch in der Pufferkontrolle eine geringe Prozessierung der Vorläuferproteine katalysieren können. RM = raue Mikrosomen; TX-100 = Triton X-100 (Detergenz)

Wie Teil A der Abbildung IV-13 zu erkennen gibt, konnte die starke Reduktion der ppl Translokation nach siRNA vermittelter *Sec61 α* Depletion (*SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid) sowohl durch die Komplementation mit wildtypischem (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp) und mutiertem *SEC61A* (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H) partiell revertiert werden von 0 % auf Werte von 7 % bzw. 8 % Prozessierung. Beide *SEC61A* Varianten zeigten demnach, verglichen mit der 30 %igen Prozessierung des ppl der Kontrollzellen (Kontroll-siRNA + Kontrollplasmid), eine zumindest teilweise Rettung der *Sec61 α* basierenden Transportdefizienz.

Die Analyse des posttranslationalen Transports mittels des Modellsubstrates ppcecA (s. Abb. IV-13B) lieferte ein ähnliches Resultat. Auch im Falle der posttranslationalen Proteintranslokation kam es durch die vektorgestützte Expression der *SEC61A* Allele in *Sec61 α* depletierten Zellen zu einer teilweisen Rettung der *Sec61 α* abhängigen ppcecA Translokation. Während Kontrollzellen eine ppcecA Prozessierung von 7 % aufwiesen, zeigten *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid behandelte Zellen keine ppcecA Prozessierung. Bei Expression des wildtypischen oder mutierten (Y344H) *SEC61A* Gens

steigerte sich der ppcecA Transport wieder auf Werte von 5 % oder 4 %. [Die Doppelbande in der Proteinase K Spur im Ansatz der *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid behandelten Zellen wurde bei der Analyse vernachlässigt, da das Bandenmuster nicht in Relation zur zugehörigen Synthespur in Abwesenheit von Proteinase K und Triton X-100 steht.]

Auch bei Analyse der Proteintranslokation mittels Glykosylierung zeigte die vektorgestützte Expression der *SEC61A* Varianten im Sec61 α depletierten Hintergrund die (teilweise) Wiederaufnahme des Proteintransportes des Modellsubstrates *ivc*. Bedingt durch die in der Abb. IV-13C gezeigte verhältnismäßig schwache Transporteffizienz der Kontrollzellen von nur 23 %, äußerte sich die erwartete, reduzierte Transporteffizienz nach Sec61 α Depletion der *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid transfizierten Zellen mit 15 % nur relativ schwach (vgl. Abb. IV-11 mit 40 % versus 7 %). Folgerichtig erschien auf Grund der geringen Transporteffizienz der Kontrollzellen die ansonsten immer nur als partielle Komplementation zu erkennende Steigerung der Proteintranslokation (nur) im gezeigten Experiment als vollständige Rettung des Substrattransportes auf Werte von 26 % bzw. 22 % für die Ergänzung mit dem wildtypischen oder mutanten *SEC61A* Allel.

Das zweite analysierte ER luminale Glykoprotein ERj3 (s. Abb. IV-13D) zeigte nach Sec61 α Depletion (*SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid) eine Reduktion der Translokation auf 7 % gegenüber zugehörigen Kontrollzellen (Kontroll-siRNA + Kontrollplasmid), welche fast 50 % des synthetisierten Vorläufers translozieren. Ein interessanter Unterschied zeigte sich beim Vergleich der ERj3 Translokationsrate der *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp und den *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H komplementierten Zellen. In Gegenwart des mutierten Sec61 α Proteins erwies sich die ERj3 Translokation mit lediglich 19 % deutlich ineffizienter als in Anwesenheit des Wildtyp *SEC61A* Allels (42 % Glykosylierung).

Die Untersuchung der Proteintranslokationsfähigkeit der zusätzlich zur siRNA Behandlung mit Plasmid transfizierten Zellen erlaubte mehrere Rückschlüsse. Wie die Western Blot Bestimmungen zuvor zeigten, waren beide Komplementationsansätze mit *SEC61A* und *SEC61A*-Y344H nur partiell (s. Abb. IV-04), mit einem relativen Sec61 α Proteingehalt von knapp 60 %. Passend dazu zeigten auch die Transportstudien nur eine teilweise Genesung der Proteintranslokation nach Komplementation mit denen für *SEC61A* oder *SEC61A*-Y344H kodierenden Vektoren. Dennoch zeugt dieses Ergebnis nicht nur von der Funktionalität der gesamten Versuchsanordnung inklusive der diffizilen Zellmanipulation, sondern v.a. von der Funktionalität der vom plasmidkodierten Gen ausgehend synthetisierten Sec61 α Varianten.

IV.1.3.4 Zusammenfassung der Effekte der *SEC61A* Expressionsmodulation auf den Proteintransport ins ER

Da alle in den Abbildungen IV-09 bis IV-13 gezeigten *in vitro* Synthesen nur eine Momentaufnahme eines Einzelexperiments repräsentieren, wurden, um eine statistisch relevante und signifikante Aussagekraft zumindest zu ermöglichen, die Transportexperimente diverser Substrate mit den unterschiedlichen Zelltypen mehrfach wiederholt und tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. IV-01).

Die in der nachfolgenden Tabelle IV-01 aufgelisteten Vorläufersubstrate sind unter dem Aspekt ihres Transportmodus (co- oder posttranslational) gegliedert. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten des Kapitels IV.1.3 für die Einzelexperimente beschrieben, zeigte sich auch bei mehrfacher Ausführung der verwendeten Vorläufersubstrate die gleiche Tendenz. Das bedeutet allgemein für die gewählte Versuchsstrategie, dass beide ausschließlich im ER Lumen katalysierten Modifikationen von Vorläufersubstraten, die Signalsequenzabspaltung und/oder Glykosylierung, ein geeignetes Auslesesystem zur Quantifizierung des Proteintransports diverser Modellssubstrate repräsentierten. Die analysierten Substrate lassen sich bezüglich ihrer Abhängigkeit von der Abundanz und des „Typs“ der Translokase in verschiedene Klassen unterteilen.

- (i) Die Modellssubstrate ppl, ivc und AQP2 waren nach Depletion des Sec61 α Proteins deutlich in ihrer Translokationseigenschaft gehemmt, welche jedoch sowohl durch die Expression mit *SEC61A* oder *SEC61A-Y344H* partiell wiederhergestellt wurde. Gleiches wäre vermutlich auch für pp α F gültig, wobei dieses Substrat bisher nicht in den Komplementationsexperimenten getestet wurde.
- (ii) Auch die löslichen Substrate ERj3, ppinsulin und ppcecA waren zur effizienten Translokation auf den wildtypischen Sec61 Komplex angewiesen. Die Expression des *SEC61A* im depletierten genetischen Hintergrund führte vor allem bei ERj3 und ppcecA zu einer erkennbar besseren Rettung der Proteintranslokation als die Expression des *SEC61A-Y344H*.
- (iii) Analyisierte „tail-anchor“ Membranproteine cytb5, Syb2 und Sec61 β inserierten völlig unabhängig des *SEC61A* (bzw. *SEC61A-Y344H*) Expressionsgrades.
- (iv) Die Serpine α_1 -ACT und α_1 -AT (Z*) sind noch nicht schlüssig zuzuordnen. Beide Substrate schienen – unerwarteterweise – zur effizienten Translokation kaum oder gar nicht auf die Assistenz des Sec61 Komplexes angewiesen. Der hohe Standardfehler bei α_1 -AT (Z*) ist ebenfalls ungewöhnlich.

Tab. IV-01: Transporteffizienz unterschiedlicher, semi-permeabilisierter Zellen 96 h nach *SEC61A* Expressionsmodulation

Die angegebenen absoluten Prozessierungseffizienzen (Signalsequenzabspaltung für ppl, ppinsulin, ppcecA und Glykosylierung für sonstige) bezeichnen den Mittelwert mit Standardfehler (n ist gegeben in Klammern). [€] = signifikanter Unterschied der Kontroll-siRNA zu *SEC61A1* siRNA Behandlungen; [\$] = signifikanter Unterschied der *SEC61A1* siRNA Behandlungen zur p*SEC61*-WT Komplementation; [n.s.] = kein signifikanter Unterschied der getesteten Zellmanipulationen; # = Membranprotein; ## = „tail-anchor“ Membranprotein; n.d. = nicht determiniert (weitere Abkürzungen sind dem Text zu entnehmen)

Vorläufer -substrat	Kontroll- siRNA	<i>SEC61</i> siRNAs	<i>SEC61</i> siRNA	<i>SEC61</i> -UTR siRNA	<i>SEC61</i> -UTR siRNA + p <i>SEC61</i> -WT	<i>SEC61</i> -UTR siRNA + p <i>SEC61</i> -Y344H
Cotranslationaler Transport						
ppl [€\$]	27 ± 3 (10)	1 ± 0 (9)	2 ± 1 (6)	1 ± 1 (9)	7 ± 1 (4)	7 ± 3 (4)
#ivc [€\$]	45 ± 2 (5)	10 ± 1 (4)	12 ± 2 (5)	12 ± 3 (5)	27 ± 5 (3)	23 ± 1 (2)
ERj3 [€\$]	69 ± 8 (4)	3 ± 1 (4)	7 ± 2 (4)	3 ± 1 (4)	41 ± 11 (5)	19 ± 9 (5)
#AQP2 [€\$]	34 ± 2 (2)	13 ± 1 (2)	14 ± 1 (2)	12 ± 2 (2)	23 ± 0 (2)	26 ± 4 (2)
ppinsulin	65 (1)	24 (1)	25 (1)	29 (1)	75 ± 8 (2)	65 ± 11 (2)
ppαF [€]	30 ± 5 (7)	14 ± 4 (7)	19 ± 5 (4)	19 ± 3 (6)	n.d.	n.d.
α ₁ -ACT [n.s.]	29 ± 8 (3)	18 ± 4 (3)	18 ± 5 (3)	25 ± 8 (3)	n.d.	n.d.
α ₁ -AT (Z*) [n.s.]	66 ± 15 (3)	59 ± 21 (3)	60 ± 20 (3)	61 ± 22 (3)	n.d.	n.d.
Posttranslatinaler Transport						
ppcecA [€\$]	12 ± 2 (6)	2 ± 1 (7)	3 ± 1 (7)	2 ± 0 (7)	9 ± 3 (4)	5 ± 1 (4)
##cytb5 [n.s.]	16 ± 2 (9)	15 ± 3 (9)	15 ± 1 (9)	15 ± 2 (9)	17 ± 2 (3)	16 ± 2 (3)
##Syb2 [n.s.]	27 ± 4 (8)	31 ± 4 (8)	28 ± 5 (8)	27 ± 5 (8)	33 ± 5 (4)	35 ± 7 (4)
##Sec61β [n.s.]	73 ± 2 (7)	74 ± 4 (6)	72 ± 4 (7)	72 ± 3 (7)	72 ± 0 (2)	77 ± 5 (2)

IV.1.4 Einfluss der *SEC61A* Expressionsmodulation auf die Ca^{2+} -Homöostase

Nachdem bereits durch die elektronenmikroskopische Analyse (Abb. IV-07) und die Proteintransportexperimente (s. Tab. IV-01) zwei auf *in vitro* Daten basierende Funktionen der Mammalia ER Translokase im Zellsystem (d. h. im Zellverband immortalisierter Zellen) verifiziert wurden, wollte man mit Hilfe der siRNA vermittelten Sec61 α Depletionsstrategien weitere potentielle translokonassoziierte Funktionen charakterisieren. Unter Berücksichtigung mehrerer Teilaspekte erschien die mögliche Beteiligung des Sec61 Komplexes an der zellulären Ca^{2+} -Homöostase, oder einfacher gedacht an einer Ionenpermeabilität, als plausibel. Erste Hinweise und indirekte Evidenzen konkludieren aus folgenden Sachverhalten und Überlegungen:

- (i) Der Sec61 Komplex ist ein aktivierbarer, fluktuierender Kanal der ER Membran mit einem Öffnungsdiameter bis zu 60 Å (Hamman *et al.* 1997; Wirth *et al.* 2003). Dieser Durchmesser ist weitaus genügend, um sämtliche biologisch relevanten Ionen passieren zu lassen, selbst in Gegenwart eines translozierenden Polypeptids. (Durchmesser einer α -Helix: 10 - 12 Å; Durchmesser eines hydratisierten Kalziumions: 2,5 Å).
- (ii) Der gereinigte und in einem Lipidbilayer rekonstituierte Sec61 Komplex besitzt eine Leitfähigkeit für diverse Ionen (K^+ , Cl^- und Ca^{2+}), welche durch den bekannten Ca^{2+} -Kanalblocker Lanthan beeinflusst werden kann (Erdmann *et al.* 2009).
- (iii) Das endoplasmatische Retikulum selbst dient mit seinem großen Volumen, zahlreichen kalziumbindenden Proteinen und den Ca^{2+} -transportierenden Ca^{2+} -ATPasen als Hauptkalziumspeicher/-umschlagspunkt vieler eukaryotischer Zellen (Clapham 2007).
- (iv) Arbeiten mit diversen Proteinsyntheseinhibitoren, welche über das Ribosom vermittelt indirekten Einfluss auf die (Öffnungswahrscheinlichkeit der) ER Translokase nehmen, beschrieben selbige als Ca^{2+} -permeablen Kanal (Lomax *et al.* 2002; Van Coppenolle *et al.* 2004; Flourakis *et al.* 2006; Giunti *et al.* 2007; Ong *et al.* 2007; Amer *et al.* 2009)
- (v) Eine genomweite, RNAi basierende Suche nach Einflussgrößen des kapazitiven Kalziumeinstroms (CCE) identifizierte das Drosophilaortholog des Sec61 α Proteins als putativen Kandidaten (Zhang *et al.* 2006), und somit indirekt als potentiellen Ca^{2+} -Kanal.

Das bereits unter Methoden beschriebene Ca^{2+} -„imaging“ (s. Kapitel III.6.9.4) wurde in Kollaboration mit Adolfo Cavalié (Pharmakologie, UdS) etabliert. Alle folgenden Messungen zur Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase erfolgten nach Beladung intakter, lebendiger HeLa-Zellen mit dem sensitiven Ca^{2+} -Indikatormolekül Fura-2 AM.

IV.1.4.1 *Status quo* des Kalziumgehaltes behandelter/manipulierter HeLa-Zellen

Eine determinierende Größe bei Messungen intrazellulärer Kalziumfluktuationen ist der Gesamtkalziumgehalt einer Zelle vor Applikation eines die Kalziumströme verändernden Agens. Mit der Änderung des Kalziumhaushaltes geht eine nicht vorhersagbare Variabilität der Reaktion dieser Zelle auf zuvor erwähnte Agenzien einher. Um diesem die Ergebnisinterpretation erschwerenden Umstand vorzubeugen, wurde zunächst mit Hilfe des Kalziumionophores Ionomycin die Auswirkung aller durchgeführten Zellbehandlungen auf den Gesamtkalziumgehalt ermittelt (s. Kapitel III.6.9.4 C). Die Zellbehandlungen erfolgten entweder auf pharmakologische Art durch Substanzen wie Puromycin, DTT bzw. Tunicamycin oder durch Nukleinsäuremoleküle (siRNAs oder Plasmide) zur RNA Interferenz bzw. Genexpression.

In der Regel wurden die aus den Ca^{2+} -Messungen resultierenden Ratiowerte durch eine vorherige Kalibrierung der Fura-2 Messungen (s. Kapitel III.6.9.5) in reale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen umgerechnet. Dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Messungen (mit zwei verschiedenen Polychromatoren durchgeführt; vgl. Kapitel III.6.9.5). Da aber maximale Ratiowerte der nachfolgenden Ionomycinmessungen hoch lagen (im Maximalbereich der Detektionsskala), war eine Umrechnung in Ca^{2+} -Konzentrationen für Ionomycinmessungen nicht sinnvoll und wurde nicht durchgeführt.

Zunächst wurde die Bestimmung des zellulären Kalziumgehaltes für Kontrollzellen und Zellen 96 h nach den diversen Sec61 α gerichteten Zellmanipulationsstrategien („silencing“ oder Komplementation) durchgeführt. Das Resultat dieser Messungen ist in Abbildung IV-14 illustriert.

In Ca^{2+} -freier Lösung befindliche Kontroll-siRNA transfizierte Zellen zeigten eine Ratiodifferenz um 1000, welche sich unverständlicherweise nach einer zweiminütigen Inkubation mit 500 μM Puromycin leicht erhöhte auf rund 1130 Δ Ratio (s. Abb. IV-14). Da die Zellen sich während der laufenden Messung in Ca^{2+} -freier Lösung befinden ist eine Erhöhung ihres Ca^{2+} -Spiegels nach Puromycinapplikation nicht denkbar. Die durch Puromycin hervorgerufene Freisetzung naszierender Polypeptidketten vom Ribosom könnte unter diesen experimentellen Rahmenbedingungen entweder zu einem Verlust oder einer intrazellulären Umverteilung an Ca^{2+} führen.

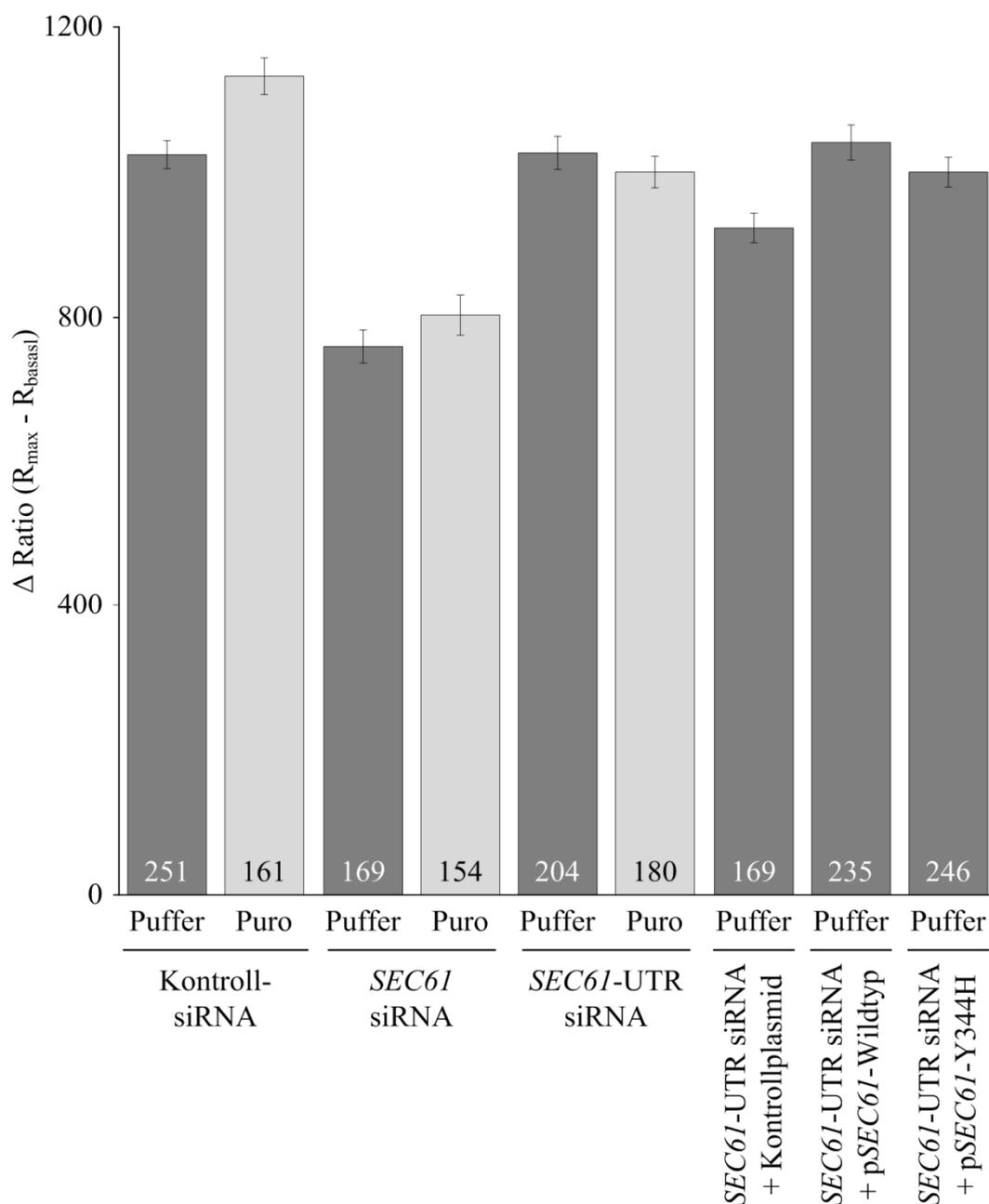


Abb. IV-14: Kalziumgehalt 96 h nach *SEC61A* Reduktion/Komplementation

Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 20 nM Kontroll-, *SEC61* oder *SEC61-UTR* siRNA transfiziert. 32 h nach Behandlung mit *SEC61-UTR* siRNA erfolgte ggf. eine zusätzliche Plasmidtransfektion mit 4 µg Plasmid. Verwendete Plasmide kodierten kein (Kontrollplasmid), das wildtypische (p*SEC61*-Wildtyp) oder das Diabetes mellitus assoziierte (p*SEC61*-Y344H) *SEC61A* Allel. Nach der in Medium durchgeführten 45 minütigen Beladung der Zellen bei RT mit 4 µM Fura-2 AM wurden die Zellen in Ca²⁺-freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und nach 1 min mit Puffer oder 500 µM Puromycin (Puro) behandelt. Nach weiteren 2 min wurde 5 µM Ionomycin verabreicht. Dargestellt ist die Differenz (Δ Ratio) aus maximaler Ratio nach Ionomycin Behandlung (R_{max}) und der basalen Ratio vor Applikation (R_{basal}). Dargestellt sind Mittelwerte inklusive dem Standardfehler und der Anzahl analysierter Einzelzellen.

Dass die Puromycingabe keinen Einfluss auf den Ca^{2+} -Gehalt nahm, demonstrierten die ermittelten Fluoreszenzintensitätsdifferenzen *SEC61* oder *SEC61*-UTR siRNA behandelte Zellen. In beiden Fällen waren die Werte mit oder ohne Puromycinvorbehandlung (2 min) identisch. Während die Δ Ratiowerte für die *SEC61* siRNA manipulierten Zellen mit 780 Δ Ratio knapp ein Viertel unter dem Wert der Kontrollzellen lagen, wiesen die mit der *SEC61*-UTR siRNA behandelten Zellen eine vergleichbare Menge an Ca^{2+} -Ionen auf nach 96 h Sec61 α Depletion (vgl. Abb. IV-14).

Zudem musste man auch für die Komplementationsexperimente der *SEC61A* insuffizienten Zellen vorab den Kalziumgehalt bestimmen, welcher ebenfalls in Abbildung IV-14 gezeigt ist. Ähnlich den *SEC61*-UTR siRNA behandelten Zellen wiesen auch die zusätzlich mit einem Kontrollplasmid transfizierten Zellen (*SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid) mit knapp 930 Δ Ratio eine höhere Ca^{2+} -Beladung als *SEC61* siRNA behandelte Zellen auf, und lagen nur knapp unter den Werten der Kontrollzellen. Die Komplementation mit einem der beiden kodierenden Vektoren (p*SEC61*-Wildtyp oder p*SEC61*-Y344H) im genetischen Hintergrund der siRNA vermittelten Sec61 α Depletion hatte keinerlei Einfluss auf das Quantum an intrazellulären Kalziumionen. Beide komplementierten Zelltypen lagen mit Ratioidifferenzen von 1040 (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp) und 1000 (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H) im Bereich der Kontrollzellen.

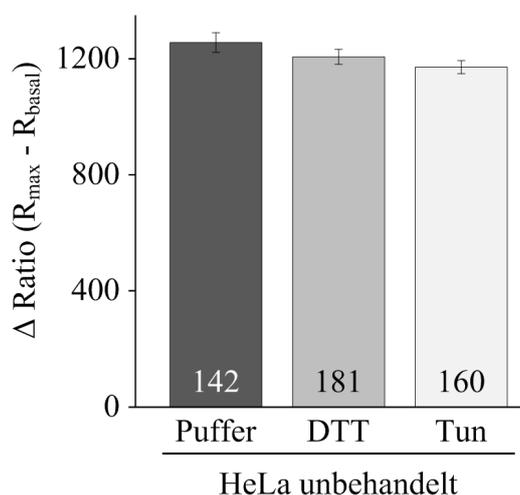


Abb. IV-15: Einfluss verschiedener Faltungsantagonisten auf den zellulären Kalziumgehalt
96 h auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultivierte HeLa-Zellen wurden in Medium für 45 min bei RT mit Fura-2 AM (4 μM) beladen. Anschließend wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und nach 1 min mit Puffer, 1 mM DTT oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Tun) behandelt. Nach weiteren 3 min wurde 5 μM Ionomycin verabreicht. Dargestellt ist die Differenz (Δ Ratio) aus maximaler Ratio nach Ionomycin Behandlung (R_{max}) und der basalen Ratio vor Applikation (R_{basal}). Dargestellt sind Mittelwerte inklusive dem Standardfehler und der Anzahl analysierter Einzelzellen.

Neben der Auswirkung des Proteinsyntheseinhibitors Puromycin auf den zellulären Ca^{2+} -Pegel wurden auch die durch DTT und Tunicamycin verursachten Wechselwirkungen auf Ebene der Ca^{2+} -Homöostase untersucht. Wie zuvor erfolgte zunächst die Prüfung der Einwirkung beider Faltungsantagonisten auf den durch Ionomycin „aktivierbaren“ Kalziumpool.

Wie Abbildung IV-15 zusammenfasst, riefen weder das reduzierende Dithiothreitol (DTT, auch Clelands Reagenz genannt) noch das die N-Glykosylierung inhibierende Tunicamycin (Tun) große Änderungen des freisetzbaren Ca^{2+} -Gehaltes im Vergleich zu Kontrollzellen (Puffer) hervor. Die unbehandelten HeLa-Zellen lieferten ungeachtet der dreiminütigen Präinkubation in Puffer, DTT oder Tun vor Ionomycingabe eine durchschnittliche Ratioidifferenz von 1200.

Zusammengenommen konnte man feststellen, dass keine der verwendeten Substanzen Puromycin, DTT oder Tunicamycin innerhalb des getesteten Zeitfensters von zwei bzw. drei Minuten zu massiven Änderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Levels führt. Mit Ausnahme der Reduktion des Ca^{2+} -Pools durch die viertägige *SEC61* siRNA Behandlung blieben weitere siRNA und Plasmid basierende Strategien zur Manipulationen der *SEC61A* Expression im gleichen Zeitfenster ohne großen Einfluss auf das Kontingent zellulär gespeicherter Ca^{2+} -Ionen (vgl. Abb. IV-14 und Abb. IV-15).

IV.1.4.2 Die ER Translokase als potentielle passive Ca^{2+} -permeabler Pore

Wie bereits einleitend zu Kapitel IV.1.4 beschrieben, wollte man mit Hilfe der etablierten *Sec61 α* Depletions- und Komplementationsstrategie die vermutete Beteiligung der ER Translokase am Ca^{2+} -„leakage“ Phänomen, also dem permanenten, passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER höherer eukaryotischer Zellen, sicher dem *Sec61* Komplexes zuschreiben.

Die gewählte Vorgehensweise umfasste die siRNA und Plasmid basierende Möglichkeit der *SEC61A* Expressionsmodulation in Kombination mit dem Proteinsyntheseinhibitor Puromycin. Die zu Grunde liegende Überlegung war, dass Puromycin durch seine Analogie zum 5'-Ende des Akzeptorarms beladener tRNAs zur einer Freisetzung naszierender Polypeptidketten von synthetisierenden Ribosomen führt. Diese zeitgleiche Freisetzung vieler naszierender Ketten – auch von den über den *Sec61* Komplex an die ER Membran assoziierten Ribosomen (vgl. Abb. IV-07) – führt zu einer kurzzeitig offenen, möglicherweise für Ionen permeablen, Translokase. Durch den persistierenden Ca^{2+} -Gradienten zwischen ER

Lumen und Cytosol, könnte solch ein geöffnetes Translokation den Efflux an Ca^{2+} -Ionen entlang des Gradienten gestatten. Die damit verbundene Minderung der ER luminalen Ca^{2+} -Konzentration sollte sich, theoretisch, in einer Dezimierung des durch Thapsigargin visualisierbaren (demaskierten) Ca^{2+} -Leckstroms nachweisen lassen (Camello *et al.* 2002; Van Coppenolle *et al.* 2004). Thapsigargin (TG) stört durch die irreversible Hemmung der ER membranständigen Ca^{2+} -ATPasen der SERCA-Familie das dynamische Equilibrium aus passivem Ca^{2+} -Efflux (vermittelt durch Ca^{2+} -permeable Kanäle) und aktivem Kalziumrücktransport (via SERCA). Somit wird die Komponente des Ca^{2+} -Ausstroms demaskiert, d.h. im Zuge von Ca^{2+} -„imaging“ Experimenten detektierbar (Thastrup *et al.* 1990; 1994).

Zunächst wurde diese durch Puromycin bedingte Verminderung des passiven Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER an Hand unbehandelter und Kontroll-siRNA behandelter HeLa-Zellen demonstriert (s. Abb. IV-16A und B), welche passend zu den bereits analysierten Phänotypen der *SEC61A1* „silencing“-Experimente für 96 h mit oder ohne siRNA kultiviert wurden. In beiden Fällen führte eine zweiminütige Präinkubation mit 500 μM Puromycin (rote Kurven) gegenüber einer passenden Pufferapplikation (blaue Kurven) zu einer Senkung des durch TG demaskierten Ca^{2+} -Effluxes von ≈ 550 nM Ca^{2+} auf 365 nM (vgl. auch Abb. III-08).

Die gleiche experimentelle Herangehensweise in Kombination mit den per siRNA Behandlung für 96 h an Sec61 α depletierten HeLa-Zellen (s. Abb. IV-16C-E) führte in allen drei Sec61 α Depletionsstrategien (*SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA oder die Kombination beider gegen *SEC61A* gerichteter siRNAs) zu zwei identischen Unterschieden im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die durch TG provozierte maximale Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$), also der demaskierte Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER, war nach Reduktion der *SEC61A* Expression deutlich gemindert (*SEC61* siRNA: 240 nM; *SEC61*-UTR siRNA: 280 nM; *SEC61* siRNAs: 175 nM). Der zweite Unterschied zu Kontrollzellen war die fehlende Reaktion der Sec61 α depletierten Zellen auf die Vorbehandlung durch Puromycin. Nach Reduktion des Sec61 Komplexes verlor Puromycin seine Wirkungsweise, sodass blaue (ohne Puromycin) und rote Kurven (mit Puromycin) der zugehörigen Diagramme IV-16 C-E fast deckungsgleich verliefen und nahezu identische Amplituden aufwiesen nach Thapsigargingabe.

Darüber hinaus führte auch die Transfektion der *SEC61*-UTR siRNA behandelten Zellen mit dem Kontrollplasmid zum gleichen Resultat. Die durch TG bedingte Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration belief sich in Abwesenheit von Puromycin auf 225 nM und dessen Gegenwart auf 215 nM (s. Abb. IV-16F).

Zur weiteren Unterstreichung, dass beide Effekte – die Reduktion des Ca^{2+} -Ausstroms und die Insensitivität auf die Puromycinvorbehandlung – auf Ebene des Sec61 Komplexes entspringen und auf dessen Reduktion zurückzuführen sind, wurden zusätzlich drei Kontrollexperimente durchgeführt:

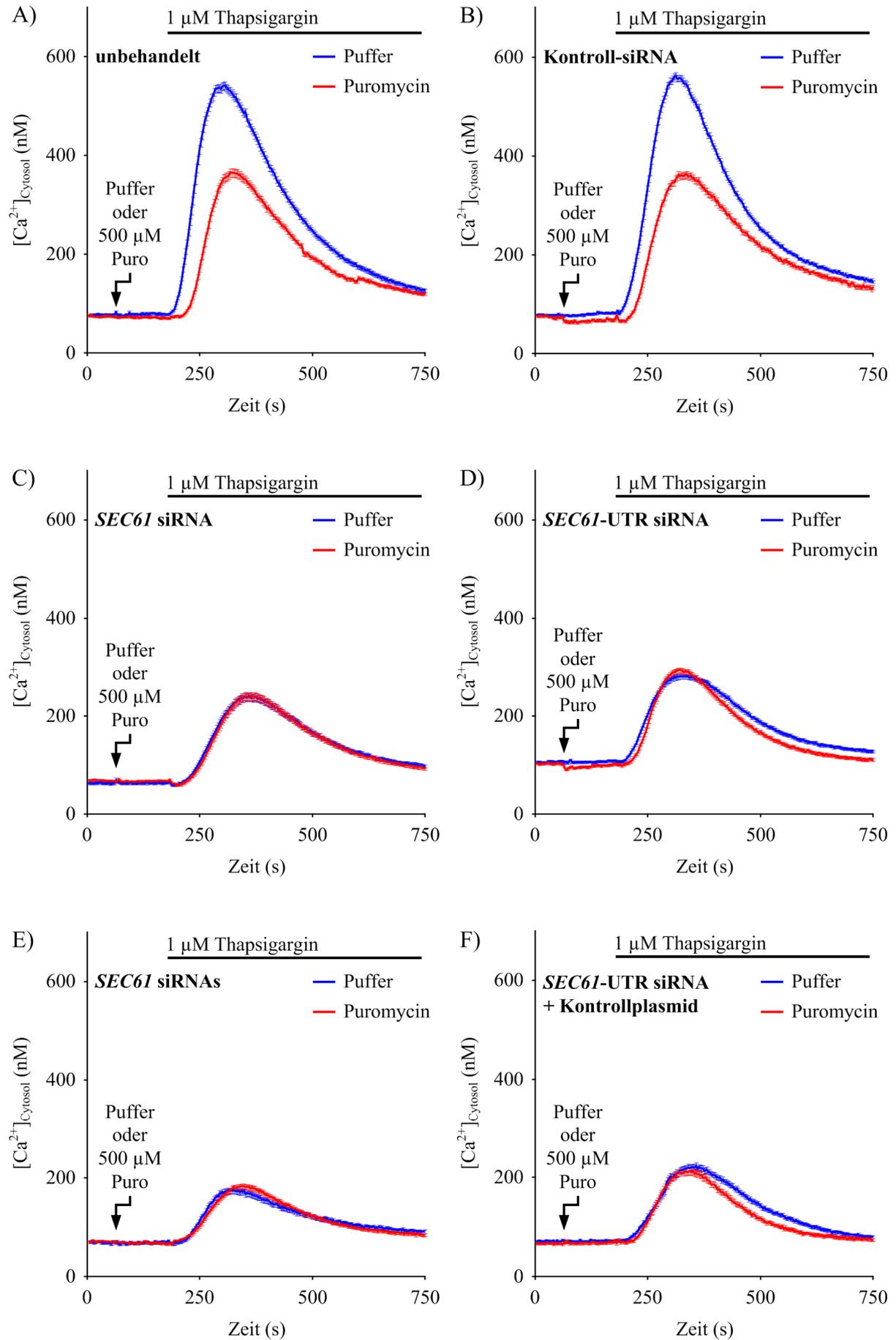
- (1) Die Komplementation der *SEC61*-UTR siRNA Zellen mit dem *SEC61A* kodierenden Plasmid (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61A*-Wildtyp) steigerte nicht nur wieder die *SEC61A* Expression von 18 % auf 61 % (vgl. Abb. IV-16J), sondern auch die TG evozierte Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ auf einen Maximalwert von 475 nM. Die Steigerung des Gehaltes an Sec61 α Molekülen ging auch mit der Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber Puromycin einher. Durch die Puromycininkubation stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ nach Applikation von TG nur noch auf 314 nM (s. Abb. IV-16G).
- (2) Um auszuschließen, dass das ebenfalls durch die Sec61 α Depletion reduzierte ER Membranprotein ERj1 (vgl. Abb. IV-04) als Ca^{2+} -permeabler Kanal fungiert, wurde über eine passende siRNA Strategie die Expression des *ERJ1* Gens direkt gemindert, ohne dabei den Expressionsgrad des Sec61 Komplexes zu betreffen (Daten nicht gezeigt; Johanna Dudek, persönliche Kommunikation). HeLa-Zellen mit einem ERj1 Restproteingehalt von 12 % nach ebenfalls 96 stündiger siRNA Behandlung (s. Abb. IV-16J, hellgrauer Balken) – einem Wert der noch unter dem ERj1 Gehalt Sec61 α depletierter Zellen lag ($\approx 35 - 40 \%$) – führte zu keinerlei Beeinflussung des passiven Ca^{2+} -Ausstroms des ER. Zudem hatte die gedämpfte Expression des *ERJ1* keine ausgedehnte Auswirkung auf die puromycinbedingte Reduktion der TG-Antwort. Gemessene Maxima der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ lagen bei 576 nM (Puffer) bzw. bei 375 nM (Puromycin) nach der TG-Applikation.
- (3) Ein letztes Kontrollexperiment mit 96 h kultivierten HeLa-Zellen verifizierte den direkten Zusammenhang der durch Puromycin katalysierten Freisetzung naszierender Ketten und den damit verbundenen Einfluss auf das passive Ca^{2+} -„leakage“. Abbildung IV-16I zeigt, dass eine 45 minütige Präinkubation mit Emetin parallel zur Fura-2 AM Beladung keine Änderung des durch TG visualisierten Ca^{2+} -Effluxes bewirkt. Das globale Maximum der Amplitude liegt bei 522 nM, ein Wert vergleichbar zu dem von unbehandelten Zellen (vgl. Abb. IV-16A und I blaue Linien). Emetin repräsentiert ebenso wie Puromycin einen Proteinsyntheseinhibitor. Im Gegensatz zu Puromycin bewirkt Emetin nicht die Entlassung naszierender Polypeptidketten, sondern resultiert in einem Elongationsarrest der Proteinsynthese. D.h. die in Synthese befindlichen Polypeptide verharren gebunden über eine tRNA im Peptidyltransferasezentrum am Ribosom. Durch einen solchen vorausgehenden Arrest der Proteinbiogenese ist es

Puromycin nicht mehr möglich (auf Ebene des Sec61 Komplexes) in Synthese befindliche Polypeptidketten vom Ribosom zu lösen und bleibt somit ohne Auswirkung auf den durch TG demaskierten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER. Trotz Puromycingabe ergab die Bestimmung der maximalen Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ nach TG-Applikation auf Grund der Vorbehandlung mit Emetin einen Wert von 502 nM.

Zuletzt wurden für alle siRNA vermittelten Depletionsstrategien auch die jeweiligen in den Ca^{2+} -„imaging“ Experimenten erreichten Restproteingehalte bestimmt (s. Abb. IV-16J). Die an β -Aktin angeglichen und zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisierten Daten zeigen einen Gehalt an Sec61 α von $15 \pm 4 \%$ ($n = 11$; *SEC61* siRNA), $14 \pm 2 \%$ ($n = 11$; *SEC61*-UTR siRNA), $8 \pm 2 \%$ ($n = 13$; *SEC61* siRNAs), $18 \pm 3 \%$ ($n = 8$; *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid) oder $61 \pm 6 \%$ ($n = 7$; *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp). Die Reduktion an ERj1 durch die *ERJ1* siRNA Transfektion belief sich auf $12 \pm 2 \%$ ($n = 11$). Alle unbehandelten oder behandelten HeLa-Zellen wurden für 96 h kultiviert.

Darüber hinaus kann auch ein Blick auf die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$, der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor Zugabe jeglicher Einflussgrößen, einen ersten Hinweis auf Störungen oder Beeinflussungen der Ca^{2+} -Homöostase liefern. Während dieser Wert sich sowohl bei unbehandelten, Kontroll-siRNA und den verschiedenen *SEC61A* siRNA behandelten Zellen im Bereich von etwa 70 - 95 nM bewegte, lag er bei den ERj1 depletierten Zellen mit 125 nM leicht über dem in der Literatur angegebenen Wert von 50 - 100 nM.

In Kurzform zusammengefasst, bestätigt Abbildung IV-16 sowohl auf direktem (Sec61 α Depletion und Komplementation) als auch auf indirektem (Puromycin und Emetin) Wege die in der Literatur postulierte Position der ER Translokase als den für den passiven Ca^{2+} -Efflux aus dem ER verantwortlichen Ionenkanal. Erst nach deutlicher Reduktion des Sec61 α Proteingehaltes verringerte sich der durch TG demaskierte Ca^{2+} -Efflux, wohingegen unter diesen Bedingungen die vorherige Puromycinapplikation keine weitere Verringerung des Ca^{2+} -Ausstroms mehr bewirkte. Die teilweise Wiederherstellung der *SEC61A* Expression im Zuge der Komplementation führte nicht nur zu einer partiellen Genesung des passiven Ca^{2+} -Effluxes, sondern auch zu einer wieder gesteigerten Puromycinsensitivität.



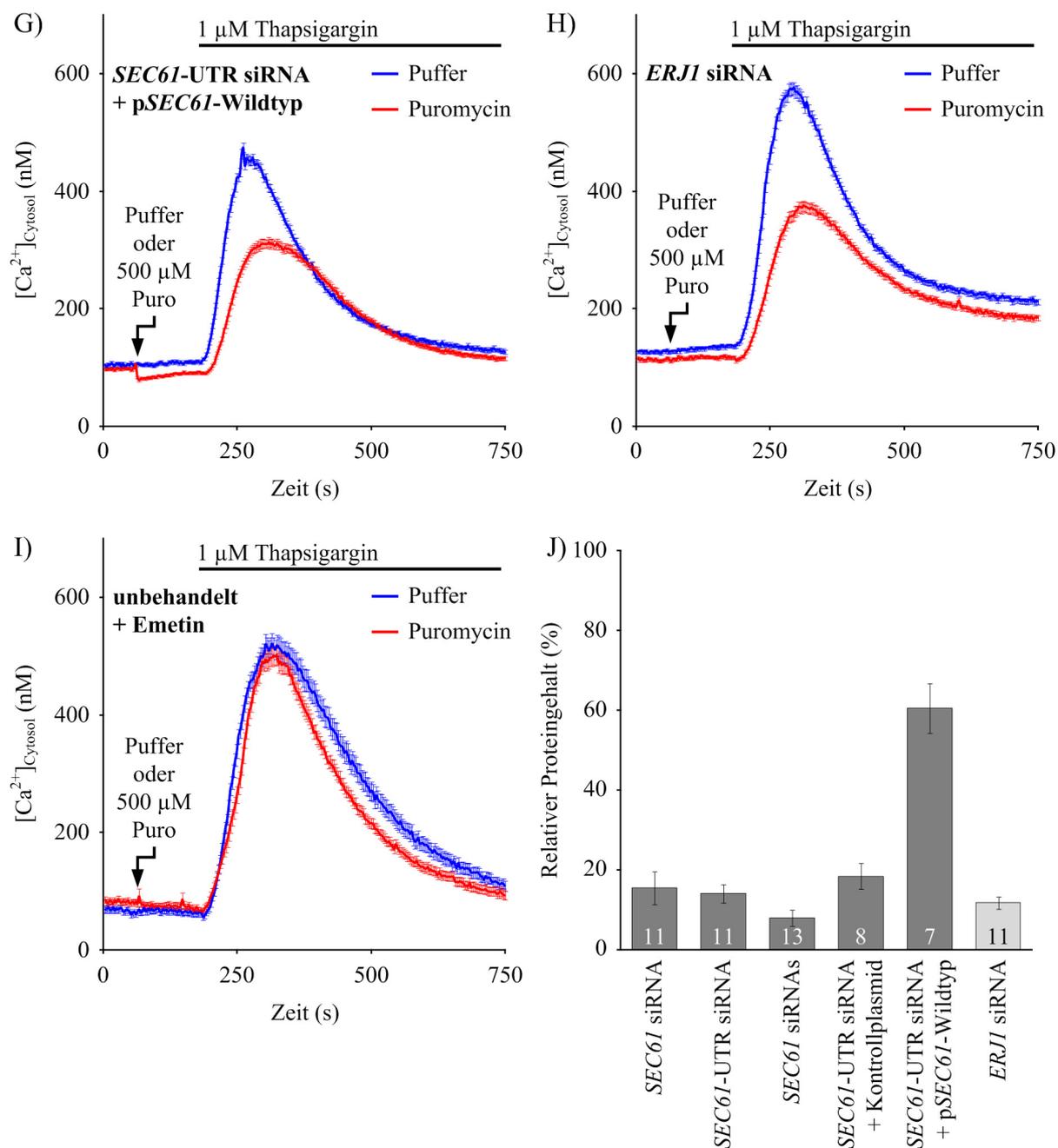


Abb. IV-16: Einfluss der *SEC61A* Reduktion/Komplementation auf den passiven Ca²⁺-Efflux aus dem ER. Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultivierte HeLa-Zellen (A, I) wurden für 96 h mit 20 nM Kontroll-siRNA (B), *SEC61* siRNA (C), *SEC61-UTR* siRNA (D), einer Kombination beider *SEC61A* siRNAs (E) oder 25 nM *ERJ1* siRNA (H) behandelt. 32 h nach Behandlung mit *SEC61-UTR* siRNA erfolgte eine Kotransfektion mit 4 µg Kontrollplasmid (F) oder einem *SEC61A* exprimierenden Vektor (G). Nach der in Medium durchgeführten 45 minütigen Beladung der Zellen bei RT mit 4 µM Fura-2 AM wurden die Zellen in Ca²⁺-freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops gespannt und nach 1 min mit Puffer oder 500 µM Puromycin (Puro) behandelt. Nach 3 min wurde durch die Gabe von 1 µM Thapsigargin die Ca²⁺-Freisetzung initiiert (A-I). (I) HeLa-Zellen wurden parallel zur Fura-2 AM Beladung mit 100 µM Emetin inkubiert. (J) Relative Restproteingehalte wurden per Western Blot mit Hilfe Sec61α (dunkelgrau) oder ERj1 (hellgrau) spezifischer Antikörper im Abgleich zu β-Aktin Signalen ermittelt und gegen Kontroll-siRNA transfizierte Zellen normalisiert. Diagramme zeigen den Mittelwert inklusive Fehlerbalken (Standardfehler) und gegebenenfalls (J) die Anzahl analysierter Western Blots.

Zur Veranschaulichung wurden die Differenzen aus der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung nach und der basalen Ca^{2+} -Konzentration vor TG-Applikation ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) mit oder ohne Puromycinvorbehandlung in Grafik IV-17 inklusive Signifikanzniveaus zusammengefasst. Die statistische Darstellung zeigt deutlich die zuvor ausführlich beschriebene vom *SEC61A* Expressionsgrad abhängige TG- und Puromycinsensitivität. Nach Depletion des Sec61 Komplexes war die Reaktion auf TG und Puromycin deutlich verringert. Die effiziente ERj1 Depletion hingegen blieb im Vergleich zu unbehandelten oder Kontroll-siRNA transfizierten Zellen ohne große Beeinflussung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase.

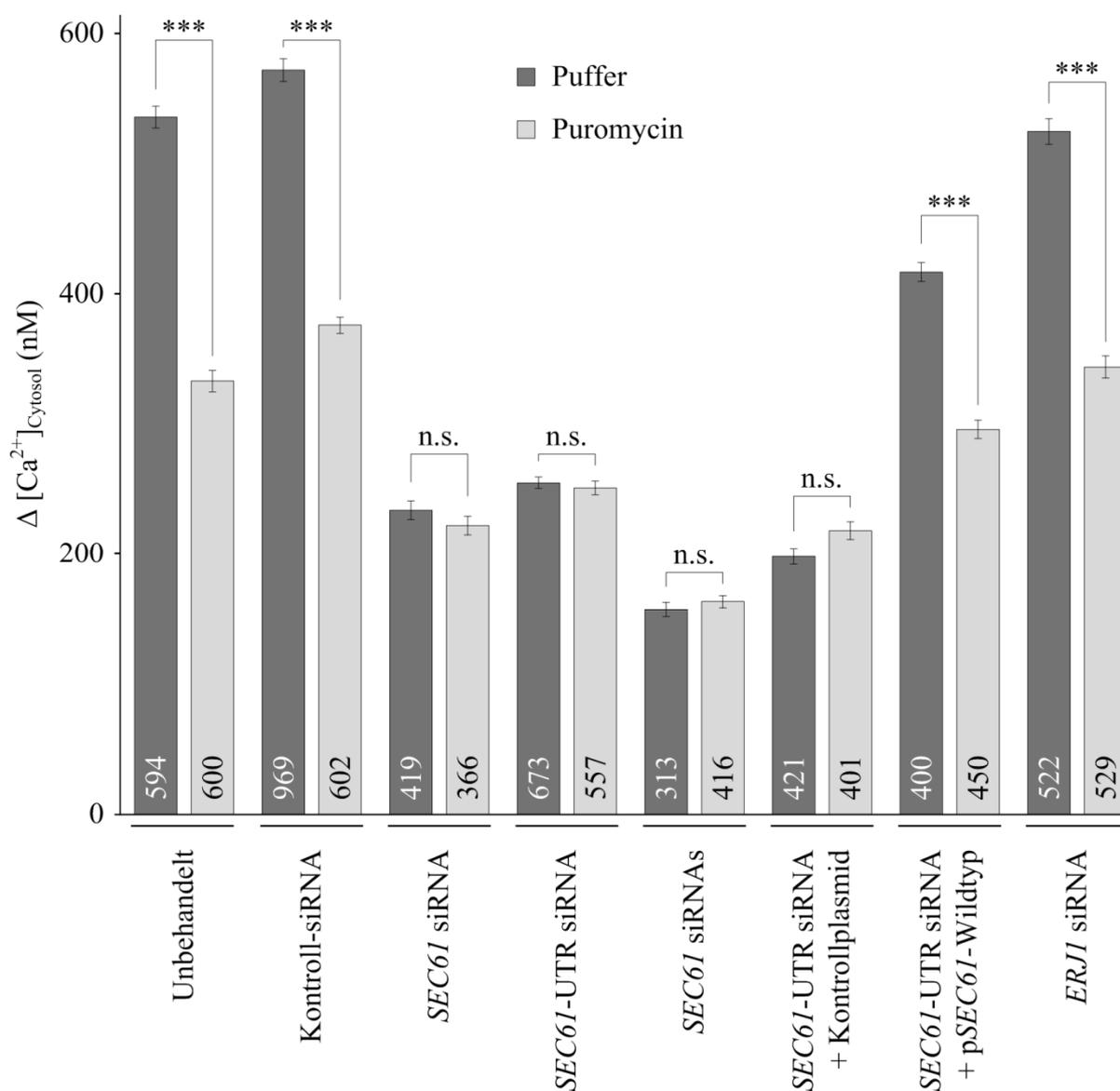


Abb. IV-17: Statistische Analyse des Ca^{2+} -„leakage“ Sec61 α depletierter/komplementierter Zellen
 HeLa-Zellen wurden wie in Abb. IV-16 beschrieben behandelt und analysiert. Gezeigt ist die Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nach Thapsigargingabe der Experimente A-H (Abb. IV-16) mit oder ohne (Puffer) Puromycinvorbehandlung. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Fehlerbalken (Standardfehler) und die Anzahl analysierter Zellen. P-Werte $< 0,001$ wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. n.s. = nicht signifikant

IV.1.4.3 Einfluss des Sec61 α Gehaltes auf die zelluläre Ca²⁺-Homöostase

Auch bei Analyse dieses zellulären Phänotyps als Reaktion auf die Sec61 α Depletion stellte sich die Frage, ob die beobachtete Reduktion des passiven Ca²⁺-Ausstroms nach 96 h (s. Kapitel IV.1.4.2) mit dem sich kontinuierlich verringernenden Sec61 α Gehalt von 24 - 96 h (vgl. Abb. IV-02) konvergiert. Das heißt, resultiert die mit der Zeit zunehmende Depletion an Sec61 α auch in der zu erwartenden, steten Abnahme des passiven Ca²⁺-Ausstroms aus dem endoplasmatischen Retikulum?

Das Resultat einer solchen Analyse ist in der nachfolgenden Abbildung IV-18 dargestellt. Das Balkendiagramm inklusive zugehörigem Inlay verdeutlicht die durch TG hervorgerufenen Änderung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration in Abhängigkeit von Puromycin und des Sec61 α Restproteingehaltes.

Zusammen mit dem rückläufigen Sec61 α Restproteingehalt der *SEC61*-UTR siRNA behandelten Zellen von 60 % auf 12 % (s. Inlay Abb. IV-18) sah man die sukzessive Regression des durch Thapsigargin demaskierten Ca²⁺-Effluxes gegenüber Kontrollzellen. Während Kontroll-siRNA transfizierte Zellen im Zeitfenster von 24 h bis 96 h eine konstante Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{Cytosol}$) nach Thapsigargingabe von rund 460 nM aufwiesen (Kontroll-siRNA Ø (1 d - 4 d); der kleine Fehlerbalken zeigt die Homogenität in den Messungen der Einzeltage an), sanken die Werte der Sec61 α depletierten Zellen von 356 nM (*SEC61*-UTR siRNA (1 d)) über 275 nM (*SEC61*-UTR siRNA (2 d)) auf ungefähr 215 nM nach drei und vier Tagen. Die schwindende Sensitivität gegenüber Puromycin wurde ebenfalls mit dem reduzierten *SEC61A* Expressionsgrad ausgeprägter. So werden die Unterschiede zwischen dunkelgrauen (ohne Puromycin) und hellgrauen (mit Puromycin) Balken immer geringer mit dem sinkenden Level an Sec61 α Proteinen und heben sich nach vier Tagen völlig auf.

Diese Messung verdeutlichte, dass verglichen mit Kontrollzellen bereits die Reduktion des Sec61 α Gehaltes um 40 % in einer deutlichen Reduktion des passiven Ca²⁺-Effluxes resultierte. Damit ergab sich ein weiterer Hinweis auf die strikte Korrelation zwischen Sec61 α und dem passiven Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER.

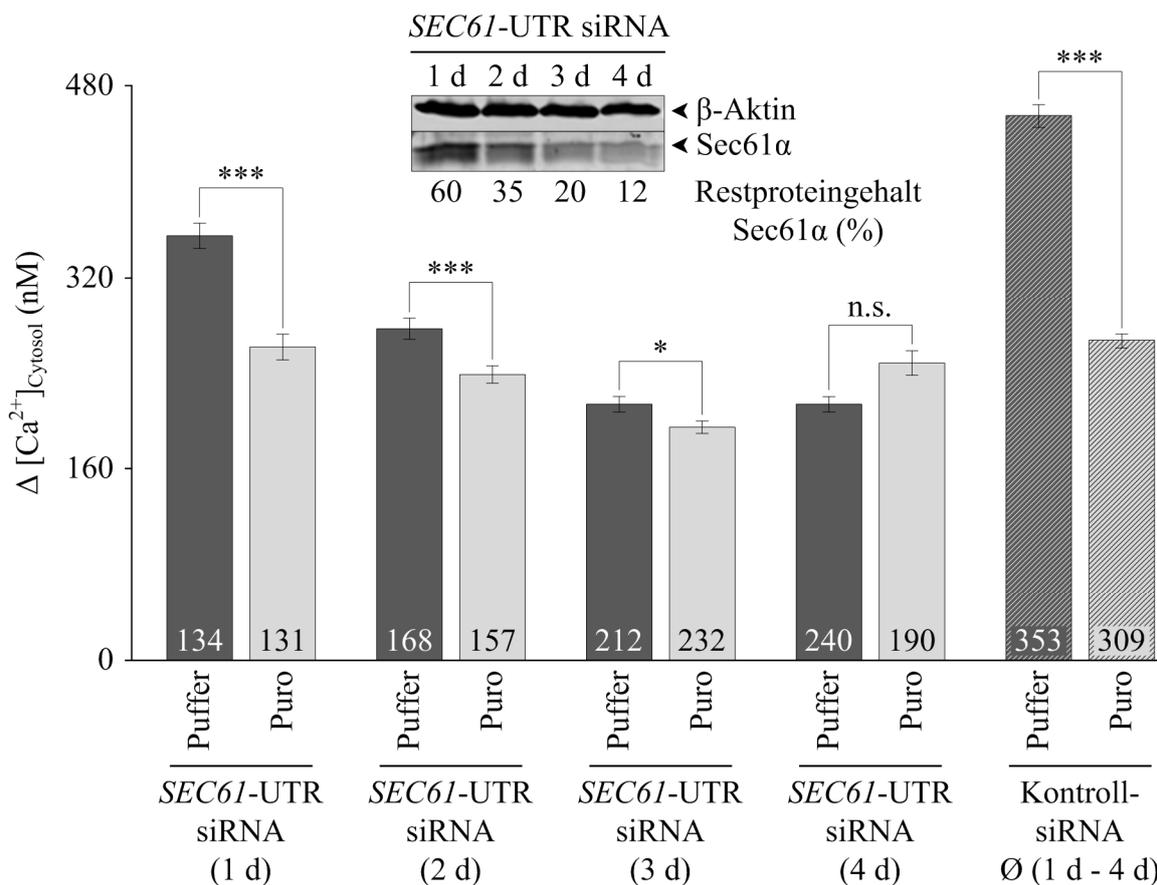


Abb. IV-18: Abhängigkeit des passiven Ca²⁺-Effluxes aus dem ER von der Sec61α Depletionseffizienz
 Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultivierte HeLa-Zellen wurden für 1 d bis 4 d mit 20 nM SEC61-UTR siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt. Das Inlay zeigt in Lämmli-Puffer gekochte Proben nach SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörperdekorierung gegen β-Aktin (Ladekontrolle) und Sec61α. Die an Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisierten relativen Restproteingehalte an Sec61α eines jeden Zeitpunktes sind unter den Western Blot Paneelen festgehalten (vgl. auch Abb. IV-02). In Intervallen von je einem Tag wurden die Zellen nach der in Medium durchgeführten 45 minütigen Beladung bei RT mit 4 μM Fura-2 AM in Ca²⁺-freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung mit Puffer oder 500 μM Puromycin (Puro) behandelt. Weitere 2 min später wurde durch die Gabe von 1 μM Thapsigargin die Ca²⁺-Freisetzung initiiert und anschließend die Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration (Δ [Ca²⁺]_{Cytosol}) nach Thapsigargingabe mit oder ohne (Puffer) Puromycinvorbehandlung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive Fehlerbalken (Standardfehler) und die Anzahl analysierter Zellen.
 Schraffierte Balken zeigen den Mittelwert aller Kontroll-siRNA behandelten Zellen über den Zeitraum von ein bis vier Tagen (1 d - 4 d). P-Werte < 0,001 wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. P-Werte < 0,05 (*); n.s. = nicht signifikant

Da sich das Translokon offensichtlich durch Puromycin in seiner Ca²⁺-Permeabilität beeinflussen lässt, lag es nahe häufige zelluläre Störungen, wie etwa ER Stress hervorgerufen durch vermehrte Proteinfehlfaltung, auf pharmakologische Art zu induzieren und deren Auswirkung auf die Ca²⁺-Homöostase zu analysieren; stets mit dem Fokus auf den Sec61 Komplex gerichtet (s. Kapitel IV.1.4.4).

IV.1.4.4 Auswirkung der induzierten Proteinfehlfaltung auf den Ca^{2+} -Efflux des ER

Nachdem nun die ER Translokase, limitiert auf die proteinleitende Pore Sec61 α , als passiver Ca^{2+} -permeabler Ionenkanal der ER Membran bestimmt wurde, sollte die Regulation dieser Pore im Folgenden genauer charakterisiert werden. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund von Interesse, dass der Sec61 Komplex nicht nur als Kanal des Proteinimports fungieren könnte (= Translokase) sondern gleichzeitig auch als putativer Exportkanal zur Retrotranslokation fehlgefalteter Polypeptide (= Dislokase) (Plemper *et al.* 1997; Zhou & Schekman 1999; Kanuka *et al.* 2005). Der Idee nach sollte eine durch Xenobiotika forcierte Proteinfehlfaltung im ER Lumen zum Zwecke der Retrotranslokation zu einem Anstieg an (kurzzeitig) offenen Dislokasen führen. Mehr offene Ca^{2+} „leak“ Kanäle würden – in Anlehnung an den Puromycineffekt – zu einem Abfall der ER luminalen Kalziumkonzentration führen und zu einer Senkung des durch Thapsigargin demaskierten Ca^{2+} -Effluxes.

Da die Hypothese des als ER Dislokase agierenden Sec61 Komplexes in der Literatur nicht allgemein anerkannt wird (Carvalho *et al.* 2010), wäre auch eine zweite Interpretation denkbar. Eine gesteigerte Proteinfehlfaltung würde zur Aggregationsprävention und Renaturierung betroffener Polypeptide Faltungshelfer, sog. Chaperone, rekrutieren. Insbesondere das im ER Lumen abundante Chaperon BiP (s. Kapitel II.3.3.3) würde rekrutiert. Die interessante Frage dabei wäre aber, woher würde BiP rekrutiert? Ein plausibler „Hotspot“ ist das Translokon (Haigh & Johnson 2002; Alder *et al.* 2005). Bedingt durch die potentiellen, assoziierten J-Domäne tragenden Hsp40 Membranproteine (z. B. ERj1 oder Sec63) besteht in diesem Umfeld eine Affinität für BiP. Darüber hinaus ist der Sec61 Komplex der Eintrittspunkt translozierter, ungefalteter Polypeptidketten, welche durch die Assoziation mit einem dort befindlichen Chaperon (BiP) vor einer Aggregation geschützt und gefaltet werden. Diesem Modell folgend würde eine forcierte Proteinfehlfaltung im ER Lumen das ansonsten „translokon-nahe“ BiP von dort rekrutieren und eine weniger passabel verschlossene Pore hinterlassen. Demnach müsste ein weniger versiegeltes Translokon eine erhöhte Tendenz zum Ca^{2+} -Efflux zeigen; den gegenteiligen Effekt zur Export-Hypothese.

Somit war die experimentelle Bestimmung der durch die beiden Faltungsantagonisten Dithiothreitol (DTT) und Tunicamycin (Tun) hervorgerufenen Änderungen der Ca^{2+} -Homöostase gleich doppelt spannend.

Wie bereits unter IV.1.4.1. beschrieben (s. auch für Wirkungsweise von DTT und Tun), zeigten beide Substanzen nach dreiminütiger Einwirkung keinen Einfluss auf den durch Ionomycin aktivierbaren Gehalt freier Ca^{2+} -Ionen (s. Abb. IV-15).

Da, genau wie Puromycin, weder DTT noch Tun direkte Einwirkung auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nahmen, wurde auch in diesem Fall der Einfluss beider Xenobiotika auf den durch Thapsigargin demaskierten, ER luminal entspringenden Ca^{2+} -Efflux bestimmt.

Eine anfängliche Ermittlung der effektiven DTT/Tun Konzentrationen und Einwirkdauer (s. Abb. III-09) zeigte für beide Stressinduktoren eine Erhöhung der Ca^{2+} -Leckage der 96 h lang kultivierten, unbehandelten HeLa-Zellen. Die daraufhin festgelegten Parameter für Folgeexperimente waren 1 mM DTT bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tun mit einer Einwirkdauer von je 3 min. [Die Titration aus Abb. III-09 wurde nur einmalig durchgeführt, weshalb man die bei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tun ausbleibende Steigerung des Ca^{2+} -Effluxes vernachlässigte und dennoch diese Konzentration für nachfolgende Versuche wählte. Wenn sowohl Konzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wie auch 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Tun eine Steigerung des Ca^{2+} -Ausstroms bewirkten, schien es abwegig, dass die Behandlung mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tun ohne Effekt sein sollte (s. Abb. III-09C). Die Problematik der 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tun Messung zeigt sich deutlich in Abb. III-09B. Der Kurvenverlauf (grüne Kurve) ergab eine sonst nie zu beobachtende frühe Reaktion vor TG-Gabe und nach TG-Applikation ein deutlich verspätetes Maximum.]

Um das Resultat des gesteigerten Ca^{2+} -Effluxes nach ER Stress zu verifizieren und in Zusammenhang zum Sec61 Komplex als den vermittelnden Ca^{2+} -permeablen Kanal zu stellen, wurde das Messprotokoll auf Sec61 α depletierte Zellen angewendet (s. Abb. IV-19).

Für die Kontroll-siRNA transfizierten Zellen illustrierten die Differenzen aus der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung nach und der basalen Ca^{2+} -Konzentration vor TG-Gabe ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) sowohl mit DTT- als auch Tun-Vorbehandlung (3 min) eine deutliche Steigerung des demaskierten Ca^{2+} -Ausstroms. Eine Pufferapplikation führte zu einer $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ von 461 nM, welche durch DTT auf 658 nM und durch Tun auf rund 600 nM erhöht wurde.

Wie erwartet führten im Vergleich zu den Kontrollzellen sowohl die *SEC61* siRNA ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}} = 152$ nM) als auch die *SEC61*-UTR siRNA ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}} = 309$ nM) Behandlung zu einer deutlichen Reduktion der TG-Antwort, auf Grund des reduzierten passiven Ca^{2+} -Ausstroms. Der Unterschied zwischen beiden Werten ergibt sich vermutlich aus der ungleichen Depletionseffizienz (s. Inlay Abb. IV-19) der *SEC61* siRNA (95 % Sec61 α Depletion) und der *SEC61*-UTR siRNA (79 % Sec61 α Depletion) dieses Experiments. Gemeinsam hingegen war beiden *SEC61A* Expressionsreduktionen jedoch die im Gegensatz zu Kontrollzellen fehlende Erhöhung des durch TG offenbarten Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER nach DTT- oder Tun-Vorbehandlung (s. Abb. IV-19).

Das könnte eingebettet in den zellulären Kontext bedeuten, dass der Sec61 Komplex mit seiner porenformenden, Ca^{2+} -permeablen Sec61 α Untereinheit einen durch ER Stress (v.a. Proteinfehlfaltung) modulierbaren Kanal repräsentiert.

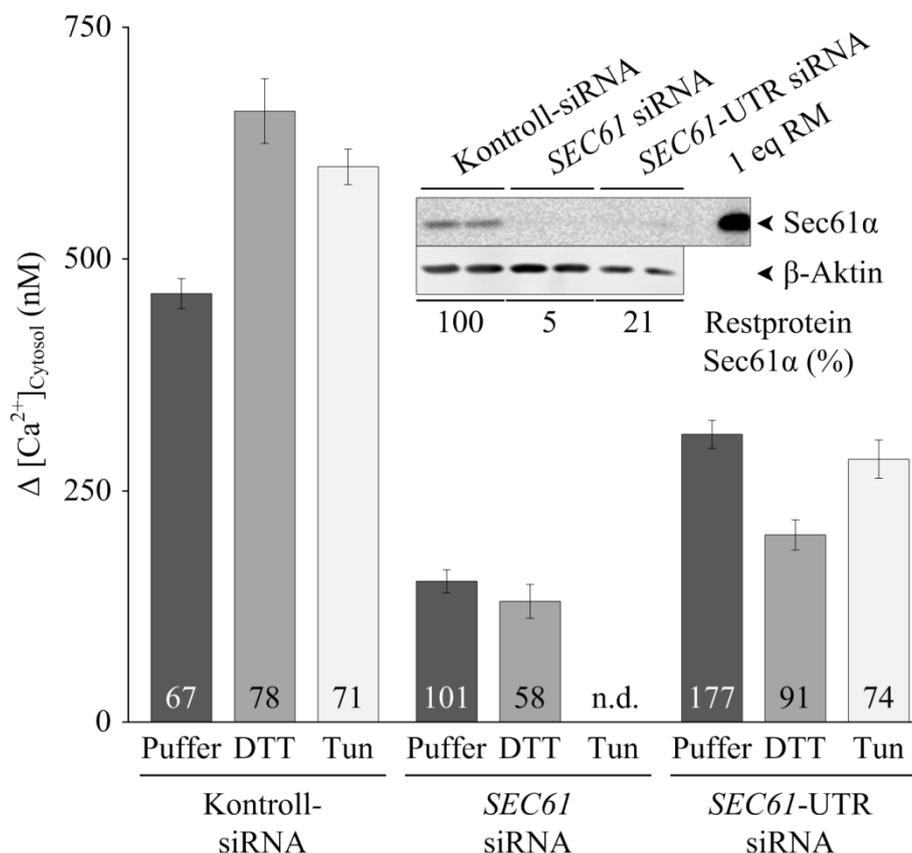


Abb. IV-19: Effekte von Faltungsantagonisten auf den passiven Ca^{2+} -Efflux Sec61 α depletierter Zellen
 Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultivierte HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 20 nM Kontroll-, *SEC61* oder *SEC61-UTR* siRNA transfiziert. Das Inlay zeigt den Western Blot der in Lämmli-Puffer gekochten Proben nach Antikörperdekorierung gegen β -Aktin und Sec61 α . Relative Restproteingehalte an Sec61 α sind angegeben. Nach der in Medium durchgeführten 45 minütigen Beladung der Zellen bei RT mit 4 μM Fura-2 AM wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung mit Puffer, 1 mM DTT oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Tun) behandelt. Nach weiteren 3 min wurde durch die Gabe von 1 μM Thapsigargin die Ca^{2+} -Freisetzung initiiert. Abgebildet ist die Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nach Thapsigargingabe mit (DTT, Tun) oder ohne (Puffer) Faltungsantagonist. Gezeigt sind Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Anzahl analysierter Zellen. n.d. = nicht determiniert

Um dieser möglichen Modulation des Sec61 Komplexes fokussierter nachzugehen, lieferten die bereits vorher verwendeten und etablierten Komplementationsansätze eine attraktive Methode den Phänotyp im Detail unter verschiedenen Expressionsbedingungen zu testen. Daher wurde der in Abbildung IV-19 aufgedeckte Einfluss induzierter Proteinfehlfaltung auf die Ca^{2+} -Homöostase nicht mehrfach im reinen Sec61 α Depletionsansatz wiederholt, sondern direkt auf komplementierte Zellen übertragen (s. Abb. IV-20).

Wie Teil A der Abbildung IV-20 zu erkennen gibt, lieferte auch die Analyse der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) Kontroll-siRNA + Kontrollplasmid kotransfizierter Zellen einen sowohl durch DTT als auch Tunicamycin (Tun) forcierten Efflux an Ca^{2+} aus dem ER, detektierbar nach Inhibition der SERCA-Aktivität durch Thapsigargin (TG). Maximalamplituden nach TG-Gabe stiegen von 465 nM (Puffer) auf 629 nM bzw. 786 nM durch die dreiminütige Behandlung mit DTT oder Tun.

Wie die Einzeltransfektion mit *SEC61* siRNA oder *SEC61*-UTR siRNA (vgl. Abb. IV-19) führte auch die Kotransfektion der *SEC61*-UTR siRNA mit einem nicht-kodierenden Kontrollvektor erstens zur direkten Reduktion der TG-Antwort (Maximum 213 nM) und zweitens zur nahezu vollständigen Aufhebung des durch DTT (Maximum 216 nM) und Tun (Maximum 265 nM) gesteigerten Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER (s. Abb. IV-20B). Der durchschnittliche *Sec61 α* Gehalt der *SEC61*-UTR siRNA + Kontrollplasmid transfizierten Zellen lag bei $13 \pm 2\%$ ($n = 26$; vgl. Abb. IV-04).

Die Wiederherstellung der *SEC61A* Expression im *SEC61*-UTR siRNA Hintergrund durch die Komplementation führt auch in diesem Typ Experiment zur Rettung beider *Sec61 α* -assoziiierter Phänomene (s. Abb. IV-20C). Die partielle *Sec61 α* Rettung ($61 \pm 4\%$ ($n = 19$); s. Abb. IV-04) erhöht die TG-Antwort auf einen Maximalwert nach Applikation auf 373 nM (Puffer). Zudem führen DTT und Tun beide wieder zu einer größeren Ca^{2+} -Freisetzung nach TG-Gabe. Die Maxima der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ liegen bei 580 nM (DTT) und 572 nM (Tun).

Unerwartet – doch keineswegs uninteressant – erschien das Resultat der Komplementation mit der Diabetes mellitus assoziierten *SEC61A-Y344H* Mutante (s. Abb. IV-20D). Trotz der im langfristigen Mittel betrachteten etwas geringeren Wiederherstellung der zugehörigen *Sec61 α* (-Y344H) Proteinsynthese von $55 \pm 5\%$ ($n = 13$; s. Abb. IV-04) im Vergleich zur Rettung mit dem Wildtyp ($61 \pm 4\%$, $n = 19$), war der unstimulierte durch TG demaskierte Ca^{2+} -Efflux *per se* erhöht auf fast 490 nM (Puffer). Ein Wert der noch über der nach TG-Gabe gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ der Kontrollzellen (465 nM) lag. Darüber hinaus war der nach einer Vorbehandlung mit DTT oder Tun forcierte Ca^{2+} -Ausstrom nicht detektierbar in Gegenwart der *SEC61A-Y344H* Mutante. Die gemessenen Maxima der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Inhibition der SERCA lagen nach 3 min Vorbehandlung mit DTT bei 431 nM und mit Tun bei 454 nM. Beide Werte waren somit im Bereich der zugehörigen Pufferkontrolle (vgl. Abb. IV-20D und IV-21).

Zur stichhaltigeren Verifikation der durch DTT/Tun hervorgerufenen Effekte auf den passiven Ca^{2+} -Efflux aus dem ER wurde mit Hilfe aller vermessenen Zellen der verschiedenen Kotransfektionen auch eine statistische Analyse erstellt (s. Abb. IV-21).

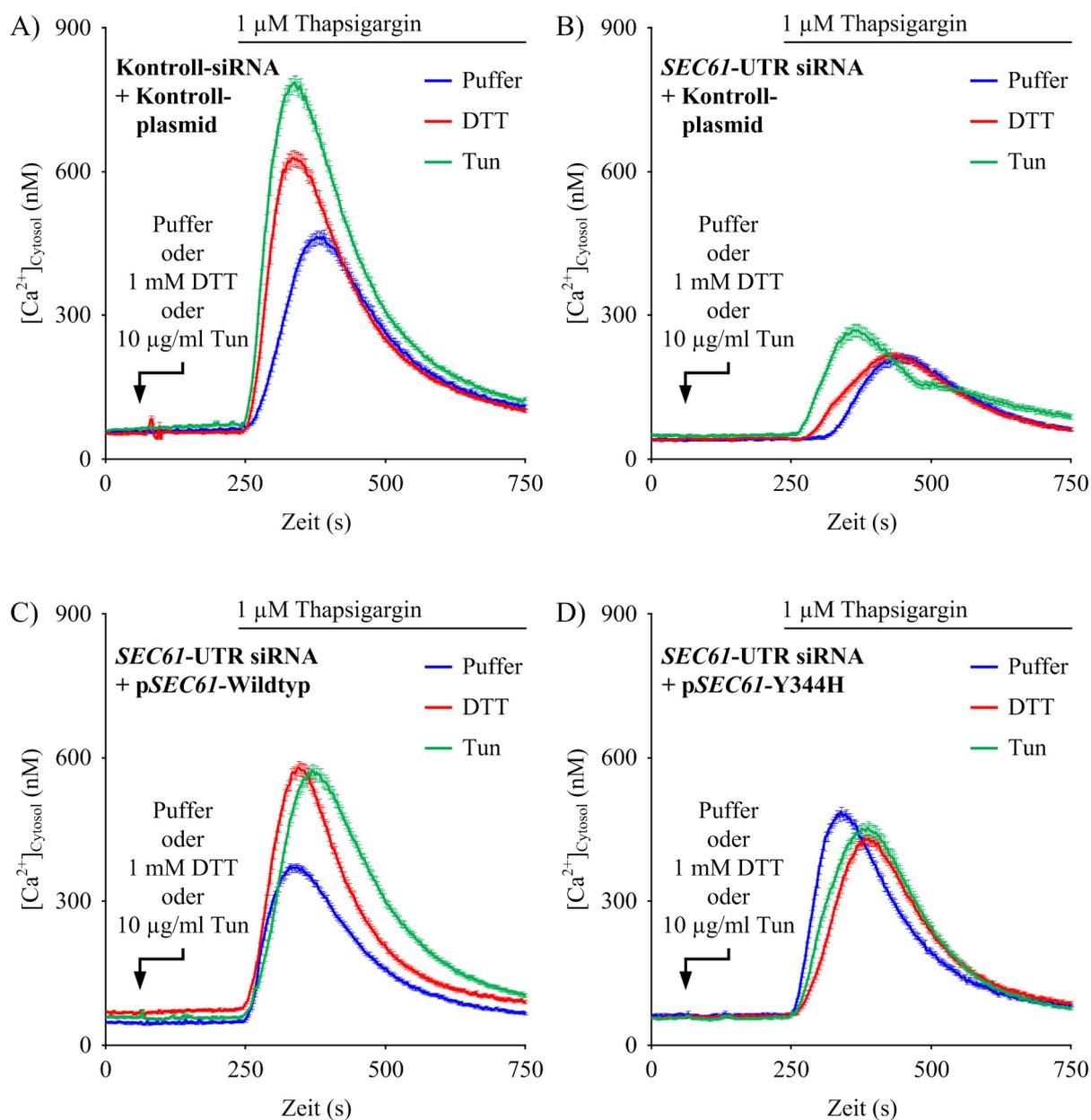


Abb. IV-20: Effekte von ER Stress auf den passiven Ca^{2+} -Ausstrom *Sec61 α* komplementierter Zellen
 Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden 32 h nach Behandlung mit 20 nM Kontroll-siRNA (A) oder *SEC61*-UTR siRNA (B-D) zusätzlich mit 4 μg Plasmid kotransfiziert. Die Plasmide kodierten kein (Kontrollplasmid; A und B), das wildtypische (*pSEC61*-Wildtyp; C) oder das Diabetes mellitus assoziierte (*pSEC61*-Y344H; D) *SEC61A* Allel. Nach der in Medium durchgeführten 45 minütigen Beladung der Zellen bei Raumtemperatur mit 4 μM Fura-2 AM wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie Lösung überführt, in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt und 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung mit Puffer, 1 mM Dithiothreitol (DTT) oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin (Tun) behandelt. Nach weiteren 3 min wurde durch die Gabe von 1 μM Thapsigargin die Ca^{2+} -Freisetzung initiiert. Die Diagramme (A-D) zeigen Mittelwerte inklusive dem Standardfehler. Zugehörige *Sec61 α* Proteingehalte (B-D) normalisiert an Kontroll-siRNA + Kontrollplasmid transfizierten Zellen sind der Abb. IV-04 zu entnehmen.

Die nachfolgende Statistik (Abb. IV-21), inklusive gezeigter Signifikanzniveaus, bestätigt die Schlussfolgerungen zu Abbildung IV-20 (Erläuterungen im Detail s. oben). Das Diagramm beziffert die Differenzen aus der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung nach und der basalen Ca^{2+} -Konzentration vor TG-Gabe ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) in Ab-/Anwesenheit der Xenobiotika DTT oder Tunicamycin für die unterschiedlich kotransfizierten HeLa-Zellen.

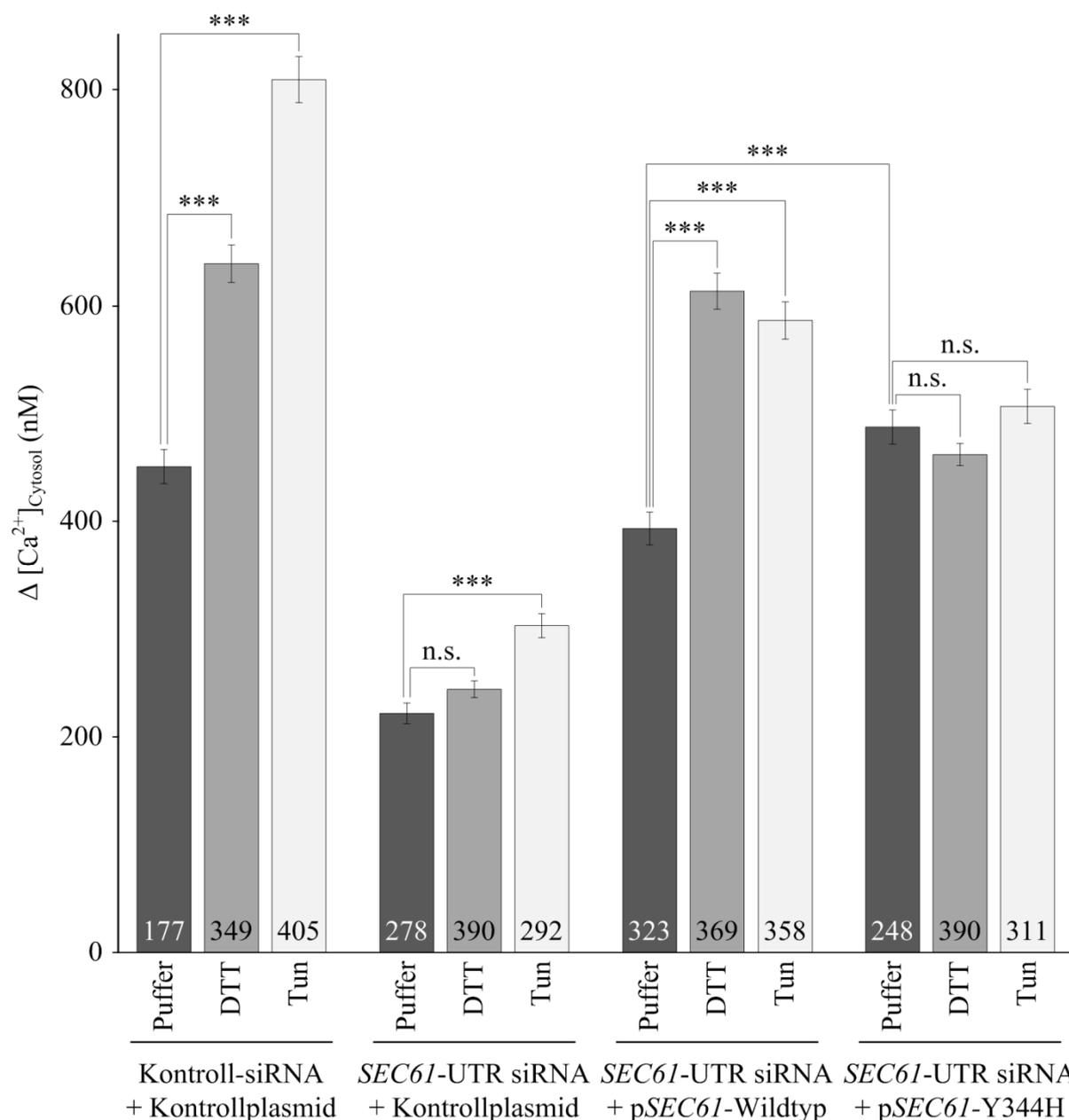


Abb. IV-21: Statistische Analyse der Effekte von DTT und Tunicamycin auf den passiven Ca^{2+} -Efflux Sec61 α komplementierter Zellen

HeLa-Zellen wurden wie in Abb. IV-20 beschrieben behandelt und analysiert. Gezeigt ist die Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nach Thapsigargingabe der Experimente A-D der Abbildung IV-20 mit (DTT, Tun) oder ohne (Puffer) Faltungsantagonist. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Anzahl analysierter Zellen. P-Werte $< 0,001$ wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch drei Sterne (***) markiert. n.s. = nicht signifikant

Wie Kapitel IV.1 „Zelluläre Phänotypen der *SEC61A1* Expressionsmodulation“ offenlegt, repräsentiert das zugehörige Sec61 α ein vielseitiges Protein mit Einwirkungen auf diverse zelluläre Prozesse. Das essentielle *SEC61A1* Gen (s. Kapitel IV.1.1.2) agiert als post- bzw. cotranslationale Proteintranslokase der ER Membran (s. Kapitel IV.1.3) und mit letzterem Fall einhergehend als notwendiger Ribosomenrezeptor (s. Kapitel IV.1.2.3). Zudem gestattet der große Durchmesser dieser proteinleitenden Pore einen – dem an der ER Membran bestehenden Ca²⁺-Gradienten folgenden – passiven Ca²⁺-Flux (s. Kapitel IV.1.4.2).

Von besonderem Interesse und die Neugier weckend, waren die Resultate der Komplementationsexperimente in Zusammenhang mit der Diabetes mellitus assoziierten *SEC61A-Y344H* Mutante. Obwohl auch diese Sequenzvariation zum Proteintransport befähigt ist, ergaben sich substratspezifische Unterschiede verglichen mit der Transporteffizienz des Wildtyps *SEC61A1* (s. Abb. IV-13). Darüber hinaus schien auch die Ca²⁺-Homöostase der *SEC61A-Y344H* exprimierenden Zellen, v.a. deren passiver Ca²⁺-Efflux, sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter stressinduzierenden Perturbationen gegenüber dem Wildtyp verändert (s. Abb. IV-21). Solche, die Proteinfunktion nicht vollständig eliminierenden Effekte von Mutanten sind oftmals ein Hinweis auf regulatorische Netzwerke, beruhend auf der Interaktion des Zielproteins mit weiteren Komponenten der Zelle.

Daher rückte zur weiterführenden Fragestellung der vorliegenden Arbeit der Aspekt der möglichen Modulation des Sec61 Komplexes durch Regulatoren und Interaktionspartner in den Fokus. Dies erfolgte besonders auch im Hinblick auf die mögliche Charakterisierung und Definition der vermutlich vorhandenen Unterschiede zwischen *SEC61A* und der Punktmutation *SEC61A-Y344H*.

Um die Suche nach möglichen Interaktionspartnern einzugrenzen, beschränkte man sich auf bereits bekannte Proteine, welche in Zusammenhang zum Sec61 Komplex des Säugers stehen (Zimmermann *et al.* 2011). Zunächst kamen neben dem bereits analysierten ERj1 (vgl. Abb. IV-17) zwei weitere Proteine des ER mit einer putativen Zugehörigkeit zum Translokon in die Auswahl, das ER Membranprotein Sec62 und das im ER Lumen agierende Hsp70 Chaperon BiP.

Beide Kandidaten wurden auf Grund zweier Eigenschaften gewählt. Sie wurden in Hefe als notwendige Komponenten des Proteintransports beschrieben (Lyman & Schekman 1996) und sie sind vermutlich in der Lage über potentielle EF-Hände (Sec62) oder unspezifisch (BiP) mit Ca²⁺-Ionen in Kontakt zu treten.

IV.2 Einfluss der *SEC62* Expressionssenkung auf die Ca^{2+} -Homöostase

Um den möglichen Einfluss und die Beteiligung des *SEC62* Gens (s. Kapitel II.3.3.1) auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase zu bestimmen, wurden wie zuvor HeLa-Zellen durch zwei siRNAs über einen Zeitraum von 96 h an Sec62 depletiert. Die im Sec62 Gehalt verringerten Zellen wurden dann im Ca^{2+} -„imaging“-System charakterisiert.

Abbildung IV-22A legt die effiziente Sec62 Depletion beider siRNAs dar. 96 h nach siRNA Behandlung waren die an Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisierten Sec62 Restproteingehalte bei $11 \pm 2\%$ ($n = 7$; *SEC62*-UTR siRNA) und $7 \pm 1\%$ ($n = 6$; *SEC62* siRNA). Mit der Reduktion des *SEC62* Expressionslevels ging eine Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase einher.

Kalibrierte Messungen der Ca^{2+} -Konzentrationen Fura-2 AM beladener Zellen deuteten nach Sec62 Depletion bereits ohne jedwede Stimulation einen erhöhten Level an cytosolischem Kalzium an (s. Abb. IV-22B). Eine zugehörige Quantifizierung (s. Abb. IV-22C) ergab sowohl für die *SEC62*-UTR siRNA (147 nM; rot) als auch die *SEC62* siRNA (136 nM; blau) transfizierten Zellen einen signifikant erhöhten Pegel der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ im Vergleich zu Kontrollzellen (73 nM; grau). Für beide Sec62 Depletionsstrategien lag die gemessene $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ über dem in der Literatur für Säugetierzellen angegeben Wert von 50 - 100 nM. Nach Enthüllung des Ca^{2+} -Ausstroms durch die Inkubation der Sec62 depletierten Zellen mit 1 μM Thapsigargin zeigte sich ein zweiter, vermutlich mit der erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Verbindung stehender, Unterschied. Beide Behandlungen mit *SEC62* gerichteten siRNAs resultierten in einer erhöhten Amplitude der gemessenen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ nach Inhibition der SERCA-Aktivität (s. Abb. IV-22B). Während die Kontroll-siRNA behandelten Zellen bei Berechnung der Differenz aus der maximalen Ca^{2+} -Freisetzung nach und der basalen Ca^{2+} -Konzentration vor TG-Gabe ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) einen Konzentrationsunterschied von 500 nM erbrachten, beliefen die zugehörigen Zahlen nach *SEC62*-UTR siRNA und *SEC62* siRNA Transfektion sich auf 685 nM bzw. 643 nM (s. Abb. IV-22D).

Vor allem die Anhebung des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels nach Sec62 Depletion (s. Abb. IV-22C) schien für eine Verschiebung im Gleichgewicht des zellulären Ca^{2+} -Haushalts zu sprechen. Daher wurde der Gehalt an freiem (d.h. durch Ionomycin freisetzbarem) Ca^{2+} der Kontrollzellen mit dem der Sec62 depletierten Zellen verglichen. Wie Abbildung IV-22E und F demonstrieren, führten beide *SEC62* Reduktionsalternativen zu einer relevanten Erhöhung des Ca^{2+} -Gehaltes innerhalb der vier Tage andauernden Depletion von 615 Δ Ratio (Fluoreszenzintensitätsdifferenzen; s. Abbildungsunterschrift Abb. IV-22) für Kontrollzellen auf 690 Δ Ratio (*SEC62*-UTR siRNA) bzw. 902 Δ Ratio (*SEC62* siRNA).

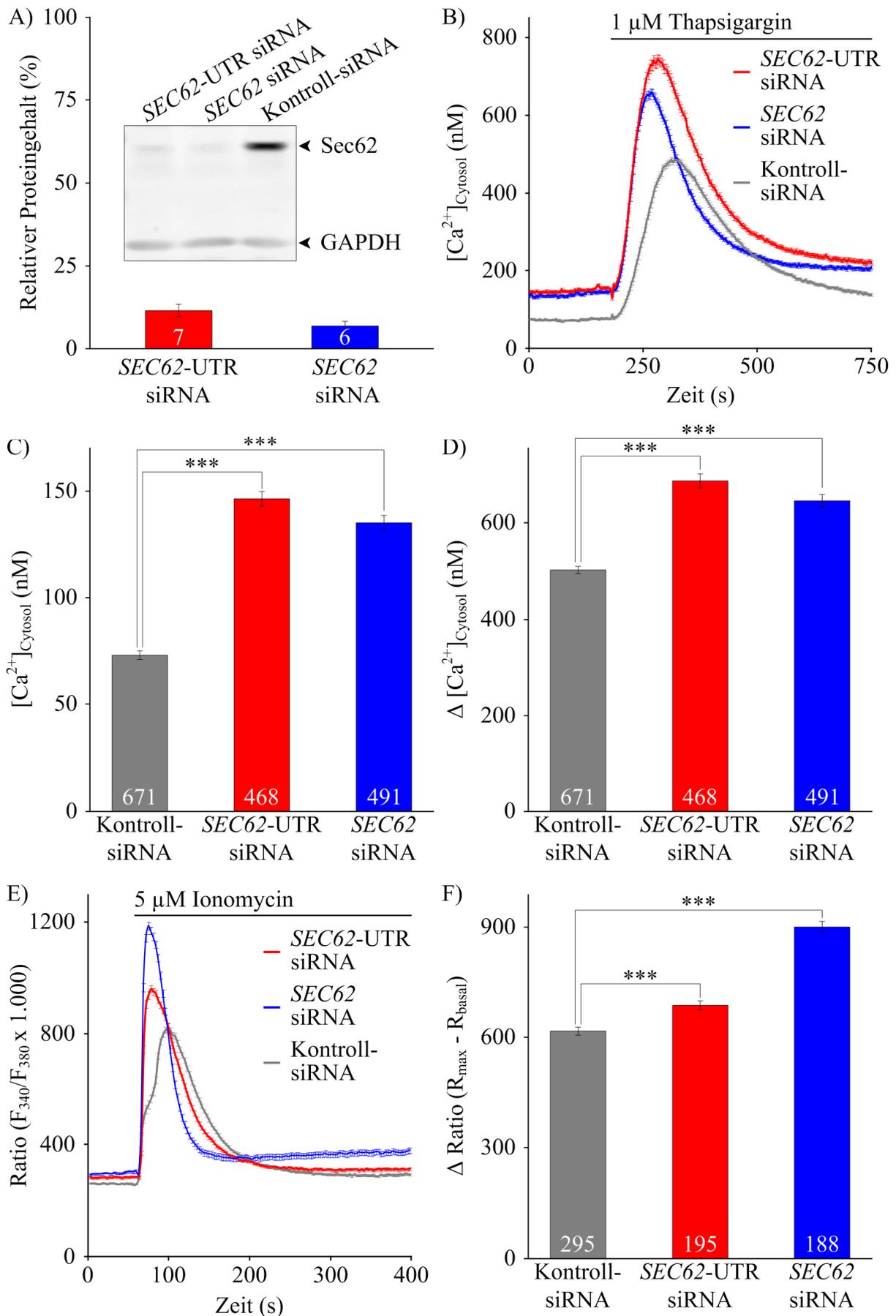


Abb. IV-22: Einfluss der siRNA vermittelten *SEC62* Expressionsreduktion auf die Ca^{2+} -Homöostase

HeLa-Zellen wurden für 96 h mit 10 nM Kontroll-siRNA (grau), *SEC62*-UTR siRNA (rot) oder *SEC62* siRNA (blau) transfiziert (A-F). Ein Aliquot von 3×10^5 geernteten Zellen wurde in Lämmli-Puffer gekocht und nach SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörpern gegen GAPDH (Ladekontrolle) und Sec62 dekoriert (A, Inlay). Die Grafik zeigt die an GAPDH abgeglichenen und an Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisierten Signalstärken mehrerer Experimente (A). Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern transfizierte HeLa-Zellen wurden 45 min bei RT mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2 AM beladen, in Ca^{2+} -freie Lösung überführt und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt (B, E). 3 min nach Beginn der kalibrierten Messung wurde durch die Gabe von $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin (TG) die Ca^{2+} -Freisetzung initiiert (B) und sowohl die basale, cytosolische Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) vor der TG-Applikation (C) als auch die mittlere Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nach TG (D) bestimmt. Alternativ wurde nach 1 min mittels $5 \mu\text{M}$ Ionomycin die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher initiiert (E) und die Differenz (Δ Ratio) aus maximaler Ratio nach Ionomycin Behandlung (R_{max}) und der basalen Ratio vor Applikation (R_{basal}) quantifiziert (F). Die Diagramme (A-F) zeigen Mittelwerte inklusive Fehlerbalken (Standardfehler). Weiße Zahlen geben die Anzahl analysierter Ereignisse.

Zusammenfassend führten die Resultate der Sec62 depletierten Zellen zum Schluss, dass sowohl die Anhebung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch der intensiverte Ca^{2+} -Efflux vermutlich das Resultat des bereits nach 96 h erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes widerspiegelte. Ein Mehr an Kalziumionen könnte womöglich aus kompensatorischen Gründen zu einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen und mit einer (Neu-) Justierung der Ca^{2+} -Gradienten bzw. Homöostase einhergehen.

Für sich genommen schien dies ein interessantes Phänomen und gab erste Hinweise auf eine potentielle Modulation des Sec61 Komplexes durch das assoziierte ER Membranprotein Sec62. Somit wurde mit Sec62 ein erster putativer Modulator des Sec61 Komplexes gefunden. Da sich die nach *SEC62* Reduktion ausgebildete Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und die Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes allerdings nicht in Anwesenheit des Sec61 α -Y344H formierten, musste man davon ausgehen, dass es für Sec62 und die Sec61 α Mutante keine gemeinsame phänotypische Schnittmenge gab. Eine Interaktion bzw. ein (unmittelbar zu erkennender) Zusammenhang zwischen Sec62 und Sec61 α -Y344H schien auf Grund der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen eher unwahrscheinlich.

Insofern schien es sinnvoll mit BiP einen zweiten Kandidaten anzugehen, der ebenfalls als möglicher Modulator des Sec61 Komplexes in Frage käme. Unter Umständen geben die Analysen in Zusammenhang mit der *BIP* Expressionsminderung (s. Kapitel IV.3) weitere Hinweise auf das regulatorische Netzwerk des Sec61 Komplexes und die Veränderung durch die Sec61 α -Y344H Mutante.

IV.3 Zelluläre Phänotypen der *BIP* Expressionsminderung

Nachdem sich in den Ca^{2+} -„imaging“ Experimenten keine Korrelation des Phänotyps der Sec62 Depletion und dem der Sec61 α -Y344H Mutante aufzeigen lies, wurde im Folgenden BiP als weiterer möglicher Interaktionspartner und Regulator des Sec61 Komplexes untersucht. Dieser essentielle ER luminale Faltungs- und Stressmediator aus der Klasse der Hsp70 Chaperone ist durch seine vielseitigen Eigenschaften ein möglicher Modulator des Sec61 Komplexes (Ron & Walter 2007; Dudek *et al.* 2009; Braakman & Bulleid 2011). Im Falle von BiP wurde zu Depletionszwecken nicht nur die auf siRNA basierende Strategie der RNA Interferenz genutzt, sondern auch das von James und Adrienne Paton (Adelaide, Australien) entdeckte, gereinigte und bereitgestellte AB₅ Zytotoxin Subtilase (Paton *et al.* 2006). Zusätzlich wurde durch die niedermolekularen Substanzen DTT und Tunicamycin versucht auf pharmakologische Weise eine funktionelle Depletion von BiP zu erzwingen, wobei die durch die Faltungsantagonisten induzierte Proteinfehlfaltung hauptsächlich neusynthetisierter Polypeptide den retikulären Gehalt an frei verfügbarem BiP minimieren sollte.

IV.3.1 Einfluss der *BIP* Expressionsreduktion durch RNAi auf die Ca^{2+} -Homöostase

Als erste Herangehensweise für eine effiziente BiP Depletion in HeLa-Zellen wurde die im Labor etablierte Methode der siRNA vermittelten posttranskriptionellen Genstilllegung gewählt. Um auch in diesem Fall der einfachsten Empfehlung bei Arbeiten mit siRNA Folge zu leisten, wurden zwei unterschiedlich konstituierte gegen die *BIP* mRNA gerichtete siRNAs verwendet.

Der Western Blot der Abbildung IV-23A verdeutlicht, dass, normalisiert zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen, die *BIP* siRNA den BiP Gehalt zu 79 % und die *BIP*-UTR siRNA zu 82 % dezimierte. Beide *BIP* gerichteten siRNA Transfektionen verringerten also innerhalb von 48 h effizient den Proteingehalt an BiP, wohingegen Kontrollproteine wie Sec63 und das durch die UPR regulierte Grp170 nicht im Syntheseniveau beeinflusst schienen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung der BiP depletierten Zellen mittels Ca^{2+} -„imaging“. Hierbei erfolgte eine Fokussierung auf zwei Aspekte; den durch Ionomycin aktivierbaren Gehalt freier Ca^{2+} -Ionen (s. Abb. IV-23B) und die Auswirkung der Agenzien DTT und Tunicamycin (Tun) auf BiP depletierte Zellen (s. Abb. IV-23D und E).

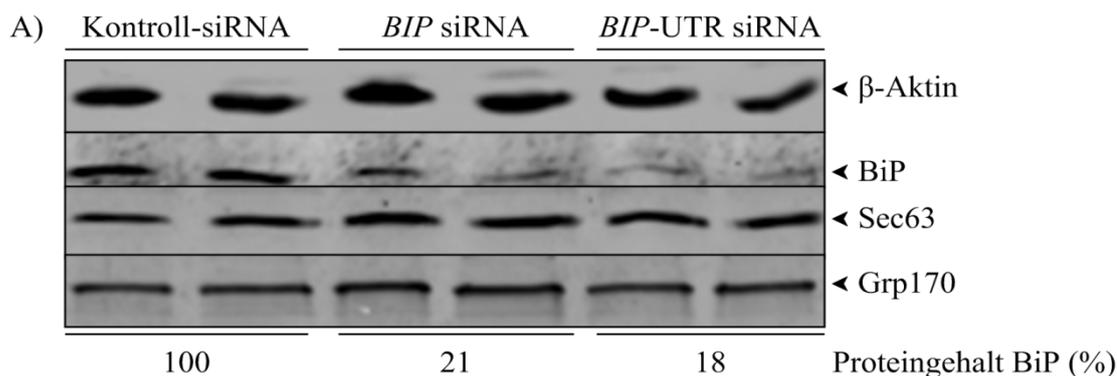
Die Bestimmungen der Fluoreszenzintensitätsdifferenz vor und nach Ionomycingabe (Δ Ratiowerte (s. Abb. IV-23B)) wies im Vergleich zu Kontrollzellen nach 48 stündiger BiP

Depletion bereits eine schwache Änderung auf. Die mittleren Maxima bewegten sich bei 1392 Δ Ratio (Kontroll-siRNA), 1493 Δ Ratio (*BIP* siRNA) und 1471 Δ Ratio (*BIP*-UTR siRNA). Die zugehörige Statistik lieferte für ein Signifikanzniveau von $0,05 > p > 0,01$ (vgl. Kapitel III.7) einen Unterschied.

Wie bereits zuvor in Abbildung IV-19 gesehen, resultierte auch in diesem Experiment nach 48 h Kontroll-siRNA Transfektion die dreiminütige Behandlung mit DTT und Tun in einem forcierten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER nach Applikation von Thapsigargin (s. Abb. IV-23C). Der TG-induzierte mittlere Anstieg der cytosolischen Kalziumkonzentration in Anwesenheit von Puffer lag bei 485 nM. Dieser Wert wurde durch die zusätzliche Behandlung mit DTT auf 641 nM und durch Tun auf 675 nM gesteigert.

Ein völlig anderes Bild in Bezug auf den passiven Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER lieferte die Messung mit beiden Typen BiP depletierter Zellen. Für beide *BIP* siRNAs zeigte die alleinige TG-Behandlung bereits einen deutlich erhöhten Ca^{2+} -Efflux im Vergleich zu Kontrollzellen. 48 h mit *BIP* siRNA transfizierte Zellen erreichten eine mittlere Maximalamplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ von 1041 nM (s. Abb. IV-23D blaue Kurve). Ähnliches traf auch auf die *BIP*-UTR siRNA transfizierten Zellen zu, deren mittlerer Spitzenwert bei 856 nM lag (s. Abb. IV-23E blaue Kurve). Beide Werte waren also rund doppelt so hoch wie der der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Ungleich den Kontrollzellen aber führten DTT und Tun zu keiner weiteren Stimulation der Ca^{2+} -Ströme. *BIP* siRNA behandelte Zellen (s. Abb. IV-23D) erreichten Werte von 633 nM (DTT) sowie 996 nM (Tun) und *BIP*-UTR siRNA (s. Abb. IV-23E) behandelte Zellen Werte von 849 nM (DTT) sowie 943 nM (Tun).

Um den veränderten Ca^{2+} -Ausstrom BiP depletierter Zellen statistisch zu bekräftigen, erfolgte eine in Abbildung IV-24 dargelegte t-Testanalyse. Die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) BiP depletierter Zellen nach TG-Applikation war gegenüber Kontrollzellen signifikant erhöht. Die bei Kontrollzellen signifikante Erhöhung der $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ in Anwesenheit von Tunicamycin fehlte sowohl bei *BIP* siRNA als auch *BIP*-UTR siRNA behandelten Zellen völlig (s. Abb. IV-24).



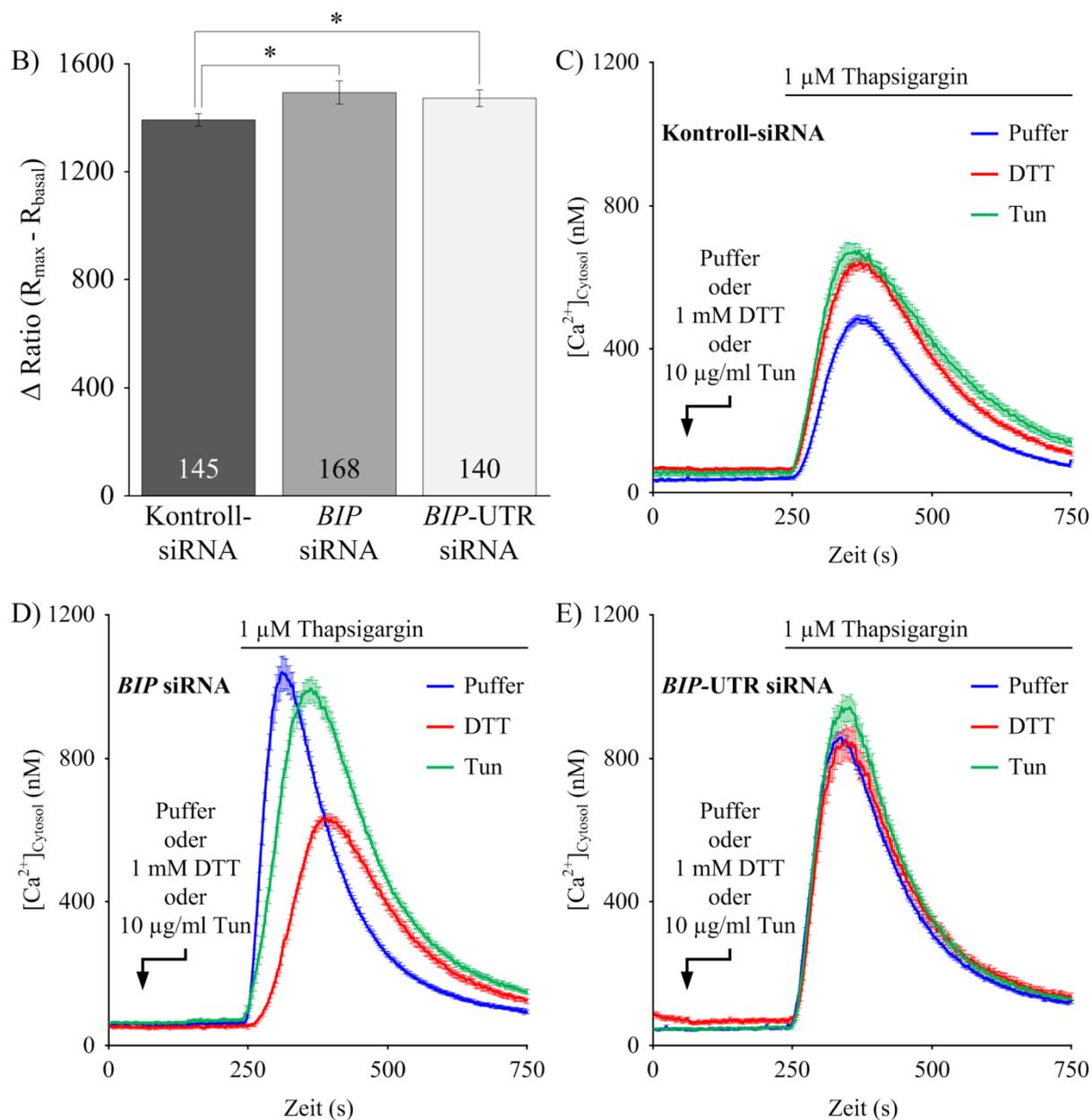


Abb. IV-23: siRNA vermittelte *BIP* Depletion und ihre Auswirkung auf die Ca^{2+} -Homöostase

HeLa-Zellen wurden für 48 h mit 35 nM Kontroll-siRNA, *BIP* siRNA oder *BIP*-UTR siRNA transfiziert (A-E). Ein Aliquot von 3×10^5 geernteten Zellen wurde in Lämmli-Puffer gekocht und in einer Doppelbestimmung nach SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörpern gegen β -Aktin (Ladekontrolle) und weitere Zielproteine dekoriert (A). Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen transfizierte HeLa-Zellen wurden 45 min bei RT mit 4 μM Fura-2 AM beladen, in Ca^{2+} -freie Lösung überführt und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt (B-E). 1 min nach Beginn der Messung wurde mittels 5 μM Ionomycin die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher initiiert und die Differenz (Δ Ratio) aus maximaler Ratio nach Ionomycin Behandlung (R_{\max}) und der basalen Ratio vor Applikation (R_{basal}) quantifiziert (B). Alternativ wurde nach 4 min durch die Gabe von 1 μM Thapsigargin der Ca^{2+} -Ausstrom demaskiert, welchem bereits 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung eine Applikation von Puffer (blau), 1 mM DTT (rot) oder 10 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin (Tun, grün) vorausging (C-E). Die Diagramme (B-E) zeigen Mittelwerte inklusive Fehlerbalken (Standardfehler). Zahlen am Fuße der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen (B).

Obwohl es sich bei der gezeigten BiP Depletion durch siRNA lediglich um ein Einzel-experiment handelte, war die Tendenz der Ca^{2+} -Ströme unter verschiedenen Einflussgrößen frappierend ähnlich zu den Messungen mit der *SEC61A-Y344H* Mutante. Somit schien BiP als ein potentieller Interaktionspartner – begründet auf der phänotypischen Schnittmenge mit der Y344H Mutante – des Sec61 Komplexes identifiziert (vgl. Abb. IV-23 und Abb. IV-20).

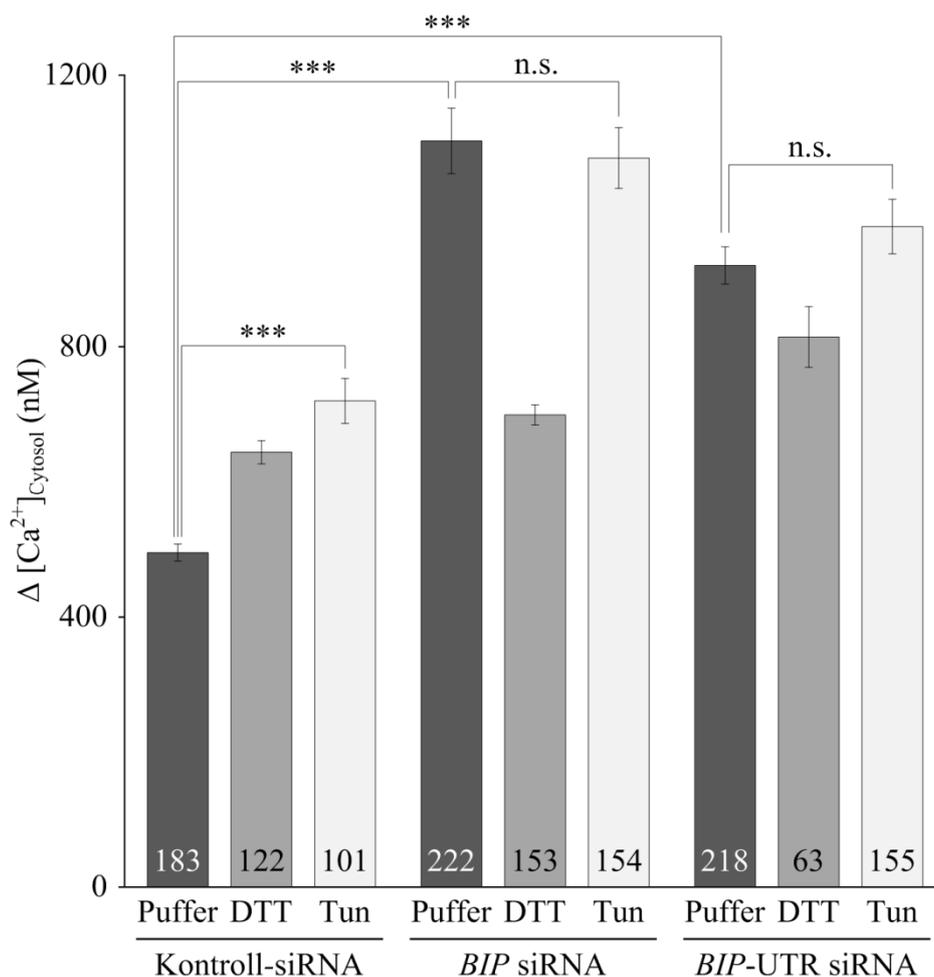


Abb. IV-24: Statistische Analyse der Effekte von DTT und Tunicamycin auf den passiven Ca^{2+} -Ausstrom BiP depletierter Zellen (siRNA)

HeLa-Zellen wurden wie in Abb. IV-23 beschrieben behandelt und analysiert. Gezeigt ist die Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) nach Thapsigargingabe der Experimente C-E der Abbildung IV-23 mit (DTT, Tun) oder ohne (Puffer) Faltungsantagonist. Abgebildet sind die Mittelwerte inklusive Standardfehler und die Anzahl analysierter Zellen. P-Werte $< 0,001$ wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. n.s. = nicht signifikant

An diesem Punkt der Arbeit galt es zwei Alternativen gegeneinander abzuwägen. Sollte die weitere Charakterisierung der BiP Depletion durch die RNA Interferenz Strategie fortgeführt werden, oder bedient man sich der Variante der enzymatischen BiP Depletion durch eine spezifische Protease.

Gegen die Verwendung der siRNA basierten BiP Depletion sprach, dass längere *BIP* siRNA Behandlungen zu einem drastischen Absterben behandelter Zellen führten (Daten nicht gezeigt). Zudem kam es zu einer Änderung der Proteostasis (bedingt durch die Aktivierung der UPR) und auch zu massiven Änderungen des zellulären Ca^{2+} -Haushaltes (Sabine Cappel und Nico Schäuble, persönliche Kommunikation). Letztere manifestiert sich v.a. in der – sich bereits nach 48 h andeuteten (s. Abb. IV-23B) – starken Erhöhung des freien Ca^{2+} -Gehaltes. Zudem war die Effizienz der BiP Depletion mitunter variabel.

Daher wurde für die nachfolgenden Experimente zur effizienten BiP Depletion das aus der Literatur bekannte Subtilase AB_5 Zytotoxin verwendet. Der bestehende Nachteil des Verzichts auf das etablierte System der RNAi in Kombination mit der plasmidgebundenen Komplementation könnte jedoch bei Bedarf in abgewandelter Form auch in Kombination mit der Subtilase etabliert werden.

IV.3.2 Auswirkungen der *BIP* Reduktion durch das Zytotoxin Subtilase (SubAB)

Die vordergründige Frage bei der Arbeit mit der Subtilase war, ob sich die unter Punkt IV.3.1 mittels RNAi gesammelten Daten auch durch diese Methode zur Senkung der *BIP* Expression reproduzieren lassen und ob man die sich andeutende Modulation der ER Translokase durch BiP verifizieren bzw. konkretisieren kann. Bevor jedoch die Fragestellung angegangen werden konnte, musste die toxinvermittelte BiP Depletion zunächst zuverlässig im Labor etabliert werden.

IV.3.2.1 Etablierung der *BIP* Reduktion mittels Subtilase

Da die Literatur bis dato nur auf wenige Daten bezüglich BiP Spaltung in HeLa-Zellen durch die Subtilase (SubAB) verweist, wurde zunächst durch eine Titration und Kinetik eine effektive SubAB Konzentration ermittelt (s. Abb. III-03 und III-04; Kapitel III.6.5). Daraufhin wurden HeLa-Zellen für 2 h mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Subtilase bzw. zu Kontrollzwecken mit der inaktiven Form der Protease, deren funktionstragender Serinrest (Ser_{272}) der katalytischen Triade zu Alanin mutiert wurde (SubAB Mutante), behandelt.

Zum Eindeutigen Nachweis der Spaltung des vollständigen BiP in zwei unterschiedlich große Fragmente agierte man im Western Blot mit verschiedenen BiP spezifischen Antikörpern (s. Abb. IV-25).

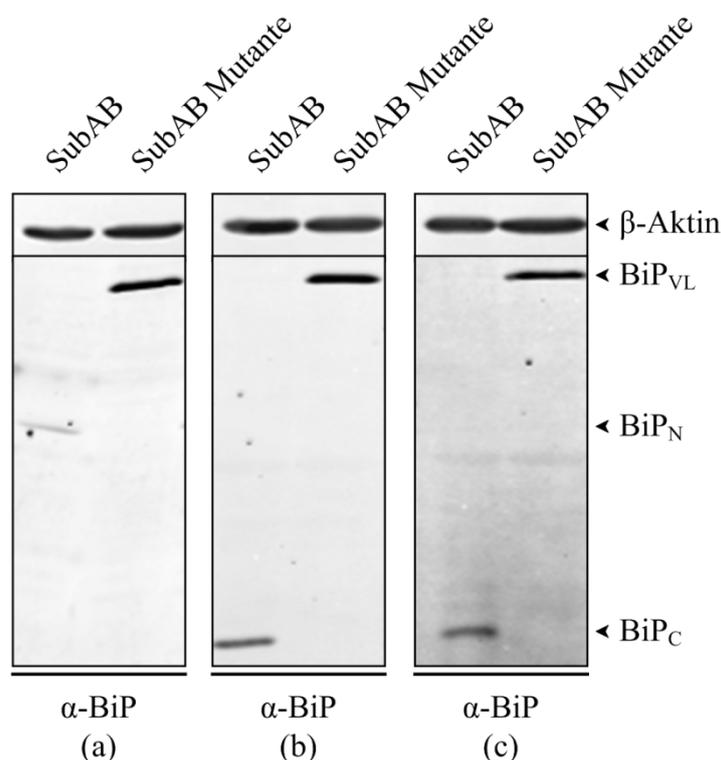


Abb. IV-25: Western Blot Analyse der subtilasevermittelten BiP Fragmentierung

2 h nach Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ aktiver Subtilase (SubAB) oder dem inaktiven Pendant (SubAB Mutante) wurden HeLa-Zellen geerntet, mit Lämmli-Puffer versetzt, gekocht und im Anschluss an eine SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Western Blots wurden mit β -Aktin (Ladekontrolle) und einem von drei verschiedenen BiP Antikörpern (α -BiP (a) - (c)) dekoriert. Der gegen den N-Terminus gerichtete α -BiP (a) erkannte neben volle Länge BiP (BiP_{VL} ; 70 kDa) auch das N-terminale BiP Fragment (BiP_{N} ; 44 kDa). Der gegen den C-Terminus gerichtete monoklonale α -BiP (b) erkannte ebenso wie der monoklonale KDEL-retentionssignalspezifische α -BiP (c) neben volle Länge BiP auch das C-terminale BiP Fragment (BiP_{C} ; 26 kDa).

Durch die Wahl geeigneter Antikörper, welche entweder gegen den N- oder C-Terminus von BiP gerichtet waren, lies sich nach SubAB Behandlung die effiziente BiP Spaltung bestätigen. Darüber hinaus erkannten die Antikörper nur nach Fragmentierung des kompletten BiP je nach Paratop das N- oder C-terminalen Fragment von BiP. Zellen welche zur Kontrolle mit der inaktiven SubAB Mutante behandelt wurden, wiesen nur intaktes BiP auf und keines der beiden Spaltungsprodukte (s. Abb. IV-25).

Auf Grund der Abundanz von BiP (5 μM im ER von rauen Hundepankreas-mikrosomen (Guth *et al.* 2004)) war dessen proteolytische Fragmentierung in SubAB behandelten Zellen auch durch Coomassie-Brillant-Blue-Färbung nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Ein entscheidender Faktor zur Wahl der subtilasebasierenden BiP Depletionsstrategie lag in ihrer Effektivität begründet: die effiziente BiP Spaltung innerhalb eines kurzen Zeitintervalls von lediglich 2 h. Der Vorteil daran ist die Vermeidung der Aktivierung der UPR bis auf Proteinebene und die damit einhergehende Änderung der Proteostase, welche v.a. bei *BIP* siRNA Behandlungen länger als 48 h massiv zu beobachten war.

Um die Effektivität der Subtilasebehandlung und die nach zwei Stunden noch fehlende Auswirkung der UPR auf Proteinebene zu demonstrieren, wurden auf Western Blots diverser SubAB Experimente neben BiP noch weitere Proteine UPR regulierter Gene wie *GRP94* oder *GRP170* (Kaufman 1999; Lee 2001) analysiert (s. Abb. IV-26).

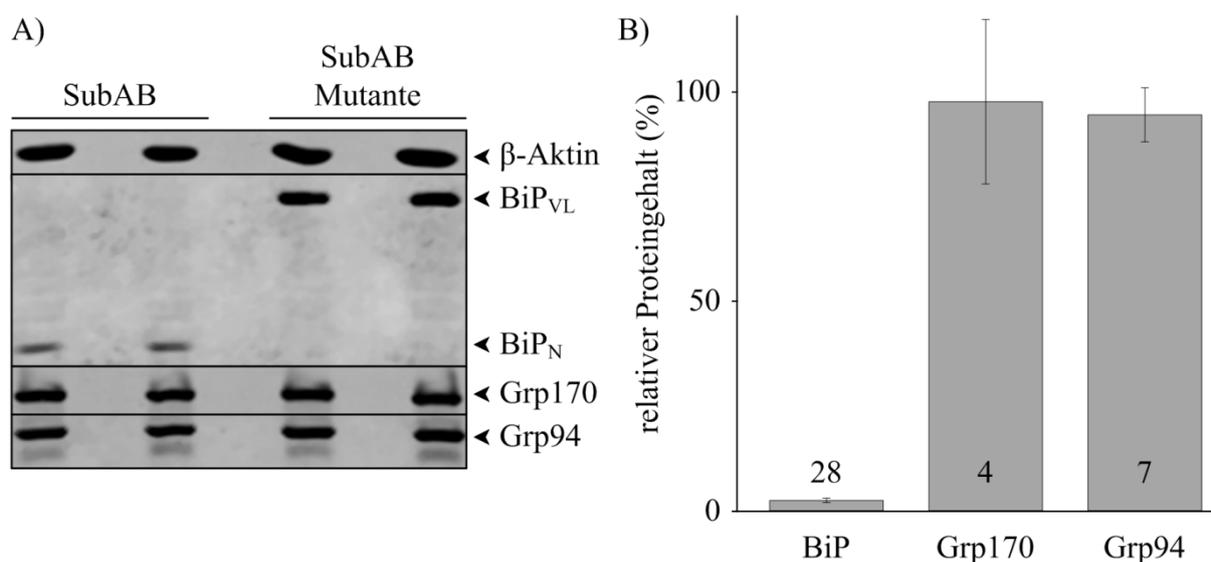


Abb. IV-26: Western Blot Analyse der (fehlenden) UPR-Aktivierung nach 2 h SubAB Behandlung
 (A) HeLa-Zellen wurden für 2 h mit 1 μ g/ml aktiver Subtilase (SubAB) oder dem inaktiven Pendant (SubAB Mutante) inkubiert, geerntet und in Lämmli-Puffer gekocht. Doppelbestimmungen von je 3×10^5 Zellen wurden nach SDS-PAGE und Western Blot mittels Antikörpern gegen β -Aktin (Ladekontrolle), BiP, Grp170 und Grp94 dekoriert. (B) Statistische Zusammenfassung der relativen Proteingehalte nach densitometrischer Auswertung der an β -Aktin abgeglichenen und zu SubAB Mutante normalisierten Signalstärken. Säulen repräsentieren den Mittelwert inklusive Standardfehler. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl analysierter Signale.

Wie Abbildung IV-26 zeigt, führte die zweistündige Inkubation von HeLa-Zellen mit SubAB im Vergleich zu den Kontrollzellen (SubAB Mutante) zur effektiven BiP Depletion auf einen Restproteingehalt von $2 \pm 0\%$ ($n = 28$). Dies resultierte jedoch noch nicht in einer Auswirkung auf die Proteinmenge der UPR-Indikatoren Grp170 und Grp94. Normalisiert zu Kontrollzellen zeigten Grp170 und Grp94 nach SubAB Behandlung weiterhin einen Proteingehalt von $98 \pm 19\%$ ($n = 4$) bzw. $94 \pm 6\%$ ($n = 7$). Allerdings zeigte eine qRT-PCR nach zweistündiger Subtilasebehandlung bereits die Aktivierung der UPR auf Transkriptionsebene für die Transkripte BiP, CHOP und das gespleißte XBP1 (Daten nicht gezeigt).

Wie die Auflichtmikroskopie zeigte (s. Abb. III-03), genügten bereits geringste SubAB Konzentrationen (ab 10 ng/ml) um das Absterben von HeLa-Zellen zu induzieren. Daher wurde im weiteren Verlauf die Auswirkung der 2 h andauernden Reduktion von BiP auf die Parameter Zellzahl und Zellviabilität im Vergleich zu einer Behandlung von 16 h untersucht. Abbildung IV-27 verdeutlicht, dass 2 h nach Behandlung mit dem aktiven oder inaktiven Toxin weder die relative Zellzahl noch Zellviabilität verändert war (vgl. dunkelgraue Balken). Die relative Zellzahl nach 2 h SubAB Behandlung lag bei $87 \pm 3 \%$ ($n = 31$) und die der Kontrollzellen bei $88 \pm 3 \%$ ($n = 31$). Zugehörige relative Zellviabilitäten beliefen sich auf $96 \pm 1 \%$ ($n = 36$, SubAB) bzw. $97 \pm 0 \%$ ($n = 35$, SubAB Mutante). Im Gegensatz zu der (geringen) verzeichneten Zellproliferation innerhalb der weiteren 14 h mit SubAB Mutante kultivierten Zellen ($100 \pm 5 \%$ ($n = 4$)), stagnierte die Zellzahl BiP depletierter Zellen ($87 \pm 3 \%$ ($n = 4$)) im Vergleich zu den 2 h Werten. Die Zellviabilität nach 2 h oder 16 h Behandlung war unverändert. Es deutete sich an, dass die Zellviabilität der SubAB Zellen mit $92 \pm 1 \%$ ($n = 4$) minimal verringert erschien gegenüber Kontrollzellen ($96 \pm 0 \%$ ($n = 4$)).

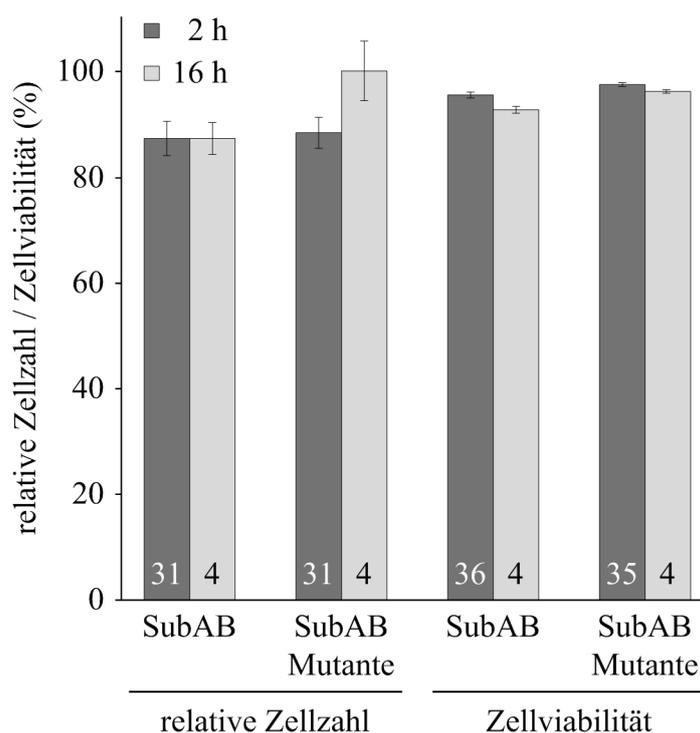


Abb. IV-27: Vergleich der relativen Zellzahl/Zellviabilität nach 2 h und 16 h SubAB Behandlung

Dargestellt sind Mittelwerte der relativen Zellzahl (linke Hälfte) und Zellviabilität (rechte Hälfte) für 2 h (dunkelgrau) bzw. 16 h (hellgrau) mit $1 \mu\text{g/ml}$ aktiver (SubAB) oder inaktiver Subtilase (SubAB Mutante) behandelter HeLa-Zellen. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte unter Verwendung des „Countess® Automated Cell Counter“. Die Zellzahlen sind bezogen auf den 16 h-Wert der mit SubAB Mutante behandelten Zellen. Die Ermittlung der Zellviabilität erfolgte ebenfalls mit Hilfe des „Countess® Automated Cell Counter“. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl der automatisierten Auszählungen.

Im letzten Schritt der Charakterisierung der *BIP* Reduktion durch das Zytotoxin Subtilase ging man der Auswirkung der verlängerten Abwesenheit von BiP auf die Zellproliferation nach. Da die Zellproliferation – abgeglichen auf SubAB Mutante behandelte Kontrollzellen – bereits nach 16 h Abwesenheit von BiP beeinflusst schien (vgl. Abb. IV-27) dehnte man diese Analyse zeitlich aus und ergänzte sie zudem durch verschiedene Zelltypen (HeLa, HEK-293, PC3) sowie eine Konzentrationsreihe der aktiven Subtilase (s. Abb. IV-28).

Die Prüfung der langfristigen Zellproliferation in Abhängigkeit der *BIP* Reduktion durch Subtilase erfolgte mit Hilfe des xCELLigence RTCA Systems (Erklärung s. Kapitel III.6.7). Durch die kontinuierliche, markierungsfreie Analyse der Impedanz wurde die dimensionslose Größe des Zellindex, welcher prinzipiell mit Zellwachstum (egal ob durch Zellvermehrung oder Zellvergrößerung hervorgerufen) gleichzusetzen ist, bestimmt.

Abbildung IV-28 verdeutlicht die hohe Toxizität der Subtilase (rote Kurven) für alle drei untersuchten Zelllinien HeLa (A), PC3 (B) und HEK-293 (C). Im Gegenzug wies der Zellindex (die Zellproliferation) der drei Zelltypen durch die Behandlung mit 1 µg/ml SubAB Mutante (blaue Kurve) im Abgleich zu absolut unbehandelten Zellen (schwarze Kurve) keinerlei Beeinträchtigung auf. Vielmehr erschien in allen Fällen die Proliferation (oder das Zellgrößenwachstum) durch die Inkubation mit SubAB Mutante leicht gesteigert gegenüber den unbehandelten Zellen.

Im Detail waren die drei getesteten SubAB Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1 µg/ml für die PC3 und HEK-293 Zellen ausnahmslos toxisch. Lediglich HeLa-Zellen boten das Potential sich ungefähr 96 h nach der Applikation von 10 ng/ml SubAB von der BiP Depletion zu erholen.

Unabhängig der getesteten Konzentration begann das Absterben nach Toxinzugabe, trotz der schnellen BiP Depletion innerhalb von 2 h (s. Abb. IV-26), nicht sofort. Erst nach einer anfänglichen „lag“-Phase von etwa sechs bis zwölf Stunden, in welcher behandelte Zellen (mit Ausnahme der PC3) vergleichbar zu beiden Kontrollzelltypen (unbehandelt und SubAB Mutante) proliferierten, begann der Stopp der Proliferation mit einsetzendem Zelltod.

Vergleicht man die Diagramme A-C der Abbildung IV-28 untereinander, erkennt man darüber hinaus die unterschiedlichen, zelltypspezifischen Zellindices einzelner Zelllinien. Dieser charakteristische Parameter resultiert aus den verschiedenen Zellgrößen und deren ungleichem Verhalten im Sinne der Adhärenz.

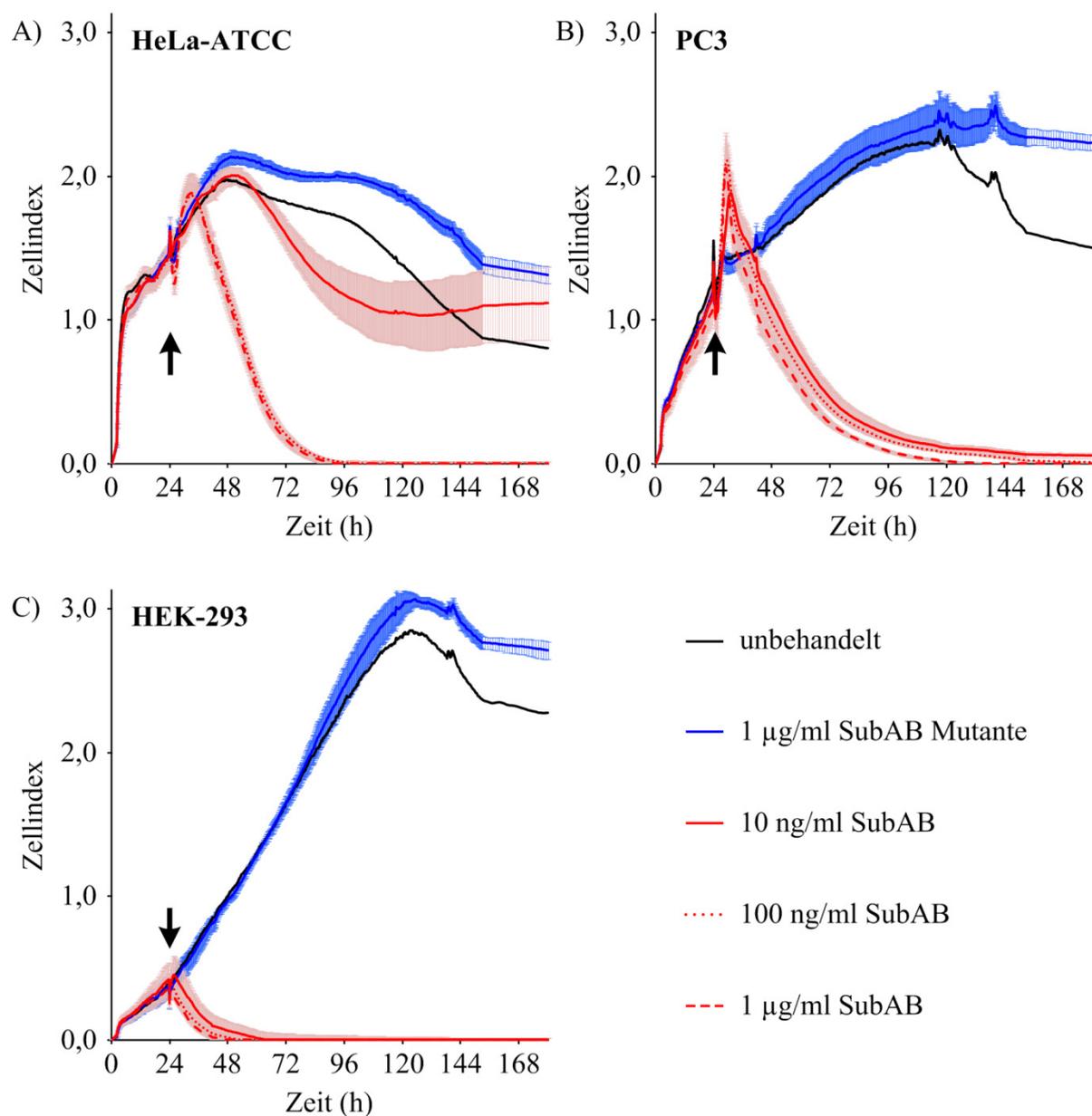


Abb. IV-28: Auswirkung der SubAB-vermittelten BiP Depletion auf die Zellproliferation unterschiedlicher Zelltypen

10.000 Zellen (HeLa-ATCC (A), PC3 (B) oder HEK-293 (C)) wurden in einer 96-Well E-Plate ausgesät, um deren Wachstum mit Hilfe des xCELLigence Systems zu bestimmen. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmalig mit Kulturmedium (unbehandelt, schwarz) oder darin verdünnter inaktiver Subtilase (SubAB Mutante, blau) bzw. aktiver Subtilase (SubAB, rot) behandelt (vertikale Pfeile). Die finale Toxinkonzentration betrug 10 ng/ml, 100 ng/ml bzw. 1.000 ng/ml. Die SubAB Mutante wurde lediglich in der höchsten Dosis von 1.000 ng/ml (= 1 µg/ml) verabreicht. Das Messintervall für den Zeitraum von 0 - 24 h wurde auf 15 min festgelegt. Das Zeitfenster von 24 h bis 153 h wurde in 10 min Intervallen vermessen und der nachfolgende Abschnitt in Zeitspannen von 60 min. Die Datenanalyse erfolgte durch die RTCA 1.2 Software. Mit Ausnahme der unbehandelten Zellen erfolgten die Messungen als Triplikat. Die Funktionsgraphen zeigen Mittelwerte gegebenfalls inklusive dem Standardfehler.

IV.3.2.2 Einfluss der toxinvermittelten BiP Reduktion auf die Ca^{2+} -Homöostase

Mit den so etablierten Rahmenbedingungen einer effektiven BiP Depletion durch die Subtilase (s. Kapitel IV.3.2.1), wurden nun deren Auswirkungen auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase untersucht. Dies erfolgte in gleicher Weise wie zuvor für die siRNA vermittelte BiP Depletion (vgl. Kapitel IV.3.1). Hierzu wurde die Ca^{2+} -Freisetzung in Subtilase behandelten Zellen in Ab- und Anwesenheit von DTT oder Tun durch Thapsigargin (TG) initiiert (vgl. Abb. IV-23C-E).

Wie in den Experimenten zuvor, erzeugte die kurzzeitige Vorbehandlung mit DTT oder Tun in Kontrollzellen (SubAB Mutante) eine erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach TG-Applikation (s. Abb. IV-29A). Maximalwerte der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ lagen bei 314 nM (Puffer) bzw. bei 392 nM (DTT) und 446 nM (Tun). Zum gleichen Resultat kam die Auswertung der Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor und nach TG-Applikation (s. Abb. IV-29C linke Hälfte). Werte der $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ lagen bei 294 nM (Puffer) bzw. bei 378 nM (DTT) und 468 nM (Tun).

Im Gegensatz zur siRNA vermittelten BiP Depletion führte die proteolytische Spaltung von BiP durch die Subtilase (SubAB) zu keinerlei Veränderung des passiven Ca^{2+} -Ausstroms gegenüber den Kontrollzellen (vgl. Abb. IV-29A und B). Weder die erhöhte Ausschüttung an Ca^{2+} ins Cytosol noch die fehlende Stimulation des Ca^{2+} -Leckstroms in Anwesenheit von DTT oder Tun waren nach Spaltung von BiP durch die Subtilase zu erkennen. Nach SubAB Behandlung lagen die Maximalwerte der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ bei 308 nM (Puffer) bzw. bei 414 nM (DTT) und 535 nM (Tun). Ein vergleichbares Bild lieferte die Berechnung der Werte der $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$ (s. Abb. IV-29C rechte Hälfte) mit 287 nM (Puffer) bzw. 407 nM (DTT) und 571 nM (Tun).

Trotz der deutlich effektiveren Depletion des Gehaltes an BiP durch die Subtilase im Vergleich zur siRNA Behandlung (vgl. Abb. IV-23A mit Abb. IV-26A), waren die Effekte nach Spaltung von BiP nicht zu den Auswirkungen der RNAi basierenden Elimination von BiP in Übereinstimmung zu bringen. Daher wurden weitere Ca^{2+} -Ströme analysiert, um möglicherweise so eine Auswirkung der Subtilasebehandlung zu detektieren. Der kapazitive Ca^{2+} -Einstrom (CCE), auch „store-operated Ca^{2+} entry“ (SOCE) genannt, wurde als nächstes untersucht.

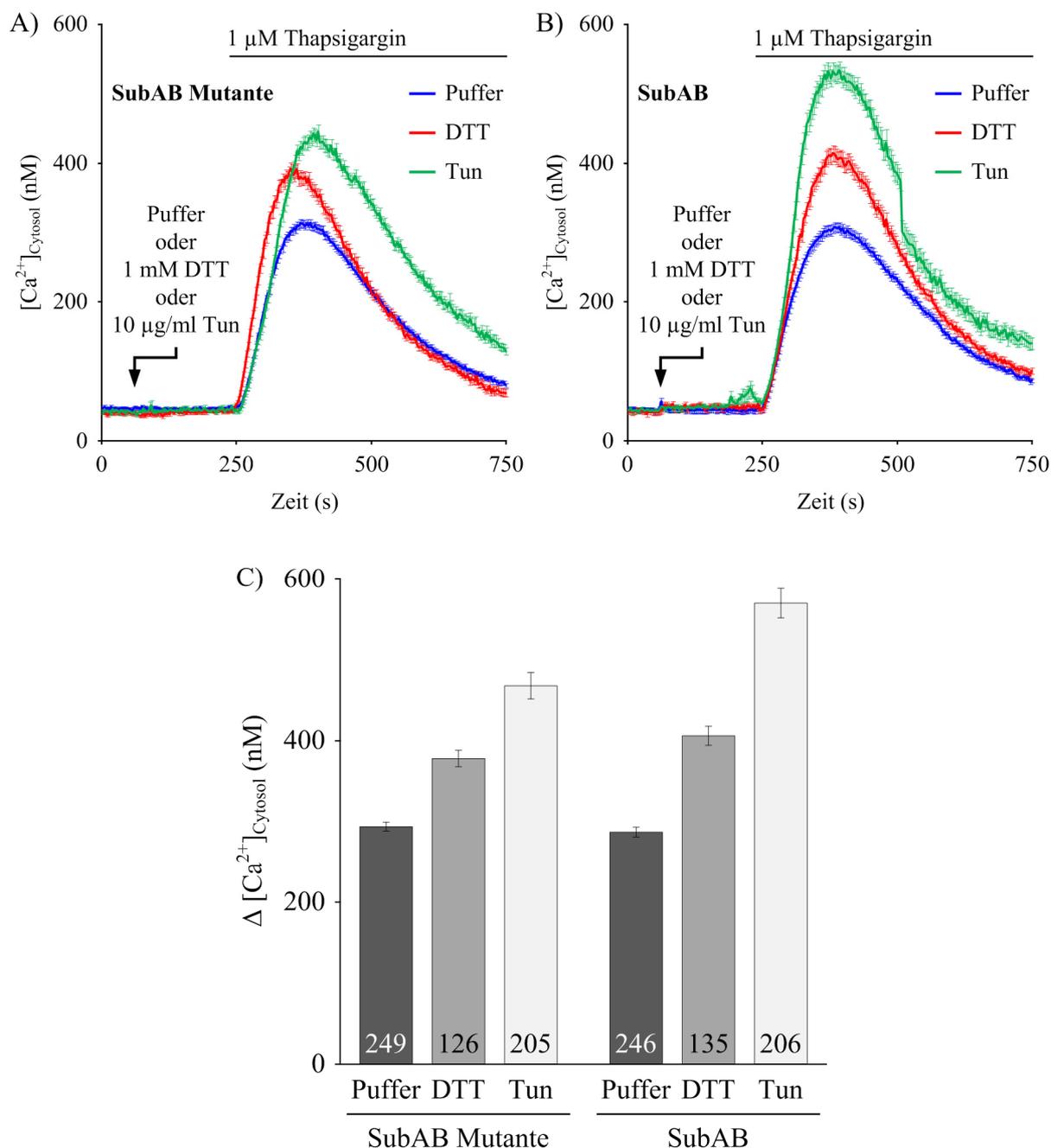


Abb. IV-29: Subtilasevermittelte BiP Depletion und ihre Auswirkung auf den passiven Ca^{2+} -Efflux

Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesäte HeLa-Zellen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für weitere zwei bis vier Stunden mit 1 μ g/ml aktiver Subtilase (SubAB) oder einer inaktiven Mutante (SubAB Mutante) behandelt. Nach der in Medium erfolgenden Beladung der Zellen für 45 min bei RT mit 4 μ M Fura-2 AM, wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie Lösung überführt und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt (A, B). 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung wurden die Zellen mit Puffer, 1 mM DTT oder 10 μ g/ml Tunicamycin (Tun) behandelt bevor weitere 3 min später durch die Gabe von 1 μ M Thapsigargin die Ca^{2+} -Freisetzung initiiert wurde.

Das Säulendiagramm (C) beinhaltet die mittlere Änderung der cytosolischen Kalziumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{Cytosol}$) nach Thapsigargingabe mit (DTT, Tun) oder ohne (Puffer) Faltungsantagonist. Die Diagramme (A-C) zeigen Mittelwerte inklusive Standardfehler. Zahlen am Fuße der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen.

Um den CCE zu provozieren, bediente man sich im experimentellen Setup des Ca^{2+} -„imaging“ zweier unterschiedlicher Vorgehensweisen (s. Kapitel III.6.9.4D).

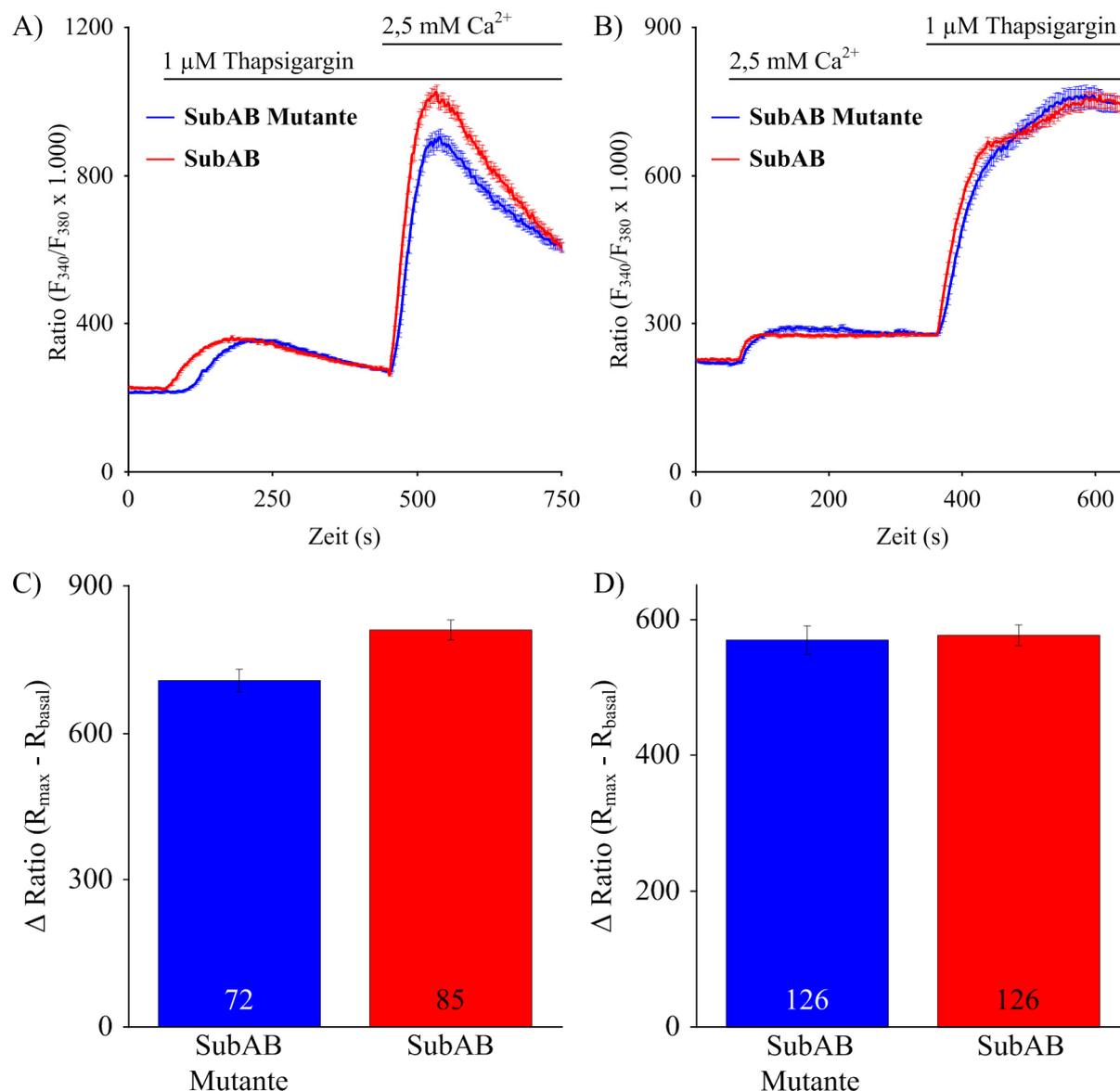


Abb. IV-30: Auswirkung der subtilasevermittelten BiP Depletion auf den kapazitiven Ca^{2+} -Influx

Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesäte HeLa-Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend für weitere zwei bis vier Stunden mit $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ aktiver Subtilase (SubAB) oder einer inaktiven Mutante (SubAB Mutante) behandelt. Nach der in Medium erfolgenden Beladung der Zellen für 45 min bei RT mit $4 \mu\text{M}$ Fura-2 AM, wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie Lösung überführt und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt (A, B). 1 min nach Start der Messung wurde $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin (A) oder $2,5 \text{ mM}$ Ca^{2+} -Lösung (B) zugegeben. Nach 7 min erfolgte die Initiation des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms (CCE) durch die Applikation von $2,5 \text{ mM}$ Ca^{2+} -Lösung (A) oder nach 5,5 min durch $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin (B). Für Teil C und D wurde die Differenz (ΔRatio) aus maximaler Ratio nach der 2. Applikation (R_{max}) und der basalen Ratio vor der ersten Applikation (R_{basal}) quantifiziert. Die Diagramme (A-D) zeigen Mittelwerte inklusive dem Standardfehler. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen.

Wurde der CCE durch die sequentielle Applikation von 2,5 mM Ca^{2+} und 1 μM Thapsigargin ausgelöst (s. Abb. IV-30B und D), war die vorherige Depletion von BiP durch die Subtilase ohne Auswirkung. Die quantifizierten Δ Ratiowerte lagen bei 570 Δ Ratio (SubAB Mutante) und 577 Δ Ratio (SubAB).

Die inverse Applikationsreihenfolge (zuerst Thapsigargin dann Ca^{2+}) resultierte ebenfalls in einem deutlichen CCE (s. Abb. IV-30A und C). Hier schien sich ein leicht erhöhter kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom nach Entleerung des ER luminalen Ca^{2+} -Speichers in Abwesenheit von BiP anzudeuten. Die Quantifizierungen ergaben 707 Δ Ratio (SubAB Mutante) und 809 Δ Ratio (SubAB). Dieses Experiment wurde jedoch nicht mehrfach reproduziert und ist daher mit keiner Signifikanz zu bewerten.

Da offensichtlich die durch die Subtilase erzwungene Spaltung von BiP weder einen direkten Einfluss auf den passiven Ca^{2+} -Efflux aus dem ER Lumen (s. Abb. IV-29) noch auf den Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Milieu (s. Abb. IV-30) nahm, wurde eine mögliche Änderung der durch Ionomycin freisetzbaren Menge an zellulärem Kalzium untersucht. Unter Beachtung der beiden zuvor genannten fehlenden Einflüsse auf die Ca^{2+} -Ströme im kurzen Zeitfenster nach zwei Stunden Depletion, wurde die Ionomycinanalyse um eine zeitlich ausgedehntere Subtilasebehandlung von 16 h ergänzt. Die statistische Auswertung dieses Experiments ist in der nachfolgenden Abbildung IV-31 zusammengefasst.

Die linke Hälfte der Abbildung illustriert, dass eine zweistündige Inkubation mit Subtilase trotz vollständiger BiP Spaltung keinen Einfluss auf den zellulären Gehalt an Kalzium hatte. Die zugehörigen Werte von 1138 Δ Ratio (SubAB Mutante) und 1181 Δ Ratio (SubAB) sind nicht signifikant voneinander verschieden.

Bei Betrachtung des Resultats der Messung nach 16 h Behandlung fallen zwei Unterschiede ins Auge. Zum Einen ergab sich für die Kontrollzellen (SubAB Mutante) nach 16 h ein erkennbar verringerter Gehalt an freigesetzten Ca^{2+} -Ionen (857 Δ Ratio). Und zum Anderen war demgegenüber der Gehalt an Kalzium in Folge der längerfristigen BiP Depletion nochmals um über $\frac{2}{3}$ gesenkt auf 269 Δ Ratio (SubAB).

Offensichtlich scheint die Subtilasebehandlung doch Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase zu nehmen, zumindest bei Betrachtung des Gesamtgehalts an freiem Ca^{2+} . Daher galt es in einer letzten Versuchsreihe einen möglicherweise direkten Einfluss der Toxinbehandlung auf den cytosolischen Ca^{2+} -Level zu untersuchen (s. Abb. IV-32).

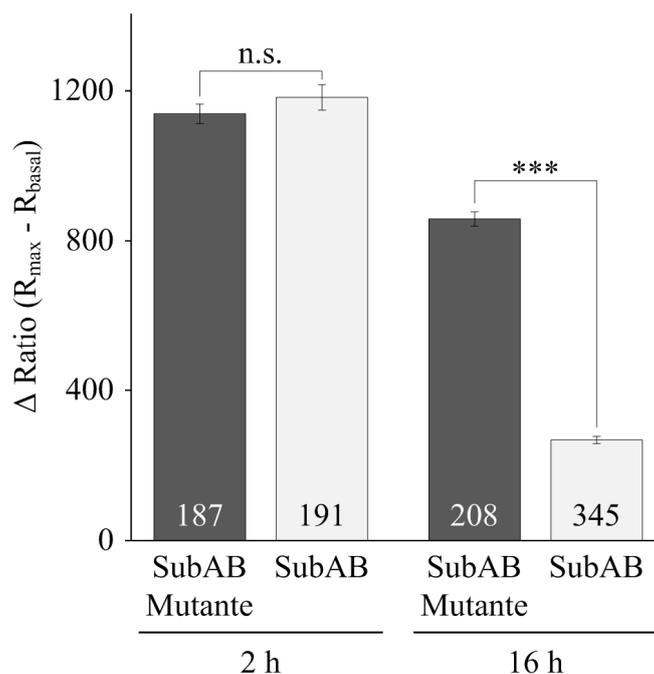


Abb. IV-31: Subtilasevermittelte BiP Depletion und ihre zeitliche Auswirkung auf den Kalziumgehalt
 Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesäte HeLa-Zellen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für weitere zwei bis vier Stunden mit 1 µg/ml aktiver Subtilase (SubAB) oder einer inaktiven Mutante (SubAB Mutante) behandelt. Nach der in Medium erfolgenden Beladung der Zellen für 45 min bei RT mit 4 µM Fura-2 AM, wurden die Zellen in Ca²⁺-freie Lösung überführt und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt. 1 min nach Beginn der Messung wurde mittels 5 µM Ionomycin die Entleerung der Ca²⁺-Speicher initiiert und die Änderung (Δ Ratio) aus maximaler Ratio nach Ionomycin Behandlung (R_{max}) und der basalen Ratio vor Applikation (R_{basal}) quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte inklusive dem Standardfehler. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen. P-Werte < 0,001 wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert und durch 3 Sterne (***) markiert. n.s. = nicht signifikant

Abbildung IV-32 zeigt das Ergebnis der Subtilaseapplikation bei laufender Messung der cytosolischen Ca²⁺-Fluktuationen (Fura-2-,imaging“). Unbehandelte Zellen wiesen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 60 min eine nahezu konstante cytosolische Ca²⁺-Konzentrationen ([Ca²⁺]_{Cytosol}) von rund 40 nM auf. Ein befürchtetes Ausbleichen des Fura-2 durch die ständige Anregung (1/6 Hz) bei 340 nm und 380 nm trat nicht auf. Die mittlere Steigung der [Ca²⁺]_{Cytosol} im Intervall von 5 min bis 60 min war somit nahe Null (-0,01 nM Ca²⁺/min). Die mit der inaktiven Mutante der Subtilase behandelten Zellen erfuhren hingegen einen leichten Anstieg der [Ca²⁺]_{Cytosol} von 55 nM zu Beginn auf etwa 80 nM nach 60 min. Die Auswertung der mittleren Steigung lieferte einen Wert von 0,41 nM Ca²⁺/min. Deutlich ausgeprägter war der Anstieg der [Ca²⁺]_{Cytosol} nach Zugabe der aktiven Subtilase. Vermutlich durch die direkte Spaltung von BiP erhöhte sich der cytosolische Level an Ca²⁺ innerhalb einer Stunde von 60 nM auf 140 nM mit einer resultierenden Steigung im Intervall von 5 min bis 60 min von fast 1,3 nM Ca²⁺/min.

Auffällig für beide Toxinbehandlungen ist die minimale Verzögerung des Anstiegs der cytosolischen Ca^{2+} -Level nach Toxingabe von etwa 4 - 5 min. Diese Wirkverzögerung beruht wahrscheinlich auf der Dauer der Internalisierung des Toxins und dessen retrogradem Transport zum ER Lumen. Die knapp fünfminütige Wirkverzögerung ist zugleich auch der Grund weshalb die Steigung für das Intervall von 5 min bis 60 min berechnet wurde.

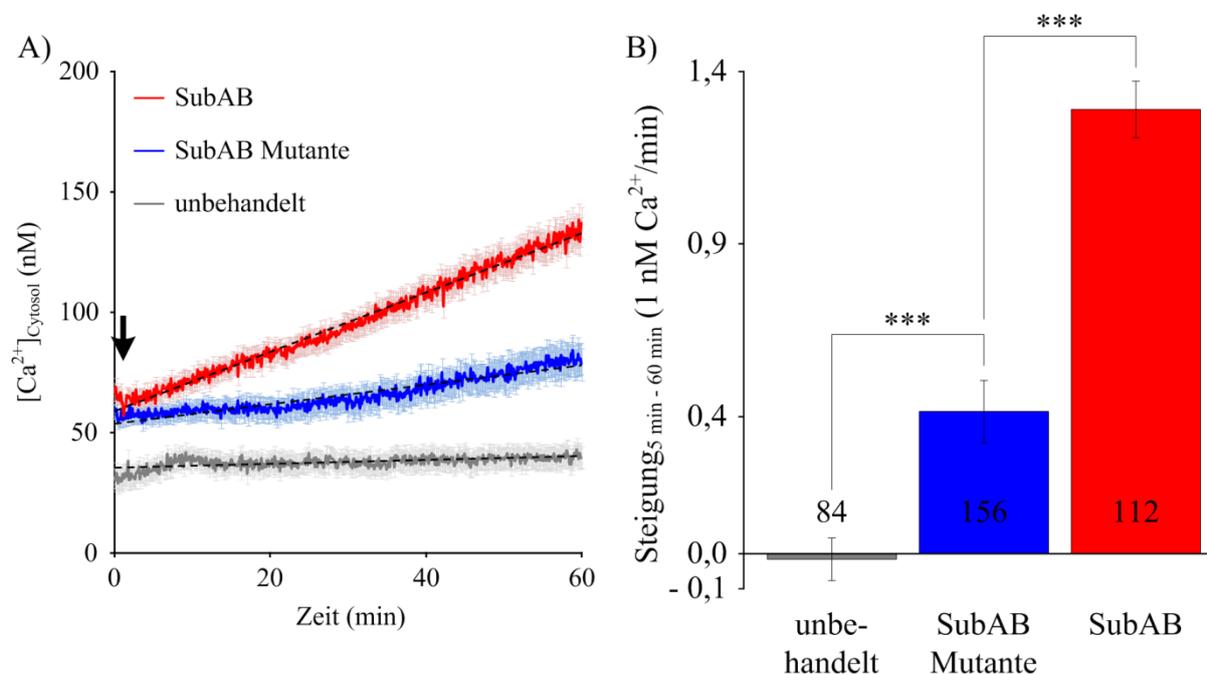


Abb. IV-32: Subtilasevermittelte BiP Depletion und ihre direkte Auswirkung auf das Ca^{2+} -„leakage“

(A) Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesäte HeLa-Zellen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach der in Medium erfolgenden Beladung der Zellen für 45 min bei RT mit 4 μM Fura-2 AM, wurden die Zellen in Ca^{2+} -freie Lösung überführt und in den Strahlengang des iMIC Mikroskops eingespannt. 1 min nach Beginn der kalibrierten Messung wurde Ca^{2+} -freier Puffer (unbehandelt, grau) oder darin verdünnte aktive Subtilase (SubAB, rot) bzw. inaktive Mutante (SubAB Mutante, blau) in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben (senkrechter Pfeil). Eingezeichnete Trendlinien (schwarz gestrichelt) sind durch folgende Funktionsgleichungen in Excel bestimmt: $y(x) = 1,232x + 58,93$ (SubAB); $y(x) = 0,404x + 53,56$ (SubAB Mutante); $y(x) = 0,082x + 35,17$ (unbehandelt). (B) Das Säulendiagramm beziffert die durchschnittliche Steigung der sich erhöhenden cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration des Zeitfensters von 5 min bis 60 min in 1 nM Ca^{2+} pro Minute. Zahlen am Fuß der Säulen geben die Anzahl analysierter Zellen. Beide Diagramme (A, B) zeigen Mittelwerte inklusive dem Standardfehler. P-Werte < 0,001 (***) wurden mittels ungepaartem t-Test als signifikant definiert.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die weiterführende Fragestellung nach möglichen Modulatoren des Sec61 Komplexes (insbesondere in Zusammenhang mit den Ergebnissen der *SEC61A-Y344H* Mutante) auch in Bezug auf Proteintransport untersucht. Offen war, ob die Depletion des potentiellen Interaktionspartners BiP auch in den Transportexperimenten einen ähnlichen Phänotyp (Substratspezifität) wie die Punktmutation des Sec61 α zeigt und so zumindest das Resultat der siRNA vermittelten BiP Elimination weiter festigt?

IV.3.2.3 Einfluss der BiP Reduktion durch Subtilase auf den Proteintransport ins ER

Der letzte Teil der Arbeit basiert nochmals auf dem für Sec61 α etablierten Testsystem der Proteintranslokation. Mit Hilfe der effizienten BiP Depletion durch die Subtilase galt es zum Einen die bestehenden Literaturdaten, welche die Notwendigkeit des Chaperons zur Proteintranslokation und Sekretion in Hefe und Säuger bestätigen (Brodsky *et al.* 1995; High 1995; Hu *et al.* 2009), zu untermauern. Zum Anderen wurde zeitgleich versucht die Funktion des humanen BiP zur Proteintranslokation in Form eines zusätzlichen Modulators des Sec61 Komplexes zu verifizieren. Eine vergleichbare, substratspezifische Transportdefizienz BiP depletierter Zellen und der *SEC61A-Y344H* komplementierten Zellen würde die Idee der Interaktion der Makromoleküle weiter festigen.

Wie für *SEC61A1* (s. Kapitel IV.1.3.2) wurde zunächst der signalpeptidabhängige Proteintransport ins ER in Abhängigkeit des Expressionsgrades an *BIP* bestimmt. Um die Vergleichbarkeit zur *SEC61A* Studie zu wahren, wurde auch im Zuge der BiP Depletion ein ähnliches Set an Modellsubstraten untersucht. Dabei wurde die Transportaktivität von SubAB Mutante bzw. SubAB behandelten Zellen 2 h nach Inkubation bestimmt. Die erste Versuchsreihe umfasste dabei drei Substrate, welche (ausschließlich) durch die Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz prozessiert und charakterisiert wurden (s. Abb. IV-33).

Das Radiogramm der Abbildung IV-33A zeigt, dass die toxinabhängige Depletion von BiP den signalpeptidabhängigen Transport des Modellsubstrates Präprolaktin (ppl) in keiner Weise beeinträchtigt (vgl. auch Tab. IV-02). Im Vergleich zu Kontrollzellen (SubAB Mutante, 81 % Prozessierung) schien im langfristigen Mittel weder die Prozessierung noch die Sequestrierbarkeit des ppl in SubAB behandelten Zellen verändert (70 % Prozessierung).

Anders verhielt es sich bei der *in vitro* Synthese unter posttranslationalen Bedingungen mit dem heterologen Modellsubstrat PräprocecropinA (ppcecA) aus Insekten. Dieses schien in Abwesenheit von BiP deutlich ineffizienter (15 % Prozessierung) zu translozieren als in der Kontrollsituation nach zweistündiger Behandlung mit SubAB Mutante, welche mit 31 % Prozessierung eine doppelt so hohe Translokationseffizienz des ppcecA aufzeigte.

Ebenso wie ppcecA zeigte auch das dritte analysierte Vorläuferpolypeptid Präproinsulin eine um etwa 50 % reduzierte Signalsequenzabspaltung in Abwesenheit von BiP. Durch die Subtilasebehandlung sank die Prozessierungseffizienz des Präproinsulins von 88 % in Kontrollzellen auf nur noch 43 % nach BiP Spaltung durch die Subtilase.

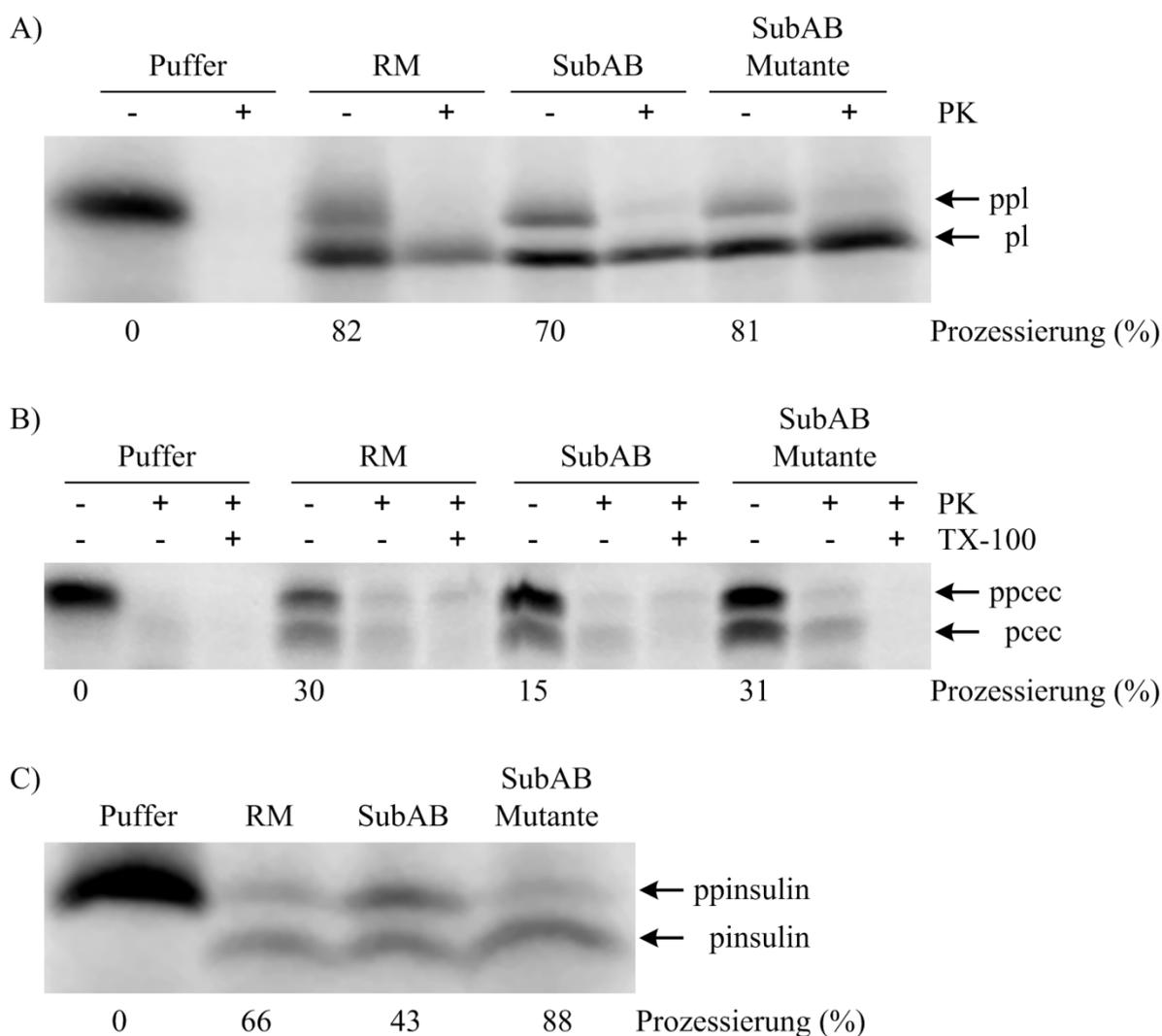


Abb. IV-33: Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER 2 h nach BiP Depletion (Teil 1)

2 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 1 µg/ml Subtilase (SubAB) oder der inaktiven Mutante (SubAB Mutante) wurden daraus semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter co- (A, C) oder posttranslationalen (B) Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. *In vitro* Synthesen ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) wurden ggf. einer Proteinase K (PK) Proteolyse (= Sequestrierung) unterzogen (A, B) und nach erfolgter SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie analysiert. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Präprolaktin (ppI), (B) mutiertes PräprocecropinA (ppcecA) und (C) Präproinsulin. Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (prozessierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form. RM = raue Mikrosomen; TX-100 = Triton X-100 (Detergenz)

Wie Abbildung IV-33 illustriert, war die Abspaltung der Signalsequenz einiger Substrate wie ppcecA oder Präproinsulin durch die BiP Depletion reduziert. Dies beruhte jedoch nicht, wie man aus der unveränderten Signalsequenzabspaltung anderer Substrate wie z.B. ppI erkennen konnte, auf dem direkten Einwirken der Subtilase auf die Signalsequenzprozessierung, sondern war das Resultat einer verringerten Transportrate in Abwesenheit von BiP.

Um dies zu bestätigen, umfasste das nächste Set an Experimenten Substrate welche als charakterisierende, posttranslationale Modifikation im Zuge ihres Transports glykosyliert werden (s. Abb. IV-34). Auch im Falle der glykosylierten Substrate, ergab sich eine substratspezifische Abhängigkeit der Proteintranslokation von BiP.

Die invariante Kette (ivc) wurde unabhängig von BiP gleichermaßen effizient in Anwesenheit der Kontrollzellen oder der durch die Subtilase an BiP depletierten Zellen zu ungefähr 60 % glykosyliert, d.h. transportiert (vgl. Abb. IV-34A).

Ebenso wie die ivc war auch das polytope Modellmembranprotein Aquaporin2 (AQP2) in Gegenwart der BiP depletierten, semi-permeabilisierten Zellen nicht in seiner Membraninsertion gehemmt. Dessen Transport, bzw. exakter formuliert, dessen Insertion erfolgte im abgebildeten Experiment (s. Abb. IV-34C) zu rund 30 % in die ER Membran SubAB oder SubAB Mutante behandelte Zellen.

Auch das bereits im Zuge der Komplementation mit *SEC61A-Y344H* auffallende Substrat ERj3, erwies sich nach Depletion von BiP in seiner Translokation drastisch gehemmt (s. Abb. IV-34B). Hier war der Effekt besonders ausgeprägt. SubAB Mutante behandelte Zellen translozierten ERj3 mit 93 % äußerst effizient, wohingegen der ERj3 Transport in Abwesenheit von BiP mit 1 % quasi auf den Hintergrundlevel (vgl. Puffer und SubAB Abb. IV-34B) abfiel.

Ein weiteres Substrat, welches im Zuge der Sec16 α Komplementationen noch nicht getestet wurde, rückte in den Fokus der BiP Depletionsstudien. Nach persönlicher Mitteilung von Johanna Dudek handelte es sich bei den beiden Prionproteinvarianten PrP Δ HD und PrP Δ GPI um Sec63-abhängige Modellproteine. Da Sec63 mit seiner ER luminalen J-Domäne eine mögliche BiP Interaktionsdomäne bildet, war es von Interesse, ob möglicherweise auch der Transport dieser Prionproteinderivate in Abhängigkeit von BiP erfolgt. Wie die Abbildungen IV-34D und E verdeutlichen, benötigten beide Varianten des Prionproteins die Unterstützung von BiP zur effizienten Translokation. Nach Spaltung von BiP (SubAB) sank die Translokation des PrP Δ HD gegenüber den Kontrollzellen (SubAB Mutante) von 30 % auf 14 % (s. Abb. IV-34D). Ähnliches galt für die Translokation des PrP Δ GPI, welche von 33 % (SubAB Mutante) auf 11 % (SubAB) absank (s. Abb. IV-34E). Für diese Substrate musste beachtet werden, dass sie in Abwesenheit von ER Membranfraktionen (s. Pufferspuren) auf Grund der Misslokalisierung deutlich durch die im Retikulozytenlysat enthaltenen Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems zur Degradation mono- und polyubiquitiniert wurden (markiert durch *).

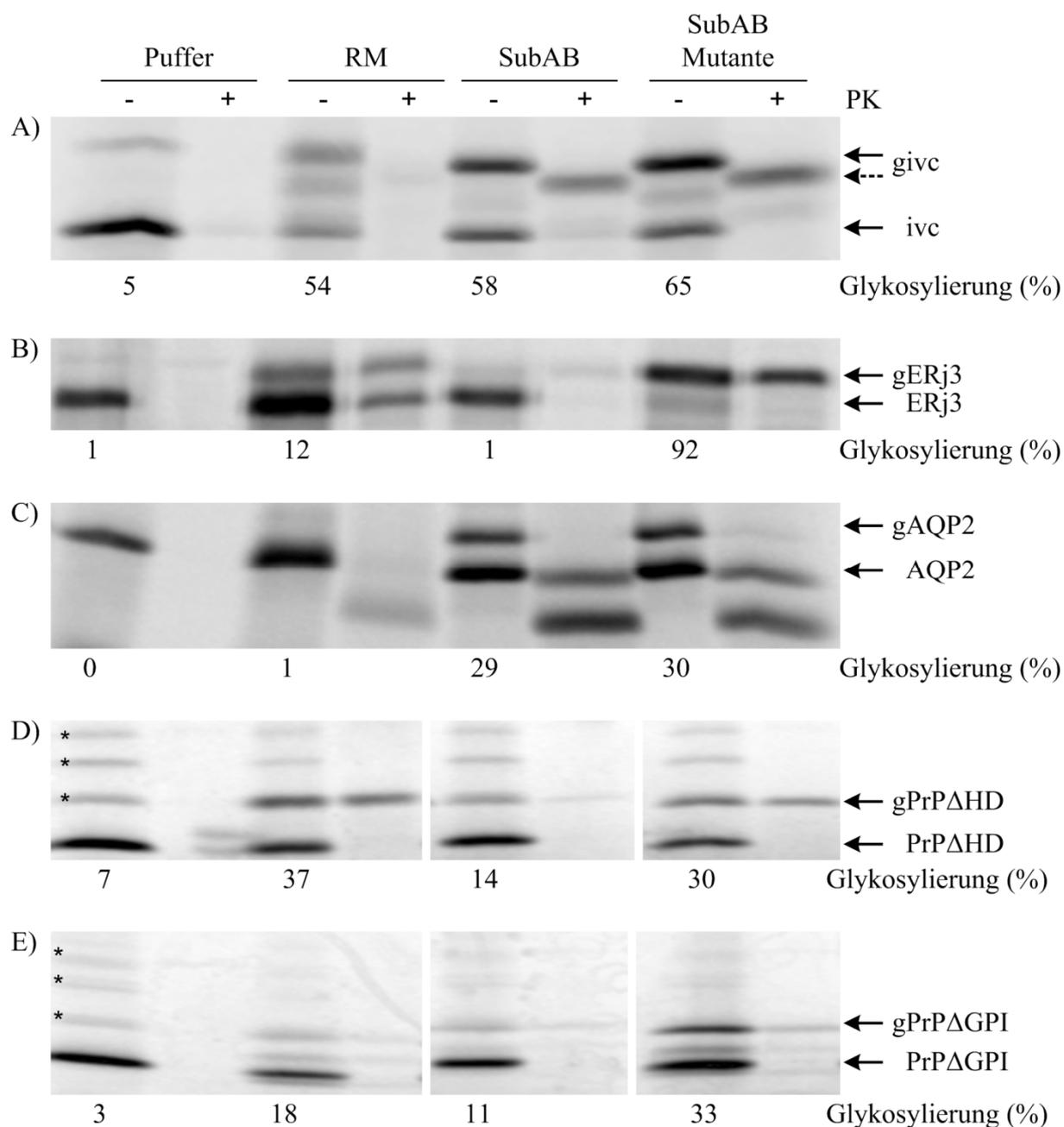


Abb. IV-34: Signalpeptidabhängiger Proteintransport ins ER 2 h nach BiP Depletion (Teil 2)
 2 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 1 µg/ml Subtilase (SubAB) oder der inaktiven Mutante (SubAB Mutante) wurden daraus semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter cotranslationalen Bedingungen in die angegebenen ER Fraktionen importiert. Nach der *in vitro* Synthese ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) erfolgte die SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie der Proben. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) prä-MHC Klasse II invariante Kette (ivc), (B) ERj3, (C) Aquaporin2 (AQP2), (D) Prionprotein ohne hydrophobe Domäne (PrPΔHD) und (E) Prionprotein ohne Glykosylphosphatidylinositolankerstelle (PrPΔGPI). Ermittelte Glykosylierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form. Beachte, Retikulozytenlysate enthält minimale Mengen an ER Membranen und ein intaktes Ubiquitin-Proteasom-System, welche auch in der Pufferkontrolle eine Glykosylierung bzw. Ubiquitinierung (*) der Vorläuferproteine katalysieren können. RM = raue Mikrosomen; TX-100 = Triton X-100 (Detergenz)

Auch die Untersuchung BiP depletierter Zellen wurde um die „tail-anchor“ Substrate ergänzt (s. Abb. IV-35). Trotzdem die Literaturdaten nicht für einen Einfluss luminaler Komponenten auf die Membraninsertion C-terminal verankerter Substrate sprechen, bestand die Möglichkeit eines stimulierenden Effekts von BiP. Sollte sich die Insertion dieser Substrate neben Sec61 α auch unabhängig von BiP erweisen, so diente deren Analyse wiederum als „Membranmen- genabgleich“ einzelner Präparationen semi-permeabilisierter Zellen (vgl. Kapitel IV.1.3.1).

Nach zweistündiger Spaltung von BiP durch die aktive Subtilase (SubAB) wurde 22 % der Menge an synthetisiertem cytb5 glykosyliert (s. Abb. IV-35A). Die gleiche Glykosylierungs- bzw. Transportrate des cytb5 zeigten auch die mit der inaktiven Subtilase behandelten Zellen. Syb2 wurde im gezeigten Fall zwar schwach, jedoch mit einer identischen Effizienz von 18 % glykosyliert. Dies galt für beide „Zelltypen“ (s. Abb. IV-35B).

Das besonders effizient inserierte C-terminal verankerte Substrat Sec61 β wurde zu 76 % (SubAB) bzw. 80 % (SubAB Mutante) glykosyliert (s. Abb. IV-35C).

Kurz gefasst, alle drei getesteten C-terminal verankerten Substrate Cytochrom b5 (cytb5), Synaptobrevin2 (Syb2) und Sec61 β zeigten keine Beeinflussung ihrer Membraninsertion in Abwesenheit von BiP (s. Abb. IV-35).

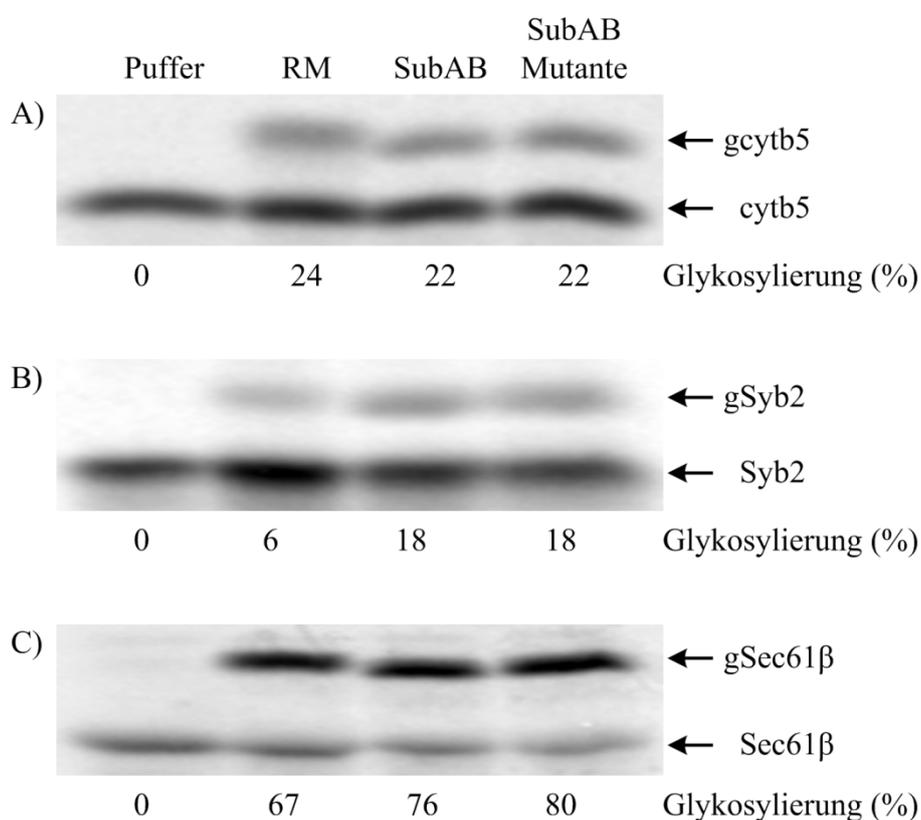


Abb. IV-35: Proteintransport C-terminal verankerter Substrate ins ER 2 h nach BiP Depletion
2 h nach Behandlung von HeLa-Zellen mit 1 μ g/ml Subtilase (SubAB) oder der inaktiven Mutante (SubAB Mutante) wurden daraus semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) präpariert und die rechts angezeigten Vorläuferpolypeptide unter posttranslationalen Bedingungen in

die angegebenen ER Fraktionen importiert. Nach 15 minütiger *in vitro* Synthese wurde selbige für 30 min ohne (Puffer) oder mit ER Vesikeln (RM, SPZ) inkubiert und anschließend einer SDS-PAGE, Autoradiographie und Densitometrie unterzogen. g zeigt ein glykosyliertes Polypeptid an. Lediglich Gelbereiche von Interesse sind gezeigt für (A) Cytochrom b5 (cytb5), (B) Synaptobrevin2 (Syb2) und (C) Sec61 β . Ermittelte Prozessierungseffizienzen gezeigter Gele beziffern den prozentualen Anteil des reifen Proteins (glykosylierte Form) an der Summe aus Vorläufer plus reifer Form.

Um für die gezeigten Einzelexperimente der Abbildungen IV-33 bis IV-35 eine statistisch relevante und signifikante Basis zu schaffen, wurden die zugehörigen Transportexperimente der Substrate mit den toxinbehandelten Zellen mehrfach wiederholt und tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. IV-02).

Die in der nachfolgenden Tabelle IV-02 aufgelisteten Vorläufersubstrate sind unter dem Aspekt ihres Transportmodus (co- oder posttranslational) gegliedert. Wie bereits für die Einzelexperimente der toxinvermittelten BiP Depletion (s. Abb. IV-33 bis IV-35) lieferte auch die mehrfache Reproduktion der Transportexperimente mit den verschiedenen Substraten eine übereinstimmende Tendenz. Da die Substrate im vorliegenden Fall der Experimente nur bezüglich eines einzelnen Parameters charakterisiert wurden, nämlich ihrer Abhängigkeit vom intakten luminalen Hsp70 Chaperon BiP, lassen sich die Substrate auch nur in zwei Klassen einteilen.

- (I) Diese Klasse beinhaltet das Set getesteter Vorläufersubstrate, welche in der Lage sind unabhängig von BiP transportiert zu werden. Die Prozessierungseffizienzen der Modellsubstrate ppl, ivc, AQP2, pp α F, α_1 -ACT, Immunglobulin leichte Kette κ (Ig κ) sowie der „tail-anchor“ Proteine cytb5, Syb2 und Sec61 β waren durch die subtilasevermittelte BiP Proteolyse nicht beeinflusst.
- (II) Die zweite Klasse beinhaltet die Modellsubstrate, welche zu ihrer Translokation mehr oder minder auf das volle Länge BiP angewiesen sind. Das sind die Substrate ERj3, ppinsulin, ppecA und beide Varianten des Prionproteins (PrP Δ H Δ D, PrP Δ GPI). Diese Substrate, v.a. ERj3, wurden durch die Spaltung von BiP (SubAB) im Vergleich zu den Kontrollzellen (SubAB Mutante) deutlich schlechter transportiert.
(Da die Transportexperimente der Prionproteinvarianten noch nicht ausreichend oft wiederholt wurden, ist der zu erkennende Translokationsdefekt beider Prionprotein-derivate noch ohne Signifikanz zu beurteilen. Auf Grund der geringen Stichprobengröße wurde vorerst auf die Berechnung der zugehörigen Signifikanzniveaus verzichtet.)

Tab. IV-02: Transporteffizienz semi-permeabilisierter Zellen 2 h nach *BIP* Reduktion durch Subtilase
 Die angegebenen absoluten Prozessierungseffizienzen (Signalsequenzabspaltung für ppl, ppinsulin, Immunglobulin leichte Kette κ (Ig κ), ppcecA und Glykosylierung für sonstige) bezeichnen den Mittelwert mit Standardfehler (n ist gegeben in Klammern). [€] = signifikanter Unterschied zwischen SubAB Mutante und SubAB; [n.s.] = nicht signifikant verschieden

= Membranprotein; ## = „tail-anchor“ Membranprotein; Abkürzungen siehe Text

Vorläufer -substrat		SubAB Mutante	SubAB
Cotranslationaler Transport			
ppl	[n.s.]	79 ± 4 (6)	77 ± 4 (5)
# <i>ivc</i>	[n.s.]	51 ± 5 (4)	54 ± 7 (4)
ERj3	[€]	64 ± 10 (6)	1 ± 0 (6)
#AQP2	[n.s.]	29 ± 2 (4)	31 ± 3 (4)
ppinsulin	[€]	71 ± 11 (4)	31 ± 6 (5)
pp α F	[n.s.]	44 ± 1 (3)	40 ± 1 (3)
α_1 -ACT	[n.s.]	37 ± 5 (2)	39 ± 1 (2)
Ig κ	[n.s.]	96 ± 3 (3)	96 ± 3 (3)
PrP Δ HD		47 ± 14 (2)	14 ± 3 (2)
PrP Δ GPI		31 ± 1 (2)	17 ± 3 (2)
Posttranslationaler Transport			
ppcecA	[€]	22 ± 3 (4)	11 ± 2 (4)
##cytb5	[n.s.]	30 ± 2 (7)	31 ± 2 (7)
##Syb2	[n.s.]	28 ± 2 (8)	28 ± 3 (7)
##Sec61 β	[n.s.]	77 ± 5 (5)	79 ± 4 (5)

V DISKUSSION

Um der primären biologischen Fragestellung der Arbeit nachzugehen, ob die Prozesse des Proteintransportes zum ER und der Kalziumefflux aus dem ER sich auf Ebene des Sec61 Komplexes zusammenführen lassen (vgl. Abb. II-06), musste eine geeignete Depletionsstrategie gefunden werden. Nach Etablieren der geeigneten Rahmenbedingungen zur siRNA vermittelten Genstilllegung von *SEC61A1*, das die Kernkomponente des Sec61 Komplexes kodiert, wurden durch weiterführende Komplementationsexperimente verschiedene Resultate verifiziert. Im Anschluss konnte dann die weiterführende Fragestellung der Regulation und Modulation des Sec61 Komplexes durch akzessorische Proteine oder auf pharmakologischer Basis analysiert werden.

V.1 Interpretationen der *SEC61A1* Expressionsmodulation

Für die Analyse phänotypischer Ausprägungen als Folge einer siRNA basierenden Sec61 α Depletion, wurde zunächst die Effizienz des „silencing“ auf mRNA- und Proteinebene ermittelt (s. Kapitel IV.1.1). Die anschließende phänotypische Zellcharakterisierung der *SEC61A1* Expressionsmodulation erfolgte hinsichtlich Morphologie (s. Kapitel IV.1.2), Proteintransport (s. Kapitel IV.1.3) und passivem Kalziumefflux (s. Kapitel IV.1.4).

V.1.1 Effiziente Reduktion des Sec61 α durch verschiedene siRNAs

Den Richtlinien zum Umgang mit RNA Interferenz folgend, wurde die Reduktion des Sec61 α mit verschiedenen siRNAs bei möglichst geringen Konzentrationen durchgeführt und auf Transkriptom- wie auch Proteomebene verifiziert. Zudem fanden alle Analysen im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen statt. Letzteres schließt weitestgehend auf der Zellmanipulation beruhende unspezifische Effekte aus (Martin & Caplen 2007).

Während die quantitative „real-time“ PCR (s. Abb. IV-01) bereits zum ersten Analysezeitpunkt nach 48 h die maximale Depletion der Sec61 α mRNA verdeutlicht, bedarf es auf Proteinebene weitere 48 h zur höchsten Sec61 α Reduktionsrate (s. Abb. IV-02). Die im Vergleich zur mRNA Reduktion später erfolgende maximale Proteindepletion steht dabei in Einklang mit dem Wirkprinzip der RNA Interferenz. Erst nach Verlust der mRNA und deren Translation erfolgt, in Abhängigkeit der Halbwertszeit des entsprechenden Proteins, auch dessen Reduktion. Somit könnten die kinetischen Analysen beider zuvor genannter

Abbildungen prinzipiell zur Bestimmung der Halbwertszeit des Sec61 α Proteins genutzt werden, aber es fehlt der Startwert der mRNA Depletion. Zur ersten Messung nach 48 h ist der Level an mRNA bereits maximal reduziert. Dennoch scheint sich der Proteingehalt des Sec61 α in etwa 24 h Intervallen von 0 - 72 h jeweils zu halbieren; bei einem permanent niedrigen Niveau der Sec61 α mRNA. Demnach wäre eine ungefähre Halbwertszeit von 24 h für Sec61 α in HeLa-Zellen ein vorläufiger Ansatzpunkt und liegt in der für Membranproteine zu erwartenden Größenordnung (Chu & Doyle 1985). Der leichte Anstieg des Sec61 α Proteingehaltes nach 96 h bei Behandlung mit *SEC61* oder *SEC61*-UTR siRNA verdeutlicht darüber hinaus die transiente Wirkung der eingebrachten kleinen RNA Moleküle und spricht für die prinzipielle Reversibilität des Mechanismus der RNA Interferenz.

V.1.2 *SEC61A1* kodiert ein essentielles Protein

Wie in Kapitel II.1 beschrieben, werden, abhängig von Zelltyp und Literaturangabe, etwa ein Drittel aller synthetisierten Vorstufenproteine am ER in den sekretorischen Weg eingeschleust (Brostrom & Brostrom 2003). Nahezu alle davon passieren den Sec61 Komplex mit seiner porenbildenden Untereinheit dem Sec61 α Protein. Auf Grund dieser zentralen Stellung beim Proteintransport ist es nachvollziehbar, dass die Untersuchungen bezüglich Zellproliferation und Zellviabilität Sec61 α als essentielles Membranprotein kategorisieren (vgl. Abb. IV-03). Während transfizierte Zellen bis zu 72 h ohne Einschränkung der Zellproliferation (s. Abb. IV-03A) überleben, sinkt ihre Zellzahl und die Zellviabilität (s. Abb. IV-03B) nach 96 h gegenüber Kontrollzellen schnell ab. Dahingegen scheinen Kontroll-siRNA transfizierte Zellen sich nach 96 h in beiden Belangen den unbehandelten Zellen anzugleichen. Somit kann man schlussfolgern, dass (a) die Transfektionsprozedur selbst die Parameter Proliferation und Viabilität, zumindest vorübergehend, negativ beeinflusst und (b) sich der Verlust des Sec61 α vor allem im Zeitfenster nach 96 h deutlich auf beide Faktoren auswirkt.

V.1.3 Unveränderte Zytoskelett- und ER Morphologie nach Sec61 α Depletion

Die zuvor diskutierten kinetischen Analysen der *SEC61A1* Expressionsminderung auf Ebene der mRNA und des Proteins, sowie die daraus resultierende Letalität, favorisieren zur Analyse weiterer phänotypischer Ausprägungen als Folge der Sec61 α Depletion den 96 h Zeitpunkt. Nach vier Tagen zeigen *SEC61A1* siRNA behandelte Zellen den geringsten Sec61 α Restproteingehalt und eine nur marginale Änderung bezüglich Viabilität und Proliferation.

Eine detailliertere fluoreszenzmikroskopische Analyse des Aktin-Zytoskellets und der ER Morphologie nach 96 h zeigt keinerlei Auffälligkeiten beim Vergleich der unterschiedlichen Sec61 α depletierten Zellen gegenüber Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (s. Abb. IV-06). Sowohl was Struktur, Verlauf als auch charakteristische Lokalisation des Aktin-Zytoskellets und der ER Membran betrifft (vgl. Kapitel IV.1.2.1 und IV.1.2.2), gab es keine erkennbare Veränderungen durch die Depletion der Translokonuntereinheit. Desweiteren lieferte die Fluoreszenzmikroskopie keinen Hinweis auf eine Änderung der (HeLa-typischen) Größenverhältnisse und damit des Zellwachstums. Die transfizierten HeLa-Zellen zeigen in Abb. IV-06B ein zu Literaturangaben übereinstimmendes Ausmaß von 15 - 50 μ M (Moran *et al.* 2010). Die gleichzeitige Färbung der Nuklei mittels DAPI belegt keine Änderungen in Größe, Form oder Anzahl der Zellkerne. Gleiches gilt auch für die ebenfalls erkennbaren Nukleolie innerhalb der Zellkerne (vgl. Abb. IV-06A). Die Gleichheit der Nuklei nach Sec61 α Reduktion ist ein indirekter Hinweis auf vergleichbare transkriptionelle Aktivität sowie Fehlen der apoptosebedingten Kondensation und Fragmentierung des Chromatins und des Nukleus (Gavrieli *et al.* 1992; Koopman *et al.* 1994).

V.1.4 Sec61 α repräsentiert einen Ribosomenrezeptor der ER Membran

Neben der (Immun-) Fluoreszenzanalyse stellt die verwendete Elektronenmikroskopie eine weitere Alternative zur Untersuchung morphologischer Änderungen Sec61 α depletierter Zellen bereit (s. Kapitel IV.1.2.3).

In Übereinstimmung zur Fluoreszenzmikroskopie zeigt auch diese Untersuchungsmethode eine rigide sowie intakte Plasma- und Kernmembran 96 h nach siRNA vermitteltem *SEC61A1* „silencing“, was die Viabilität bis zum Zeitpunkt des Einfrierens bestätigt (s. Abb. IV-07; obere Reihe). Aber bedingt durch die effiziente Reduktion des Sec61 α bzw. des Sec61 Komplexes nach 96 h (\approx 85 - 90 %; vgl. Abb. IV-04) nimmt der Gehalt an membran-gebundenen Ribosomen (oder Polysomenstrukturen) signifikant gegenüber Kontroll-siRNA transfizierten oder unbehandelten Zellen ab. Die zugehörige Quantifizierung der membranassoziierten Ribosomen (s. Abb. IV-08) ergibt eine Verminderung von 17 Ribosomen pro 1 μ m Membran (17 R/M) in den sich nicht signifikant unterscheidenden unbehandelten oder Kontroll-siRNA transfizierten Zellen auf etwa 7 R/M. Aktuelle Rekonstruktionen von Elektronentomogrammen in CHO-K1 Zellen zeigen 12,5 R/M. Dieser Wert kann durch eine Behandlung (2 h) mit dem Proteinsyntheseinhibitor Puromycin durch das Entlassen naszierender Ketten ebenfalls um fast 60 % auf 5,5 R/M gesenkt werden (Puhka

et al. 2007). D.h. sowohl die direkte Verringerung des Sec61 α Proteingehaltes, wie auch die pharmakologisch erzwungene Freisetzung translokonassoziierter Ribosomen resultieren in einer vergleichbaren Reduktion des Ribosomenbesatzes der ER Membran. Allerdings konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführte „2D“ Elektronenmikroskopie, welche keine 3D Rekonstruktion wie bei Tomographien ermöglicht, nicht die mit der Verringerung an membrangebundenen Ribosomen einhergehende Transition von „sheet“ zu Tubuli Strukturen der ER Membranen (vgl. Kapitel II.1) beobachtet werden. Die persönliche Kommunikation mit Eija Jokitalo (Universität Helsinki, Finnland) festigt dennoch das eigene Resultat von 17 R/M, da ihre Messungen in der Huh-7 Zelllinie zum gleichen Wert führen.

Wie aber erklärt sich die Diskrepanz zwischen der 60 %igen Abnahme membrangebundener Polysomen bei einer Sec61 α Depletion von (den zugehörigen Einzelexperimenten) über 90 %? Die naheliegendste Erklärung sind alternative Ribosomenrezeptoren der ER Membran, welche ebenfalls die Ribosomenbindung oder -rekrutierung gestatten (Borgese *et al.* 1974). Ein prominenter Kandidat wäre das ER Membranprotein p180. Als Bestandteil eines ternären Komplexes mit Translokon und Ribosom kann p180 letztere affin binden und nimmt *in vitro* Einfluss auf die Proteintranslokation in raue Mikrosomen und rekonstituierte Proteoliposomen (Savitz & Meyer 1990; 1993; Morrow & Brodsky 2001; Ueno *et al.* 2010; 2011). Weitere Kandidaten sind Proteine der RAMP („ribosome associated membrane protein“) Fraktion, welche nach der Solubilisierung rauer Mikrosomen durch Digitonin bei hohen Salzkonzentrationen während einer Dichtegradientenzentrifugation mit Ribosomen ko-migrieren (Görlich *et al.* 1992a; Görlich & Rapoport 1993). Zur RAMP-Fraktion zählen neben Sec61 α auch RAMP4, RibophorinI oder TRAP α (Wang & Dobberstein 1999). Weitere Ribosomenbindungspartner der ER Membran, welche sich durch eine hohe Affinität zu Ribosomen auszeichnen, sind Sec62 ($K_d \approx 100$ pM) und ERj1 ($K_d \approx 30$ pM). Zudem belegt ein quantitativer Antikörperzugänglichkeitstest in verschiedenen Zelllinien die Abschirmung bzw. Interaktion dieser beiden translokonassoziierter Untereinheiten mit intakten Ribosomen (Benedix *et al.* 2010; Müller *et al.* 2010). Die identische Analysemethode liefert auch für Sec61 α und Sec61 β die Bestätigung der Ribosomenokkupation in unterschiedlichen Zelllinien, unter anderem auch in HeLa-Zellen.

Weiterhin bestätigen Proteolyseexperimente rauer Mikrosomen mit verschiedenen Proteasen die cytosolische Schleife 8 und den C-Terminus des Sec61 α als Ribosombindungsstelle (Raden *et al.* 2000). Ergänzt wird dieser Befund durch Rekonstruktionen von Cryo-elektronentomographien, welche bei gegebener Auflösung deutlich die Interaktion zwischen positiv geladenen Argininresten der cytosolischen Schleifen 6 und 8 des Sec61 α mit der negativ geladenen rRNA des Ribosoms bestätigen (Ménétrete *et al.* 2008; Becker *et al.* 2009).

Interessanterweise ist die mittels Oberflächenresonanzspektroskopie gemessene Affinität des Sec61 Komplexes für das Ribosom mit etwa 10 nM mindestens eine Zehnerpotenz geringer als die von Sec62 und nicht in Kontakt mit BiP stehendem ERj1 (Prinz *et al.* 2000; Burgard 2009). Dabei stellt sich die Frage, ob diese drei Membranproteine der Translokase sukzessive, gleichzeitig, synergistisch oder hemmend zueinander agieren um Ribosom-naszierende Kette Komplexe zu manövrieren und kontrollieren.

Trotz des auf den ersten Blick eindeutigen Phänotyps der Sec61 α Depletion wird die Beantwortung der einfachen Frage nach dem Ribosomenrezeptor der ER Membran durch all diese Fakten diffizil. Schließlich kann durch die unterbundene Synthese des Sec61 α auch der Gehalt weiterer putativer Ribosomenrezeptoren oder die ribosomale Biogenese beeinflusst werden. Zwar belegen Western Blot Daten für Sec62 und die ribosomalen Proteine Rpl23a sowie Rps3 keine Änderung der Proteinlevel, doch reduziert sich zusammen mit Sec61 α auch der Gehalt des möglichen Ribosomenrezeptors ERj1 nach 96 h (vgl. Abb. IV-04). Sinnvoll wäre es die Analyse durch einen geeigneten p180 Antikörper zu erweitern, um dessen Synthesestatus nach Sec61 α Depletion zu ermitteln und als potentiellen Ribosomenrezeptor mit einzubeziehen. Um ERj1 als unabhängigen Ribosomenrezeptor zu falsifizieren, könnte man ebenfalls die Kombination aus siRNA vermittelter ERj1 Depletion und Elektronenmikroskopie nutzen.

Nichtsdestotrotz scheint Sec61 α – alleine oder im Verbund der Translokase – für die effiziente und ausreichende Rekrutierung von Ribosomen zur ER Membran notwendig.

V.1.5 Die *SEC61A1* Expressionsmodulation beeinflusst die Proteostase

Wie das vorangehende Beispiel des Ribosomenrezeptors verdeutlicht (s. Kapitel V.1.4), ist zur Interpretation der aus einer Sec61 α Depletion resultierenden Phänotypen die Kenntnis über Änderungen auf Proteomebene unabdingbar. Es gilt dabei zu bedenken, dass die Depletion eines Transporters stets direkte Auswirkungen auf die Funktionalität der Cargomoleküle hat und vermittelt über diese schließlich Einfluss auf sekundäre Moleküle und Prozesse. Bedenkt man das von Costanzo *et al.* (2010) ermittelte genetische Interaktom einer (Hefe-) Zelle, verdeutlicht dieses unüberschaubare Diagramm der Pleiotropie, die gemeinsame Verknüpfung vieler biologischer Prozesse. Vor allem die Gene des sekretorischen Weges zeigen dabei ein hohes Maß an Vernetzung zu weiteren relevanten Zellfunktionen. Übertragen auf die Proteinebene gilt es ebenso solche Netzwerke für Sec61 α zu bedenken und mögliche Änderungen der Proteostase, welche mit einer Sec61 α Depletion

einhergehen können, zu überprüfen. Der Begriff der Proteinhomöostase (kurz: Proteostase) beschreibt dabei die Summe der zellulären Prozesse oder Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Proteoms und der Viabilität. Die Proteostase beruht auf einem komplexen Netzwerk an Interaktionen (Balch *et al.* 2008; Powers *et al.* 2009; Calamini *et al.* 2012).

Mit Festlegung des passenden Analysezeitraums (96 h „silencing“; vgl. Kapitel V.1.3), wurde das System der RNA Interferenz zudem durch adäquate Kontroll- und Expressionsvektoren zu Komplementationszwecken erweitert. In der Summe ergeben sich durch die Manipulation mit verschiedenen siRNAs und Vektoren (ungeachtet der jeweiligen Kontrollzellen) sechs unterschiedliche HeLa-„Zelltypen“ (vgl. Abb. IV-04). Neben dem Zielprotein der Zellmanipulation (Sec61 α) ist indirekt die Synthese weiterer Proteine verschiedener Signalwege, Proteinkomplexe und makromolekularer Ensembles durch die *SEC61A1* Expressionsmodulation beeinflusst. Global betrachtet lassen sich die erwähnten sechs „Zelltypen“ oder Modulationsstrategien in zwei Gruppen einteilen. Die drei Behandlungen mit *SEC61A1* gerichteten siRNAs sowie die Kombination aus *SEC61*-UTR siRNA und Kontrollplasmid zeigen durchgehend die gleiche Beeinflussung der Proteostase. Davon verschieden, jedoch untereinander identisch, führen die beiden Komplementationen der *SEC61*-UTR siRNA Transfektion mit Wildtyp oder mutiertem Sec61 α (p*SEC61*-WT, p*SEC61*-Y344H) quasi zu umgekehrten Effekten bezüglich des Proteingehalts (s. Abb. IV-04).

Simultan zur effizienten Sec61 α Depletion ($\approx 85 - 90\%$) reduziert sich auch der Gehalt an den beiden assoziierten „tail-anchor“ Untereinheiten Sec61 β ($\approx 75\%$) und Sec61 γ ($\approx 85\%$). Allein durch „silencing“ der α -Untereinheit wird der heterotrimere Sec61 Komplex in seiner Gesamtheit reduziert. Die mit der Depletion der Kernkomponente einhergehende, umfassende Reduktion eines multimeren Komplexes ist in der Literatur häufiger beschrieben. So u.a. auch für das Bakterienortholog des Sec61 Komplex (s. Tab. II-01). In Abwesenheit von SecE (Sec61 γ) ist SecY (Sec61 α) instabil (Kihara *et al.* 1995). Gleiches gilt für das translokon-assoziierte SecDF, dessen Depletion *in vivo* den Gehalt an SecG (\approx Sec61 β ; aber keine strukturelle oder funktionelle Homologie (du Plessis *et al.* 2011)) halbiert (Kato *et al.* 2003).

Besonders letzterer Befund bietet eine attraktive Erklärung für die mit dem Verlust des Sec61 Komplexes einhergehende Reduktion des ERj1 Proteins um rund 60% (s. Abb. IV-04). ERj1 könnte durch die Assoziation mit dem Sec61 Komplex stabilisiert werden oder nur in dessen Gegenwart funktional und somit notwendig sein. Eine alternative Erklärung für den Verlust des Sec61 β , Sec61 γ und ERj1 könnte eine kurze Halbwertszeit dieser Proteine sein. Zugehörige siRNA basierende Reduktionsstrategien für Sec61 β (Julia Benedix, persönliche Mitteilung) und ERj1 (s. Abb. IV-16J) widerlegen jedoch die Annahme der kurzen Halbwertszeit. Vielmehr verstärkt sich der Eindruck, dass Sec61 β , Sec61 γ und ERj1 in

Abwesenheit von Sec61 α aktiv degradiert werden. Diese Schlussfolgerung begründet sich auf zweierlei Fakten. Erstens, die der Proteinsynthese vorgeschaltete Transkription des *SEC61B* und *ERJ1* Gens ist nicht durch das Sec61 α „silencing“ beeinflusst. Beide Gene werden nach 96 h unverändert exprimiert, was der durch die qRT-PCR gemessene, unveränderte Gehalt an Sec61 β und ERj1 mRNA anzeigt (s. Abb. IV-01). Dies schließt einen möglichen Regulationsschritt auf Ebene der Translation dieser mRNAs allerdings nicht aus. Zweitens, und das ist noch interessanter, handelt es sich bei Sec61 β und γ um „tail-anchor“ Membranproteine. Wie später diskutiert werden wird (s. Kapitel V.1.6.1), ist diese spezielle Proteinklasse in der Lage unabhängig des Sec61 Komplexes in die ER Membran zu inserieren (s. Abb. IV-09). Das bedeutet zumindest für Sec61 β , dass obwohl *SEC61B* trotz der Sec61 α Depletion weiterhin transkribiert wird und das synthetisierte Sec61 β problemlos in die ER Membran integrieren könnte, ist sein Proteinlevel bei der Western Blot Analyse drastisch gemindert. Ausgehend von dieser gemeinsamen Reduktion des rein hypothetischen, tetrameren Sec61 α - β - γ -ERj1 Komplexes auf eine mögliche Stöchiometrie der Untereinheiten zu schließen ist wahrscheinlich zu spekulativ. Begründet auf den 40 % ERj1 Restprotein bei einem Sec61 α Gehalt von nur 10 % ist entweder eine Teilmenge an ERj1 Proteinen auch abseits des Sec61 Komplexes stabil bzw. aktiv oder aber es interagieren doch mehrere (vier?) ERj1 Moleküle pro Sec61 Komplex.

Ein völlig anderes Bild hingegen zeigen die beiden Komplementationen mit dem Wildtyp oder der Sec61 α Mutante. Verglichen zu den Sec61 α „silencing“ Ansätzen kommt es durch die Plasmidexpression in beiden Fällen zu einer deutlichen Erhöhung des Proteingehaltes an Sec61 α von 10 % auf etwa 60 % (s. Abb. IV-04). Mit der Rettung des Sec61 α Proteins steigern sich, wie zu fordern wäre, auch die Proteingehalte an Sec61 β (73 %) und ERj1 (\approx 85 %). Die partielle Komplementationeffizienz des Sec61 α erklärt vermutlich die nur teilweise Wiederherstellung der Sec61 β und ERj1 Synthese. Die der Komplementation mit Sec61 α Wildtyp oder Mutante (Sec61 α -Y344H) folgende, einheitliche Wiederherstellung für Sec61 β und ERj1 ist ein erster, nicht zu vernachlässigender, Hinweis auf die weitgehende Funktionalität des Sec61 α -Y344H Proteins.

Weitere membranständige oder luminaire Komponenten der Translokase wie Sec62, Sec63 BiP und Grp170 sind bis zum Zeitpunkt von 96 h durch keine der *SEC61A1* Expressionsmodulationen bezüglich des detektierten Proteingehaltes stark verändert (s. Abb. IV-04). Erfasste Schwankungen liegen im Normbereich der Western Blot Methode.

Die alternative Zuordnung der auf Proteinebene unveränderten Moleküle BiP und Grp170 als regulierte Zielproteine der „unfolded protein response“ (UPR) schließt eine unmittelbare Aktivierung dieses Signalweges durch die gewählten *SEC61A1* Expressionsmanipulationen

aus (Ni & Lee 2007; Dudek *et al.* 2009; Andreasson *et al.* 2010). Durch den mit der Sec61 α Depletion einhergehende Reduktion des signalpeptidabhängigen Proteintransports (s. Kapitel V.1.6.2 und Abb. IV-11 bis IV-13) ist eine Anhäufung fehlgefalteter Intermediate im ER Lumen als Auslöser der UPR auch nicht zu erwarten. Dennoch bleibt zu bedenken, dass die mögliche Aktivierung der UPR es möglicherweise schlicht nicht bewerkstelligt sich auf Proteinebene zu manifestieren, da BiP und Grp170 selbst auf die Transportaktivität der Translokase angewiesen sind. Ein Blick auf die zugehörigen mRNA Quantifizierungen in Abb. IV-01 kann bezüglich BiP eine Aktivierung der UPR ausschließen; nicht aber für Grp170. Zur Lösung dieses Dilemmas wäre es künftig ratsam die Aktivierung der UPR Mediatoren XBP1 (Ire1 Zweig), ATF6 oder eIF2 α (PERK Zweig) direkt zu untersuchen. Ebenfalls durch die *SEC61A1* Expressionsmodulationen unbeeinflusst ist die Menge der Ca²⁺-ATPase SERCA (s. Abb. IV-04). Auch wenn eine gleichbleibende Proteinmenge noch kein Indiz für eine konstante Proteinaktivität ist, bildet sie dennoch die Basis für den Rückschluss, dass das für den Regelkreis des Kalziumeffluxes notwendige Zurückpumpen an aus dem ER passiv ausströmendem Kalzium weiterhin gewährleistet ist. Die zweite Komponente des Kalziumefflux-Regelkreises bildet der Kalziumleckstrom durch passive, kalziumpermeable „leak“ Kanäle, deren eindeutige molekulare Identität unbekannt ist. Diskutiert werden u.a. das Translokon wie auch Preseneline (s. Kapitel V.1.7 und V.1.7.1). Durch die Sec61 α Depletion ändert sich nicht der Gehalt der γ -Sekretase Untereinheit Presenelin1 (nicht getestet mit den kotransfizierten, komplementierten Zellen), so dass deren putative Rolle als „leak“ Kanal auch bei „silencing“ des Sec61 Komplexes weiterhin Bestand hätte (Tu *et al.* 2006). Die Klasse der ribosomalen Proteine, repräsentiert durch ein Protein der 60 S (Rpl23a) und der 40 S (Rps3) Untereinheit, scheint offenbar ebenfalls nicht durch die effiziente Sec61 α Reduktion beeinflusst zu sein. Die Analyse ribosomaler Proteine ist aus zwei Beweggründen wichtig. Einige Organismen, wie z.B. Hefen, zeigen als Reaktion auf einen verringerten Proteinfluss durch den sekretorischen Weg eine facettenreiche physiologische Antwort zur Aufrechterhaltung der Proteostase. Dazu zählt auch die Repression der ribosomalen Biogenese (Mizuta & Warner 1994; Mutka & Walter 2001). Ein reduzierter Gehalt an Ribosomen könnte weitreichende Einwirkung auf die Proteinsynthese und damit auf die Proteostase nehmen. Zwar verringert eine Minderung an Ribosomen vermutlich auch die Proteintransportrate, da aber „zellinterne“ Ribosomen im rekonstituierten Proteintransport-assay durch heterogene Ribosomen des Retikulozytenlysats ersetzt werden, ist dieser Umstand „*ex vivo*“ im experimentellen Aufbau zu vernachlässigen. Wie erste „pulse-chase“ Experimente andeuten, kann zudem der Aspekt einer veränderten, globalen Proteinsynthese durch die diversen *SEC61A1* Expressionsmodulationen verneint werden (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse des SRP abhängigen „targeting“ zur ER Membran (s. Kapitel II.2.1.1) zeigt einen möglichen kompensatorischen Mechanismus als Adaption auf die siRNA vermittelte Sec61 α Depletion (s. Abb. IV-04). Vor allem SR β zeigt sich in seiner Synthese deutlich gesteigert (durchschnittlich auf 290 %) nach Depletion des Sec61 α . Möglicherweise versucht die Zelle den durch das Sec61 α „silencing“ reduzierten Proteintransport mittels einer verbesserten Direktion der Ribosom-naszierenden Kette-Komplexe zur ER Membran zu kompensieren. Während sich der gesteigerte Proteinlevel an SR β bei beiden *SEC61A1* gerichteten siRNAs (*SEC61* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA) offenbart, handelt es sich bei der Erhöhung des zugehörigen SR α um einen siRNA unspezifischen Effekt, welcher nur bei Behandlungen in Zusammenhang mit der *SEC61*-UTR siRNA hervortritt. Diese Abstufung wird deutlich beim Vergleich der vier verschiedenen Sec61 α Depletionsstrategien. Das „silencing“ durch die *SEC61* siRNA lässt den Gehalt an SR α unverändert während aber die *SEC61*-UTR siRNA Applikation, egal ob mit oder ohne Kotransfektion des Kontrollplasmids, die Menge an SR α mehr als verdoppelt (\approx 220 %). Die Mischung beider *SEC61A1* gerichteter siRNAs (*SEC61* siRNAs) zeigt mit etwa 180 % einen intermediären Wert im Vergleich zu den Einzel-siRNA-Behandlungen. Auch im Falle der „targeting“ Komponenten SR α und SR β resultiert die partielle Komplementation mit wildtypischen oder mutiertem Sec61 α in einer Annäherung an die Referenzniveaus für beide Proteine. Um das Phänomen der „verbesserten Zielsteuerung nach Sec61 α Depletion“ detaillierter zu analysieren, könnte man die Expression des *SRB* und *SRA* Gens in Abhängigkeit der siRNA Behandlung auf mRNA Ebene untersuchen. Zudem wäre es aufschlussreich die Analyse sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene um weitere targeting Komponenten zu vervollständigen. Was passiert beispielsweise mit den Proteinkomponenten des Ribonukleoproteinkomplexes SRP oder dessen 7 SL RNA? Sind dessen Bestandteile ebenfalls erhöht?

Eine zugehörige kinetische Analyse der Proteomänderungen nach siRNA vermitteltem Sec61 α „silencing“ (s. Abb. IV-05) bekräftigt die vorherigen Aussagen dieses Kapitels. Die zeitliche Analyse von 48 - 96 h illustriert den synchron mit dem Sec61 α Gehalt sinkenden Proteinlevel für Sec61 β und ERj1 sowie den Anstieg an SR β . Dahingegen sind die Mengen an Sec62, Sec63, BiP oder auch Grp170 im betrachteten Zeitintervall von 48 - 96 h relativ konstant auf dem Niveau der Kontrollzellen.

V.1.6 Sec61 α gestattet signalsequenzspezifisch den Proteintransport ins ER

Zahlreiche Rekonstitutionsstudien basierend auf rauen Hundepankreas-mikrosomen sowie die Verwendung von diversen Translokationinhibitoren bestätigen *in vitro* die essentielle Funktion des Sec61 Komplexes des Säugers für den Proteintransport (Görlich & Rapoport 1993; Nilsson *et al.* 2001; Fons *et al.* 2003; Besemer *et al.* 2005; Garrison *et al.* 2005; Cross *et al.* 2009; Liu *et al.* 2009). Dennoch lassen diese eleganten Durchführungen entscheidende Details des humanen Sec61 Komplexes unbeantwortet. Ist der Sec61 Komplex bzw. die Translokase des Säugers ebenso wie die Orthologen in Hefen und Bakterien fähig Substrate posttranslational zu transportieren? Repräsentiert der Sec61 Komplex die universale Proteintranslokase des ER oder gibt es ein Pendant zu anderen Translokationsmöglichkeiten wie etwa das Tat-System oder YidC in *E. coli* (Robinson & Bolhuis 2001; 2004; Driessen & Nouwen 2008)? Wird der Sec61 Komplex durch akzessorische Proteine der Translokase in seiner Funktion moduliert?

V.1.6.1 Der Sec61 Komplex: entbehrlich für die Insertion der „tail-anchor“ Proteine

Eine in der Literatur seit längerem diskutierte Frage beschäftigt sich mit der Notwendigkeit der ER Translokase als mögliche Insertase für den unbekanntenen Integrationsmechanismus der „tail-anchor“ Membranproteine (TA-MP; vgl. Kapitel II.3.1). Wie die eigene Arbeit mit den drei verschiedenen TA-MP cytb5, Sec61 β und Syb2 demonstriert, sind die drei Substrate in der Lage unabhängig des Sec61 Komplexes und des ERj1 Proteins in die ER Membran zu integrieren (s. Abb. IV-09 und Tab. IV-01). Die Entscheidung für diese drei das Spektrum der „tail-anchor“ Hydrophobizitätsskala abdeckenden TA-MP ist begründet. Auf Grund der unterschiedlichen Hydrophobizität und Sequenz folgen sie unterschiedlichen „targeting“ Routen zum ER (s. Kapitel II.2.1.3). Und obwohl Syb2 als „tail-anchor“ Route das SRP in Verbund mit dem SRP Rezeptor nutzen kann und in Quervernetzungs-experimenten Addukte zu Sec61 α , Sec62 und Sec63 liefert (Abell *et al.* 2003; 2004), benötigt es zur Membranintegration ebenso wenig den Sec61 Komplex wie cytb5 oder Sec61 β . Um möglichst präzise zu bleiben, muss die Aussage relativiert werden. Da durch das siRNA basierende Sec61 α „silencing“ ein „Knockdown“ von etwa 90 % erreicht wird (vgl. Kapitel V.1.5), könnte die Restmenge an Sec61 α theoretisch genügen die im Zuge der *in vitro* Synthese produzierte Menge an Substrat zu integrieren. Allerdings führten Experimente mit geringeren und größeren Mengen an Substrat (Daten nicht gezeigt) zum vergleichbaren Resultat der Sec61 α unabhängigen Insertion der TA-MP. Dieses Resultat steht in Einklang zu vielen

Studien an Hefemutanten oder unterschiedlich rekonstituierten Proteoliposomen (Yabal *et al.* 2003; Brambillasca *et al.* 2006). Dementsprechend führt auch die Komplementation des Sec61 α depletierten zellulären Hintergrundes durch die plasmidgetriebene Expression von wildtypischem oder mutiertem *SEC61A1* zu keinerlei Einfluss auf die Insertion der drei getesteten TA-MP (s. Abb. IV-10 und Tab. IV-01).

Offenbar sind besonders TA-MP mit einer geringen Hydrophobizität wie cytb5 oder PTP1B in der Lage ohne Assistenz in die Membran zu inserieren (Brambillasca *et al.* 2005). Eine entscheidende Determinante scheint jedoch die in der Membran vorherrschende Cholesterinkonzentration zu sein. Höhere Cholesterinkonzentrationen als in der ER Membran wirken strikt restriktiv auf eine Insertion der TA-MP des sekretorischen Weges. Um also *in vivo* die Insertion der bereitwillig integrierenden TA-MP in der korrekten Zielmembran zu gewährleisten, muss deren „targeting“ sehr effizient gestaltet werden und die TA-MP unterschiedlicher Kompartimente müssen klar voneinander unterscheidbar sein.

Das *in vitro* rekonstruierte „targeting“ der TRC40 Route aus rekombinanten Komponenten zeigt die Notwendigkeit weiterer Zielsteuerungsalternativen für TA-MP (Favaloro *et al.* 2010). Die offene Frage bleibt, ob tatsächlich alle C-terminal verankerten Proteine (im Menschen putative 400) ohne Assistenz einer Insertase integrieren bzw. ob alle TA-MP des sekretorischen Weges unabhängig des Sec61 Komplexes integrieren (Kalbfleisch *et al.* 2007; Borgese & Righi 2010). Dieser Frage folgend, dokumentiert eine weitere Veröffentlichung, welche ebenfalls auf die Kombination aus RNA Interferenz und semi-permeabilisierten HeLa-Zellen zurückgreift, auch die TOM (Proteintranslokase der äußeren mitochondrialen Membran) unabhängige Insertion der mitochondrialen TA-MP Bak, Bcl-XL und Omp2 (Setoguchi *et al.* 2006). Zweifelsohne bleibt die Suche nach dem Integrationsmechanismus der TA-MP mit einer der spannendsten Fragen dieses Feldes.

Das nicht unerwartete Resultat der Sec61 Komplex unabhängigen Insertion der TA-MP ist im Umkehrschluss jedoch von ebenso großem Nutzen für die eigenen Analysen gewesen. Die „tail-anchor“ Membranproteine dienen fortan als ideale Referenzsubstrate zum Vergleich verschiedener Präparationen Digitonin-permeabilisierter Zellen und deren Fähigkeit zur Glykosylierung (vgl. Kapitel IV.1.3.1).

V.1.6.2 Der Sec61 Komplex: unentbehrlich für den Proteintransport sekretorischer Proteine mit N-terminaler Signalsequenz

Wie die Abbildungen IV-11 und IV-12 veranschaulichen, ist der Proteintransport nahezu aller getesteten Substrate mit N-terminalem Signalpeptid, egal ob abspaltbar oder in Form einer Transmembrandomäne, durch die Depletion an Sec61 α gehindert.

Dies gilt für Substrate des cotranslationalen und posttranslationalen Proteintransportmodus, egal ob humanen oder heterologen Ursprungs. Letzteres verdeutlicht die Universalität und evolutive Konservierung der (humanen) ER Translokase, welche auch sekretorische Proteine der Hefe (Präpro- α -Faktor, pp α F) oder der Motte (PräprocecropinA, ppcecA) zu translozieren vermag. Eine statistische Auswertung der ermittelten Transporteffizienzen ist in Tab. IV-01 festgehalten. Diese Statistik bekräftigt vor allem zwei Interpretationen. Einerseits resultieren die vergleichbaren Sec61 α Reduktionseffizienzen der drei *SEC61A1* siRNA Behandlungen von 85 - 90 % (s. Abb. IV-04) in komparablen Auswirkungen auf den Proteintransport für alle getesteten Substrate. Die Auswirkungen beziehen sich entweder auf eine signifikante Beschränkung des Proteintransportes (für ppl, ivc, ERj3, AQP2, ppinsulin, pp α F oder ppcecA) oder eine unveränderte Integration im Falle der „tail-anchor“ Substrate (cytb5, Syb2, Sec61 β) und der Translokation der Serpine (α_1 -ACT und α_1 -AT). Andererseits spricht die Gleichwertigkeit der Resultate der drei Sec61 α Depletionen untereinander bei verschiedenen Substraten für die Robustheit und Zuverlässigkeit des etablierten Systems.

Auffällig an den in Tabelle IV-01 aufgeführten Mittelwerten der absoluten Prozessierungseffizienzen der Substrate ist deren unterschiedliche Transportrate, sowohl bei Substraten mit N- oder C-terminaler Signalsequenz. Vergleicht man die Transportraten der Kontroll-siRNA behandelten Zellen für verschiedene Vorläuferproteine schwanken diese zwischen 12 % (ppcecA) und 69 % (ERj3), sofern man die TA-MP auf Grund ihrer Sec61 Komplex unabhängigen Insertion außer Acht lässt. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Eine Erklärung bietet die ungleiche Methioninverteilung. Bei Substraten mit abspaltbaren Signalsequenzen reduziert sich in der Regel der Methioningehalt bei Prozessierung der Vorläuferform und damit das messbare radioaktive Signal. Bei manchen Substraten wie der hier verwendeten ppcecA Form beispielsweise reduziert sich die Anzahl an Methioninen von vier auf zwei, wohingegen das Substrat ppl auch nach Abspaltung seiner Signalsequenz sieben von acht Methioninresten behält. Dieses Einbüßen an detektierbarem Signal wird bei der Berechnung der Prozessierungsrate (s. Abb. IV-09 bis IV-13) nicht berücksichtigt und wäre eine Erklärung für die unterschiedlichen Transporteffizienzen. Ein weiterer plausibler Grund wären unterschiedliche Syntheseraten der Substrate. Im fest vorgegebenen Zeitraum kann möglicherweise für bestimmte Vorläufer mehr Protein synthetisiert werden, als das System in

der Lage ist zu transportieren. Dieser Überschuss an Proteinsynthese würde sich negativ auf die Prozessierung auswirken. Daher sollten die Modellsubstrate zu Beginn in einer Titrationsreihe zur Bestimmung der optimalen Synthesemenge getestet werden. Eine biologische Varianz, welche den Proteintransport beeinflussen kann, ist die Transportgeschwindigkeit eines Proteins. Dieser Terminus umfasst dabei sowohl die Prozesse des möglicherweise unterschiedlich effizienten „targeting“ zur ER Membran, sowie die Membraninsertion einer Signalsequenz in das Translokon („gating“) und den anschließenden Prozess der Translokation bzw. Integration (Goder *et al.* 2000; Kim *et al.* 2002). Eine geringe Transportgeschwindigkeit erhöht die Menge an synthetisiertem Vorläufer, welcher im gegebenen Zeitraum nicht transportiert werden kann bzw. vollständig seine Transportkompetenz einbüßt. Das Resultat wäre eine niedrige Transporteffizienz.

Da die Transportexperimente mit verschiedenen Substraten direkt auf die Hauptfunktion des Sec61 Komplexes abzielen, stellen sie das ideale Werkzeug dar, um die bereits durch die Proteomanalyse vermutete Funktionalität der komplementierten Zellen zu verifizieren (s. Kapitel V.1.5). Des Weiteren gestattet die Analyse eines diversen Sets an Vorläuferproteinen die Komplementationen mit *SEC61A1* und der diabetesassoziierten Punktmutation *SEC61A1-Y344H* in Abhängigkeit der getesteten Substrate miteinander zu vergleichen. Wie die Proteomanalyse (s. Abb. IV-04) zu erkennen gibt, kommt es durch beide Komplementationen zur partiellen Wiederherstellung des Sec61 α Proteingehalts von 61 % (Sec61 α) und 55 % (Sec61 α -Y344H). Ebenso sind auch die relativen Proteingehalte der neun anderen im Western Blot getesteten Proteine für beide Komplementationen vergleichbar (vgl. Abb. IV-04). Ausgehend von diesem Aspekt sollten die gemittelten Prozessierungsraten einzelner Substrate direkt miteinander vergleichbar sein.

Die Bestimmung der Transporteffizienz der komplementierten Zellen (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-WT oder *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Y344H) bestätigt für die sechs getesteten Substrate mit N-terminaler Signalsequenz (ppl, ivc, ERj3, AQP2, ppinsulin und ppcecA) die Funktionalität der beiden Sec61 α Varianten (s. Tab. IV-01). Beide Sec61 α Varianten sind in der Lage sowohl lösliche Proteine in das ER Lumen zu translozieren (z.B. ppl) als auch Membranproteine in die ER Membran zu integrieren (z.B. AQP2). Auch wenn die Transportversuche in Zusammenhang mit den komplementierten Zellen noch nicht hinreichend oft wiederholt wurden um eine statistisch gesicherte Aussage zu treffen, deutet sich ein substratspezifischer Unterschied zwischen beiden Entitäten an (vgl. Tab. IV-01). Offensichtlich werden die Substrate ERj3 und ppcecA von der krankheitsassoziierten Sec61 α -Y344H Variante weniger effizient transloziert. Eine solche substratspezifische Einschränkung der Enzymfunktion gibt erste Hinweise auf eine mögliche Regulation und

Regulationsstelle des Sec61 α Proteins durch akzessorische Faktoren. Dieses Ergebnis der substratspezifischen Proteintransportverminderung liefert eine mögliche Basis für die beobachteten phänotypischen Ausprägungen der homozygoten Sec61 α ^{Y344H/Y344H} Maus (Lloyd *et al.* 2010). Die Punktmutation in der Minihelix des luminalen loop7 des Sec61 α (vgl. Abb. II-03) führt in homozygoten Mäusen zu Hepatosteatose und Diabetes mellitus. Letzteres ist bedingt durch einen ER stressinduzierten apoptotischen Verlust an insulinsezernierenden β -Zellen des Pankreas. Da in betroffenen Mäusen die Anzahl und Größe der insulin-speichernden sekretorischen Granula unverändert ist, und die intraperitoneale Applikation von Insulin eine normale Aktivität des Insulinrezeptors und Glukosetransporters vermuten lässt, beruht der Diabetes-Phänotyp wahrscheinlich nicht auf der gestörten Sekretion dieser drei Schlüsselkomponenten der Blutzuckerhomöostase. Zwar könnte die hier gefundene substratspezifische Beeinflussung des Proteintransports durch die *SEC61A1-Y344H* Mutante an der Entstehung des im Mausmodell beobachteten ER Stress (in-) direkt beteiligt sein, doch ob sie als Hauptauslöser des β -Zellverlustes angesehen werden kann, ist fraglich.

Mit welchen experimentellen Herangehensweisen könnte man künftig das Verständnis um den Sec61 α abhängigen Proteintransport sinnvoll erweitern? TRAP und TRAM, zwei akzessorische Proteine des Sec61 Komplexes (s. Kapitel II.3.3.1), verbessern abhängig von der Signalsequenz eines Vorläuferproteins dessen Proteintransport (Görlich & Rapoport 1993; Fons *et al.* 2003). Daher wäre es beispielweise von Interesse beide Proteine ebenfalls in die Proteostaseanalyse nach *SEC61A1* Modulation aufzunehmen. Deren unveränderter Proteinlevel würde die Gefahr der falsch-positiven Interpretationen eines substratspezifischen Transportdefektes weiter eingrenzen. Übrigens ist weder für ERj3 noch für ppecA eine TRAP- oder TRAM-Abhängigkeit des Proteintransportes in der Literatur beschrieben. Ein Umstand der die ERj3 und ppecA spezifische Transportreduktion durch die Sec61 α -Y344H Mutante bestärkt. Ebenfalls von Bedeutung ist eine genauere Charakterisierung der Interaktion zwischen Vorläufersubstrat und Translokase, vor allem mit dem Schwerpunkt auf ERj3 und Sec61 α -Y344H. Ändern sich in diesem Fall die klassischen Attribute der Substrat-Translokation Interaktion (Voigt *et al.* 1996)? Hierzu könnte man mittels ribosomal arretierten Transportintermediaten („stalled RNC“) die Quervernetzung sowie die salz- und protease-sensitive Bindung zwischen ERj3-Intermediaten und Sec61 α -Y344H analysieren. Eine weitere Frage ist, ob sich die durch die Sec61 α Mutante im Transport unbeeinflussten Proteine wie ppl oder AQP2 durch Austausch oder Anfügen der ERj3 Signalsequenz in ihrer Transporteffizienz behindern lassen („signal sequence swap“). Welche Auswirkung auf den Proteintransport hat der Austausch des Tyrosins 344 gegen eine von Histidin verschiedene Aminosäure? Mutationsscanninganalysen in Hefe zeigen bei der Punktmutation des

Tyrosins 344 zu Alanin keinen Transportdefekt für die Substrate CPY und DPAPB (Trueman *et al.* 2011). Hilfreich wäre ebenfalls die Erweiterung des Spektrums an Testsubstraten, um allgemeine Prinzipien und Zusammenhänge der betroffenen Substrate zu erkennen (vgl. Kapitel V.5.1). Mögliche Kandidaten wären Substrate wie Angiotensinogen, atriales natriuretisches Peptid oder Interferon- γ , welche im Gegensatz zu Präprolaktin einer weniger effizienten Signalsequenz zum Proteintransport bedürfen (Kim *et al.* 2002). Der Arbeit von Devaraneni *et al.* (2011) folgend, könnten auch Substrate mit einer Typ 2 Signalankersequenz (N-Terminus liegt cytosolisch und der C-Terminus luminal) ins Auge gefasst werden. Deren Signalanker erfordert auf Grund der dokumentierten Inversion nach seiner Insertion in den Sec61 Komplex eine hohe Flexibilität des proteinleitenden Kanals, welche z.B. in der Sec61 α -Y344H Mutante eingeschränkt sein könnte.

Obwohl noch ohne statistische Relevanz, scheinen beide getesteten Serpine α_1 -AT (Z*) und α_1 -ACT zur effizienten Passage der ER Membran kaum oder gar nicht auf den Sec61 Komplex angewiesen zu sein (vgl. Tab. IV-01). Dies könnte schlicht an dem zuvor erwähnten Problem einer geringen Synthesemenge der Serpine liegen, so dass selbst der minimale Proteingehalt nach Sec61 α Depletion zum effizienten Proteintransport genügt. Andererseits könnte es aber auch bedeuten, dass beide Substrate einen alternativen Mechanismus der Membranpassage nutzen. Beispielsweise durch eine bisher unbekannte Proteintranslokase der ER Membran oder das paraloge *SEC61A2*, dessen ubiquitäre Expression und Funktionalität allerdings nicht bestätigt sind (Lloyd *et al.* 2010). So kennt man auch in der Hefe den dem Sec61p Komplex paralogen Ssh1p Komplex (s. Tab. II-01), welcher substratspezifisch den Transport unter anderem von Sec71p ermöglicht (Spiller & Stirling 2011).

Studien an *Drosophila melanogaster* Embryonen zeigen *in vivo* die Notwendigkeit des Sec61 α . Durch den gestörten Decapentaplegic (Dpp) Signalweg bei Einführen einer „nonsense“ Mutation in Sec61 α kommt es nicht zum notwendigen dorsalen Verschluss des Fliegenembryos (Wang & Ward 2010). Während dieses Beispiel höchstwahrscheinlich direkt auf die gestörte, Sec61 α -abhängige Sekretion des Dpp oder seines zugehörigen dimeren Rezeptors aus „thickvein“ und „punt“ zurückzuführen ist, führt die ektopische Expression von Sec61 α in *Drosophila*-Photorezeptorzellen zur Zytotoxizität und damit zum Zelltod (Kanuka *et al.* 2005). Genau wie beim β -Zellverlust im Sec61 α ^{Y344H/Y344H} Mausmodell ist auch der direkte Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und der Proteintransportfunktion des Sec61 α in den Photorezeptorzellen nicht klar nachvollziehbar. Eine sich aufdrängende Schlussfolgerung wäre ein weiterer durch Sec61 α beeinflusster Prozess, wie die Beeinflussung der Kalziumhomöostase. Dieses Thema wird im nächsten Kapitel diskutiert.

V.1.7 Der Sec61 Komplex repräsentiert einen ubiquitären Ca^{2+} „leak“ Kanal

Wie bereits in Kapitel IV.1.4 aufgeführt, gibt es bereits mehrere Hinweise und indirekte Evidenzen, dass der Sec61 Komplex an der Regulation der zellulären Kalziumhomöostase beteiligt sein könnte. Die stichhaltigsten davon sind die diversen Arbeiten mit verschiedenen Proteinsyntheseinhibitoren. Diese nehmen durch ihre Wirkung auf die über den Sec61 Komplex an die Membran gebundenen Ribosomen (s. Kapitel V.1.4) indirekten Einfluss auf die Permeabilität der ER Translokase (Heritage & Wonderlin 2001; Lomax *et al.* 2002; Roy & Wonderlin 2003; Van Coppenolle *et al.* 2004; Flourakis *et al.* 2006; Giunti *et al.* 2007; Ong *et al.* 2007; Amer *et al.* 2009). Zudem zeigen Zhang *et al.* (2006) mit ihrer genomweiten RNAi basierenden Klassifizierung in *Drosophila* S2-Zellen das orthologe Sec61 α als putative Einflussgröße des kapazitiven Kalziumeinstroms oder „store-operated calcium entry“ (s. auch Kapitel II.5.5.2). Die, bedingt durch diese Veröffentlichungen, aufkommende Hypothese des kalziumpermeablen Translokons und dessen Beitrag zum Kalziumleckstrom über die ER Membran wird durch diese Arbeit nicht bloß gefestigt, sondern auch auf molekularer Ebene direkt dem Sec61 α Protein zugeschrieben. Da der passive Kalziumefflux in verschiedenen Zelltypen mit Flussraten von 10 - 200 $\mu\text{M}/\text{min}$ gemessen wurde (Barrero *et al.* 1997; Camello *et al.* 2002), kann der Sec61 Komplex nicht bloß als essentielle Komponente des Kalziumleckstroms aus dem ER betrachtet werden, sondern gilt nun auch als wichtiger Bestandteil der zellulären Kalziumhomöostase. Was genau erlaubt den Rückschluss des kalziumpermeablen Sec61 Komplexes und was gilt es in Zukunft zu bedenken?

Wie man aus Abbildung IV-14 schlussfolgern kann, nehmen die unterschiedlichen Zellmanipulationen zur *SEC61A1* Expressionsmodulation keinen großen Einfluss auf den zellulären Gesamtgehalt an durch Ionomycin mobilisierbarem, freiem Kalzium. Lediglich die Behandlung mit *SEC61* siRNA zeigt nach 96 h eine Reduktion des freien Kalziumgehaltes um 20 - 25 %. Auf Grund des Überschusses der Kalziumkonzentration des ER verglichen mit dem Cytosol ist der passive Kalziumausstrom entlang des Gradienten jedoch in gewissem Maße insensitiv gegenüber einer Änderung der ER luminalen Kalziumkonzentration (Ashby & Tepikin 2001). Das heißt der verringerte Kalziumgehalt der *SEC61* siRNA transfizierten Zellen ist zunächst zu vernachlässigen, zumal beim Vergleich der Antwort auf Thapsigargin der demaskierte Kalziumefflux der *SEC61* oder *SEC61*-UTR siRNA behandelten Zellen nahezu einheitlich ist (vgl. Abb. IV-16 C und D; Abb. IV-17). Dennoch wäre es in vielerlei Hinsicht deutlich von Vorteil neben der Bestimmung des Gesamtkalziumgehaltes auch die genaue Kalziumkonzentration und -fluktuation des ER Lumens zu charakterisieren. Durch die verschiedenen zellulären Kalziumspeicherorganellen könnte es sein, dass es bei Betrachtung des Gesamtkalziumgehaltes durch Ionomycin zuvor unbemerkt zu einer Umverteilung des

Kalziums vom ER in andere Kalziumspeicher wie Mitochondrien, Golgi oder Lysosomen kam. Somit wäre eine Absenkung des luminalen Kalziumgehaltes ohne Einfluss auf den Gesamtkalziumgehalt und bliebe dem Experimentator verborgen. Zur direkten Messung und Bestimmung der ER luminalen Kalziumkonzentration bieten sich momentan besonders zwei Strategien an. Neben der auf dem synthetischen Kalziumindikator Fluo-5N basierenden TED-Methode („targeted esterase induced dye loading“) bietet sich auch das in Roger Tsien's Labor entwickelte DIER Chamäleon an, um luminale Kalziumströme zu messen (Palmer & Tsien 2006; Jaepel & Blum 2011). Solche Messmethoden würden das eigene Repertoire sinnvoll erweitern, da gerade in Zusammenhang mit vermeintlichen „leak“ Kanälen eine Änderung der ER luminalen Kalziumkonzentration beschrieben wird. Die Depletion des Presenelin1 („Knockout“) oder Pannexin1 („Knockdown“) beispielsweise führen zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels im ER (Tu *et al.* 2006; Vanden Abeele *et al.* 2006). Wiederum andere Publikationen in Zusammenhang mit Presenelin1 verneinen dessen direkten Einfluss auf eine Änderung des Kalziumgehaltes (Cheung *et al.* 2008). Abseits der Auswirkungen von Presenelin1 und Pannexin1 wäre es auch im Hinblick auf die Proteintransportfunktion des Sec61 Komplexes wichtig die konstante luminale ER Kalziumkonzentration nach der Sec61 α Depletion bestätigt zu haben. Schließlich könnte auch die luminale Kalziumkonzentration vermittelt über kalziumbindende Proteine Einfluss auf die Aktivität der Translokase und den Proteintransport nehmen.

Um wie in dieser Arbeit kontrollierten Einfluss auf die Kalziumhomöostase zu nehmen, dienen drei verschiedene Xenobiotika: Puromycin (Puro), Dithiothreitol (DTT) und Tunicamycin (Tun). Wie man aus den Abbildungen IV-14 und IV-15 schlussfolgern kann, führt keines der getesteten Agenzien zu einer direkten Änderung des durch Ionomycin messbaren, freien Kalziums. Dennoch, und das zeigen z.B. die Kontroll-siRNA behandelten Zellen, beeinflussen alle drei Substanzen den durch Thapsigargin (TG) visualisierten Kalziumleckstrom (s. Abb. IV-16B/17/19).

Puromycin vermittelt bereits nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten nicht nur eine deutliche Hemmung der Proteinsynthese um über 95 % (s. Abb. III-05), sondern reduziert in den nicht Sec61 α depletierten Zelltypen (unbehandelt, Kontroll-siRNA, *ERJ1* siRNA, *SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp) auch signifikant den durch TG provozierten passiven Kalziumleckstrom (s. Abb. IV-16A, B, G, H und Abb. IV-17). So wie in dieser Arbeit für HeLa-Zellen zeigt sich auch in LNCaP-Zellen eine Beeinflussung der Kalziumhomöostase durch Puromycin erst durch die anschließende TG-Applikation (Van Coppenolle *et al.* 2004). Erst die direkte Messung der Abnahme der luminalen Kalziumkonzentration nach der Gabe von Puromycin in permeabilisierten Zellen ergänzt sinnvoll das Verständnis der

Puromycinwirkung (Lomax *et al.* 2002; Van Coppenolle *et al.* 2004). Die Interpretation ist wie folgt. Puromycin entlässt naszierende Polypeptide der synthetisierenden Ribosomen. Im Falle eines über den Sec61 Komplex an der ER Membran befindlichen, synthetisierenden Ribosoms (vgl. Kapitel V.1.4; Abb. IV-07), führt dies zu einem kurzzeitigen offenen, permeablen Translokon, wodurch sich der luminale Kalziumgehalt verringert, jedoch ohne messbare Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration (Fura-2 Beladung). Der damit verringerte Kalziumgradient zwischen ER Lumen und Cytosol äußert sich nachfolgend in einem reduzierten Kalziumleckstrom bei Applikation von TG. Die aber noch offenstehende Frage ist, wohin wird Kalzium aus dem ER entlassen, ohne eine messbare Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration zu bewirken? Einerseits bestünde die Möglichkeit der schnellen Kalziumelimination über ATPasen (PMCA) und Kalziumaustauscher (NCX, NCKX) der Plasmamembran, die Pufferung durch cytosolische, kalziumpuffernde Proteine oder aber den direkten Einstrom in einen weiteren Kalziumzwischenpeicher, wie die mit dem ER in Kontakt stehenden Mitochondrien (vgl. Abb. II-05). Bedenkt man nun ferner die oben beschriebene Gleichheit der Ionomycinantwort mit und ohne Puromycinvorbehandlung (s. Abb. IV-14), entfällt die Idee der vollständigen Kalziumelimination durch Plasmamembranproteine. Eine Kalziumelimination würde im hier verwendeten Versuchsaufbau durch die extrazelluläre, kalziumfreie EGTA-Lösung zu einer Senkung der Ionomycinantwort führen. Die Option der cytosolischen Kalziumpufferung ist ebenfalls unwahrscheinlich. Das zur Kalziumdetektion verwendete Fura-2 hat mit einer K_d von 220 nM (in Gegenwart von 1 mM Magnesium) eine vielfach höhere Affinität als die in der Regel unspezifisch kalziumbindenden Pufferproteine, so dass cytosolische Änderungen der Kalziumkonzentration definitiv erfasst werden sollten. Somit bleibt als überzeugendste Alternative die Umlagerung von Kalzium in andere Zwischenpeicher. Da (menschliche) Mitochondrien eine große Speicherkapazität für Kalziumionen besitzen, einen Kalziumuniporter (Baughman *et al.* 2011) und über MAM in direktem, engem Kontakt mit dem ER stehen (s. Kapitel II.5.5.1), eignen sie sich als ideales Reservoir der durch Puromycin freigesetzten Kalziumionen. Durch die geringe Auflösung des hier verwendeten „imaging“ Systems bleibt womöglich eine solche transiente, cytosolische Kalziumerhöhung („Ca²⁺ burst“) an einer ER-Mitochondrium Kontaktstelle unentdeckt. Bestätigung finden diese Interpretationsweisen durch Messungen cytosolischer Kalziumströme in Gegenwart der Substanz Ru360, einem Antagonisten des mitochondrialen Kalziumuniporters. In Kombination mit Ru360 zeigt sich als direkte Antwort auf die Puromycinapplikation eine Steigerung im cytosolischen Kalziumgehalt (Igor Gamayun, persönliche Mitteilung). Durch die Kombination aus cytosolischem, luminalen und

mitochondrialem Ca^{2+} -„imaging“ durch entsprechende Indikatormoleküle, oder mögliche Permutationen dieser, bleibt es spannend den Flux an Kalziumionen weiter zu eruieren.

Der hauptsächliche Beitrag dieser Arbeit zum Phänomen des passiven Kalziumausstroms liegt in der zusätzlichen Möglichkeit zur Analyse *Sec61 α* depletierter Zellen. Die Bestimmung der cytosolischen Kalziumströme in Abwesenheit des *Sec61* Komplexes bestätigt wie erhofft die drastisch verminderte Sensitivität gegenüber TG und Puromycin (s. Abb. IV-16C-F und Abb. IV-17). Durch die effiziente Reduktion der *SEC61A1* Expression (s. Abb. IV-16J), verringert sich die Anzahl der kalziumpermeablen Poren und damit die Antwort auf TG. Als weitere Bestätigung des kalziumpermeablen *Sec61* Komplexes kann auch der Verlust der Puromycinsensitivität angesehen werden. Durch die verringerte Anzahl an *Sec61* Komplexen entlässt Puromycin zwar weiterhin in Synthese befindliche Polypeptide vom Ribosom, doch befinden sich keine Ribosomen mehr am *Sec61* Komplex. Somit entfällt der durch Puromycin bewirkte Kalziumtransfer über das offene Translokon und resultiert nicht in einer Verringerung der luminalen Kalziumkonzentration sowie des TG demaskierten Kalziumleckstroms. Weitere Bestätigung erhält diese Interpretation durch die mit dem sinkenden *Sec61 α* Proteingehalt einhergehende sich verringere Sensitivität gegenüber TG und Puromycin (s. Abb. IV-18). In Abhängigkeit vom regressiven *Sec61 α* Proteingehalt reduzieren sich die TG-Antwort (Kalziumleckstrom) und die Puromycinsensitivität (Kalziumumlagerung).

In Übereinstimmung zu den Transportstudien führt die partielle Wiederherstellung der *SEC61A1* Expression durch die Komplementation (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp) zu einer teilweisen Rettung der Sensitivität gegenüber TG und Puromycin. Der Phänotyp des reduzierten Kalziumleckstroms in *Sec61 α* depletierten Zellen normalisiert sich durch die Komplementation (s. Abb. IV-17).

Wie die Analyse der Proteostase zeigt (s. Abb. IV-04), geht mit dem Verlust des *Sec61* Komplexes nach 96 h auch eine deutliche Reduktion des ERj1 Proteins ($\approx 60\%$) einher. Da *ERJ1* ein Membranprotein kodiert (s. Kapitel II.3.2.2), könnte es selbst als passiver Kalziumkanal fungieren oder aber in regulatorischer Art und Weise Einfluss auf den passiven Kalziumefflux aus dem ER nehmen. Beide Möglichkeiten werden aber durch die Messergebnisse falsifiziert. Die mittels siRNA Behandlung erreichte ERj1 Depletion ($> 85\%$) führt nach 96 h zu keiner Beeinträchtigung des passiven Kalziumleckstroms (s. Abb. IV-16H und J). Zudem schließt diese Kontrolle aus, dass die Depletion eines jeden membranständigen Proteins des ER oder der Translokase zu einer Änderung des Kalziumefflux führt.

Ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Messungen und Interpretationen der Kalziumhomöostase ist die durch keine der durchgeführten *SEC61A1* Zellmanipulationen veränderte Expression der ubiquitären *SERCA2* Variante (s. Abb. IV-04). Während also der

passiv agierende Kalziueffluxkanal reduziert wird durch die Sec61 α Depletion, bleibt die zweite, aktiv agierende Komponente des Kalziumleckstroms (SERCA2) in ihrem Proteingehalt unverändert.

Besonders hervorzuheben ist noch ein weiterer Aspekt. Der pharmakologische Effekt des Puromycins ist auch von physiologischer Relevanz! Das durch Puromycin erzwungene, gleichzeitige Freisetzen vieler naszierender Ketten imitiert den biologischen Vorgang der in der Zelle permanent erfolgenden Termination der Proteintranslokation.

V.1.7.1 Die Relevanz weiterer putativer Ca²⁺ „leak“ Kanäle

Auch wenn die Daten deutlich für den essentiellen Sec61 Komplex als ubiquitären Kalziueffluxkanal sprechen, gilt es festzuhalten, dass trotz seiner Depletion ($\geq 85\%$) der Kalziumleckstrom nur um etwa 60 % reduziert wird (vgl. Abb. IV-17). Auch hier kann man wieder über die Problematik der unvollständigen Depletion argumentieren. Andererseits finden sich in der Literatur mittlerweile viele Beispiele weiterer möglicher Ca²⁺ „leak“ Kanäle, welche den verbleibenden Kalziumleckstrom nach Reduktion des Sec61 Komplexes erklären könnten. Wie ist deren Relevanz zu bewerten?

Die Idee der zunächst als potentielle „leak“ Kanäle gehandelten Preseneline, welche unabhängig ihrer katalytischen γ -Sekretase Funktion für 80 % des passiven Kalziuefflux aus dem ER verantwortlich sein sollen (Tu *et al.* 2006), ist durch deren stimulierende Einwirkung auf IP₃-Rezeptoren mittlerweile verworfen (Cheung *et al.* 2008; Cheung *et al.* 2010). Zudem erfolgt die katalytische Funktion, die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins, der hauptsächlich nur neuronal gebildeten Preseneline an ihrem Zielort der Plasmamembran (Berridge 2002). Die Aspekte der hauptsächlich neuronalen Abundanz und die vorrangige Lokalisation an der Plasmamembran schließen Preseneline als ubiquitäre Kalziueffluxkanäle aus. Wie die eigenen Western Blot Daten zudem belegen, ist durch die Depletion des Sec61 α die Menge des Presenelin1 nach 96 h nicht verändert (s. Abb. IV-04).

Das nur bei Alzheimer durch bestimmte Presenelinmutationen vermehrt gebildete A β ₄₂ Peptid besitzt ebenfalls die Möglichkeit durch seine Einlagerungen in verschiedene Membranen als Kationenkanal zu fungieren (Arispe *et al.* 1993; Demuro *et al.* 2005; Sammels *et al.* 2010). Die Einschränkungen (Alzheimerassoziation; unspezifische Einlagerung) schließen das A β ₄₂ Peptid ebenfalls als ubiquitären Ca²⁺ „leak“ Kanal der ER Membran aus.

Drei weitere Kandidaten das anti-apoptotische Bcl-2 (Coultas & Strasser 2003; Chami *et al.* 2004), der hemi-Kanal Pannexin1 (Vanden Abeele *et al.* 2006) und der unspezifische Kationenkanal TRPC1 (Berbey *et al.* 2009) zeigen ihre vermeintliche Funktion als passiven Kalziumeffluxkanal des ER nur bei den in den Veröffentlichungen gewählten Strategien der Überexpression. Die Überexpression der Kandidatengene und die normalerweise nicht dominante Lokalisation der drei kodierten Proteine am ER minimieren auch in diesen Fällen die Wahrscheinlichkeit als ubiquitäre Ca^{2+} „leak“ Kanäle zu operieren.

Der von Gallego-Sandín *et al.* (2011) publizierte „ Ca^{2+} homeostasis regulator“ (CALHM1) erhöht den Kalziumausstrom und reduziert gleichzeitig die SERCA Kapazität und Affinität für Kalzium. Die allerdings neuronal begrenzte Expression des Gens schließt das CALHM1 als universellen „leak“ Kanal ebenfalls aus.

Die in den Hepatozyten der Leber aus Cholesterin gebildeten Gallensäuren können als natürliche Kalziumionophore wirken (Combettes *et al.* 1988; Zimniak *et al.* 1991). Ihre systemische Begrenzung und Auswirkung auf die Kalziumströme sind vernachlässigbar.

Eine nicht auszuschließende Größe ist der reverse Kalziumflux durch SERCA Pumpen (Shannon *et al.* 2000; Toyoshima & Nomura 2002). Die zudem in verschiedenen humanen Geweben gebildete, trunkierte Splicevariante der SERCA1 (S1T) kann den Kalziumefflux erhöhen und die Aktivität der SERCA1 und 2 Isoformen reduzieren. Bei Aktivierung der UPR führt die vermehrte S1T Synthese zu einem erhöhten Kalziumtransfer vom ER zu Mitochondrien (Chami *et al.* 2001; 2008).

V.1.8 Resümee der verifizierten Funktionen des humanen Sec61 Komplexes

In der Summe lässt die in dieser Arbeit gewählte Strategie der *SEC61A1* Expressionsmodulation auf zellulärer Ebene drei miteinander verwobene Funktionen des Sec61 Komplexes erkennen (s. Abb. V-01). Dazu zählen die Ribosomenbindung (s. Kapitel V.1.4), der Proteintransport (s. Kapitel V.1.6) und die Aktivität als passiver Ca^{2+} „leak“ Kanal (s. Kapitel V.1.7).

Eine in der Literatur zwiespältig diskutierte, vierte Funktion des Sec61 Komplexes ist seine Fähigkeit als Proteindislokase für den retrotragen Export terminal fehlgefalteter Proteine zu fungieren (Plempner *et al.* 1997; Schäfer & Wolf 2009; Carvalho *et al.* 2010). Die hier etablierte Sec61 α Depletionsstrategie würde sich ebenfalls anbieten – nach Aufbau eines geeigneten Assay (z.B. in Kombination mit einem bekannten „Exportsubstrat“) – auch diese Fragestellung künftig anzugehen.

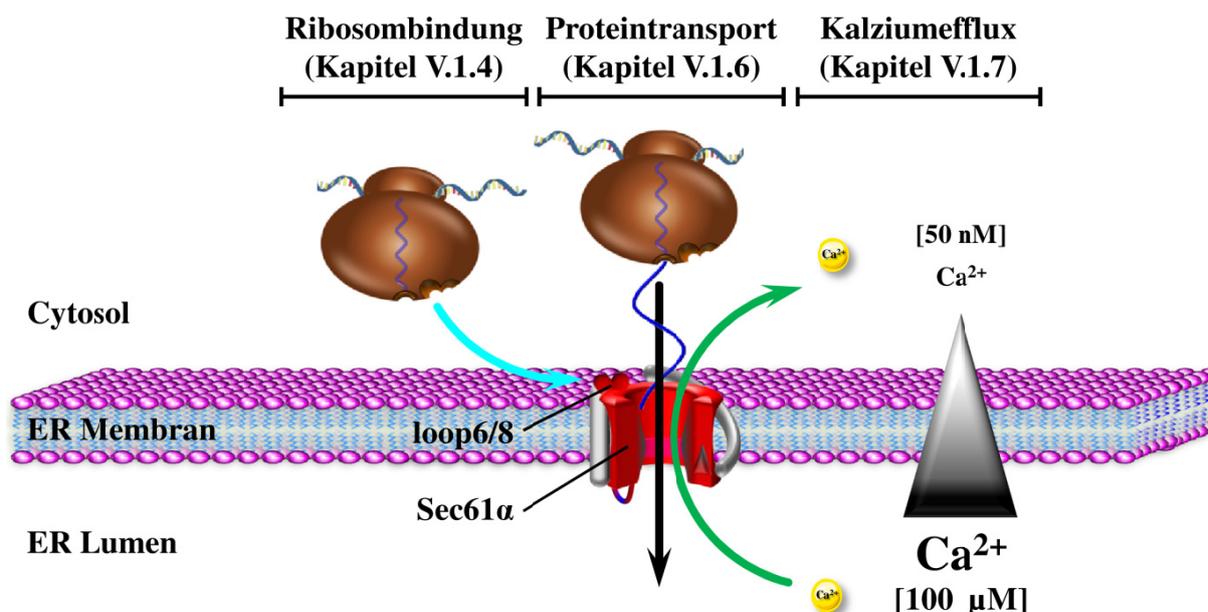


Abb. V-01: Gefundene und auf zellulärer Ebene verifizierte Funktionen des humanen Sec61 Komplexes. Die bestätigten Funktionen des Sec61 Komplexes mit seiner zentralen Untereinheit Sec61 α sind die Ribosombindung über loop6/8 (türkiser Pfeiler), der Proteintransport (schwarzer Pfeil) und das Agieren als passiver Kalziumeffluxkanal des ER (grüner Pfeil). Einhergehend mit diesen Aufgaben erklärt sich die essentielle Funktion des Sec61 Komplexes für die Zellviabilität (s. Kapitel V.1.2). Ca²⁺ = Kalziumion

Diese diversen Funktionen des Sec61 Komplexes werfen wichtige Fragen auf. Welchen Regulationen und Beschränkungen unterliegt der Sec61 Komplex zur Erfüllung seiner diversen Aufgaben? Und welche zellulären Umstände modulieren die Funktion des Translokons?

Mit dem Wissen, dass ungefähr 95 % der ins ER gelangenden, naszierender Ketten korrekt falten oder gefaltet werden (Hammond & Helenius 1995; Otero *et al.* 2010), schien die leicht zu beeinflussende Proteinfaltung ein geeigneter Ansatzpunkt um mit den Funktionen oder der Modulation des Sec61 Komplexes zu interferieren. Beide in die intakte Zelle gelangenden Substanzen DTT und Tunicamycin (Bassik & Kampmann 2011; Reiling *et al.* 2011) nehmen auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die Proteinfaltung. Das reduzierende Agens DTT stört hauptsächlich im oxidierenden Milieu des ER die Bildung und Aufrechterhaltung von Disulfidbrücken. Tunicamycin (Tun) inhibiert den ersten Schritt der Bildung von Oligosacchariden am Membrancarrier Dolichol, wodurch es die N-Glykosylierung im ER inhibiert (Heifetz 1979; Nilsson *et al.* 2003; Kelleher & Gilmore 2006). Wie sich zeigt, nehmen beide niedermolekularen Substanzen Einfluss auf den Kalziumefflux aus dem ER und somit auf die zelluläre Kalziumhomöostase (s. Kapitel V.1.9).

V.1.9 Proteinfehlfaltung erhöht den Kalziumefflux durch Sec61 α , nicht aber durch die Mutante Sec61 α -Y344H

Durch DTT und Tun wurde auf eine zweite Weise kontrolliert Einfluss auf die Kalziumhomöostase genommen. Beide Agenzien führen in verschiedenen Typen von Kontrollzellen ohne Beeinflussung des Gesamtkalziumgehaltes (s. Abb. IV-15) zu einer Erhöhung des durch TG demaskierten Kalziumeffluxes (s. Abb. III-09 und Abb. IV-19/20). In Analogie zu den Messungen mit Puromycin wird auch die Sensitivität gegenüber DTT und Tun durch die Sec61 α Depletion aufgehoben (s. Abb. IV-19/20/21). Das bedeutet, dass der durch die Xenobiotika (DTT, Tun) intensivierte Kalziumefflux aus dem ER ebenfalls auf Ebene des Sec61 Komplexes erfolgt und durch dessen Depletion reduziert wird.

Infolgedessen ist es, wie experimentell gezeigt (s. Abb. IV-20), auch zu erwarten, dass die partielle Rettung des Sec61 Komplexes durch die Komplementation Sec61 α depletierter Zellen mit dem wildtypischen Sec61 α (*SEC61*-UTR siRNA + p*SEC61*-Wildtyp) neben der teilweisen Wiederherstellung des passiven Kalziumausstroms auch die Sensitivität gegenüber DTT und Tun wieder ermöglicht.

Im Gegensatz dazu führt die nahezu gleichermaßen effiziente Komplementation mit dem *SEC61A1*-Y344H Allel (s. Abb. IV-04) unter den identischen Versuchsbedingungen zu einem völlig anderen Resultat. Obwohl die Synthese des Sec61 α -Y344H mit 55 % leicht unter der des Wildtyps Sec61 α (61 %) liegt, ergibt deren Vergleich der quantifizierten Kalziumfreisetzungen nach TG-Applikation eine signifikante Erhöhung des Kalziumausstroms in den Sec61 α -Y344H komplementierten Zellen (s. Abb. IV-21). Desweiteren, und das ist ebenso interessant, resultiert weder die Behandlung mit DTT noch die mit Tunicamycin in einem forcierten Kalziumefflux aus dem ER nach Inhibition der SERCA-Aktivität durch Thapsigargin.

Sowohl die durch DTT und Tun gesteigerte Kalziumfreisetzung aus dem ER der Kontrollzellen als auch der *per se* erhöhte Kalziumefflux inklusive der Insensitivität gegenüber DTT und Tun der Sec61 α -Y344H komplementierten Zellen lässt sich durch ein Zweikomponentenmodell erklären. Die Aktivität des Sec61 Komplexes muss in diesem Szenario an das ER luminaire Hsp70 Chaperone BiP gekoppelt sein, welches das Translokon luminalerseits blockiert (Hamman *et al.* 1998; Johnson 2003; Alder *et al.* 2005).

Die durch DTT und Tun induzierte Proteinfehlfaltung im oxidierenden Milieu des ER bedingt die Rekrutierung des in diesem Kompartiment einzigen Hsp70 Faltungshelfers, BiP (Karlin & Brocchieri 1998). Dabei werden vermutlich auch BiP Moleküle, welche im Zuge des Hsp70 Zyklus über eine J-Domäne in der Nähe des Sec61 Komplexes verweilen (vgl. Abb. II-04), zur Aggregationsprävention der vermehrt fehlgefalteten Proteine von dort abgezogen. Somit

bewirken DTT und Tun einen vor, während und nach der Translokation weniger verschlossenen oder regulierten Sec61 Komplex auf Grund der Abwesenheit von BiP. Dies manifestiert sich bei den cytosolischen Messungen der Kalziumströme als vermehrter, passiver Kalziumefflux nach Blockade der SERCA-Aktivität durch TG. Das gegenüber dem Wildtyp veränderte Verhalten der Tyrosinmutante des Sec61 α ließe sich folgendermaßen mit dem Modell in Einklang bringen. Durch die Mutation im luminalen loop7 des Sec61 α (Sec61 α -Y344H; vgl. Abb. II-03) könnte die bisher nur spekulierte, direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen BiP und Sec61 α gestört sein. Dadurch wäre die Regulation und Permeabilität des „Sec61-Y344H Komplexes“ permanent gestört und würde, wie in Abb. IV-21 experimentell belegt, zu einem erhöhten passiven Kalziumefflux nach TG-Gabe führen. Durch die fehlende oder gestörte Interaktion zwischen BiP und Sec61 α -Y344H ist die durch die Agenzien induzierte Proteinfehlfaltung ohne Auswirkung auf den Kalziumausstrom (vgl. Abb. IV-20/21). BiP wird zwar weiterhin zu den fehlgefalteten Proteinen rekrutiert, doch keines dieser BiP Moleküle entstammt dem (nicht mehr vorhandenen) „translokonassoziierten BiP Pool“. Gleichzeitig schließt das Resultat der Sec61 α -Y344H Mutante einen unspezifischen, kalziumunabhängigen Effekt der Kombination aus TG und einem der beiden Faltungsinhibitoren (DTT oder Tunicamycin) durch eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Fura-2 aus.

Neben den potentiell veränderten Proteintransporteigenschaften des *SEC61A1-Y344H* Allels gegenüber dem Wildtyp (s. Kapitel V.1.6.2) zeigt sich nun also auch auf Ebene des passiven Kalziumeffluxes eine phänotypische Varianz beider Proteinvarianten (s. Abb. IV-20). Um die Theorie der Interaktion zwischen Sec61 α und BiP weiter zu untermauern, dienen die nachfolgend beschriebenen Schlussfolgerungen der BiP Depletionsstudien.

V.2 Interpretationen der *BIP* Expressionsminderungen

Wie die Daten zur Expressionsminderung von *BIP* belegen, ist es gelungen den zellulären Gehalt an BiP auf zwei unterschiedlichen Wegen zu reduzieren. Neben der RNAi vermittelten Depletionsweise durch zwei verschiedene siRNAs (s. Kapitel V.2.1) kann der BiP Gehalt ebenso durch die Toxinbehandlung mit Subtilase verringert werden (s. Kapitel V.2.2). Zudem gestattet die durch die Faltungsantagonisten DTT und Tunicamycin induzierte Proteinfehlfaltung die BiP Verfügbarkeit im ER Lumen auf eine pharmakologische Weise zu reduzieren. Dies ist es eine dritte Alternative die BiP Abundanz zu manipulieren.

V.2.1 ***BIP*: kein einfaches Ziel der RNA Interferenz**

Wie die Abb. IV-23A belegt, ist es prinzipiell möglich die *BIP* Expression auf dem Wege der RNA Interferenz binnen 48 h um etwa 80 % zu reduzieren. Diese Vorgehensweise ist aber für das gegebene Zeitfenster von variabler Effizienz und häufig mit Auswirkungen auf die Proteostase (Expression verschiedener UPR Zielgene) und Kalziumhomöostase verbunden (Nico Schäuble, persönliche Mitteilung). Letzteres deutet sich auch im gezeigten Experiment bei Messung des Kalziumgehaltes durch Ionomycin an (s. Abb. IV-23B). Diese Problematik ist die Ursache für das Etablieren der alternativen BiP Depletion durch die Subtilase.

V.2.1.1 **BiP, ein fehlfaltungssensitiver Schließmechanismus des Sec61 Komplexes**

Bereits die 80 %ige Reduktion an BiP genügt um eine deutliche Steigerung des durch TG demaskierten, passiven Kalziumleckstroms zu bewirken (s. Abb. IV-23D und E). Während die zugehörigen Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wie gewohnt mit einer signifikanten Intensivierung des Kalziumleckstroms durch die DTT oder Tun Vorbehandlung reagieren, ist nach der BiP Depletion keines der beiden Agenzien in der Lage den bereits *per se* forcierten Kalziumleckstrom weiter zu steigern (s. Abb. IV-23C-E und Abb. IV-24). Warum sich in Zusammenhang der *BIP* siRNA mit DTT quasi ein „adverse drug effect“ zeigt, und im gezeigten Experiment zu einer Erniedrigung des Kalziumausstroms im Vergleich zur Pufferapplikation vor TG-Gabe führt, ist nicht nachvollziehbar. Hierfür bedürfte es einer mehrfachen Wiederholung.

Eine zu bedenkende Problematik besteht in der unbekanntenen Quantität des maximalen Kalziumausstroms. Das heißt, welches Ausmaß oder welche Amplitude kann der passive Kalziumefflux durch die „leak“ Kanäle bei den Messungen erreichen? Eventuell ist die durch die BiP Depletion induzierte Erhöhung des Kalziumeffluxes bereits in der Sättigung. Somit könnten die Faltungsantagonisten DTT und Tun auf Grund der konstanten Anzahl an nicht mehr durch BiP regulierten Sec61 Komplexen deren Effluxkapazität nicht weiter steigern und es ergäbe sich die Gefahr der Fehlinterpretation. Ein plausibles Experiment zur Bestimmung der Sättigung der Effluxkapazität besteht in der Kombination eines Faltungsantagonisten mit einem weiteren, die Kalziumleckage fördernden Calmodulinantagonisten wie Ophiobolin A, Berbamin oder Trifluoperazin (Erdmann *et al.* 2011; Shao & Hegde 2011b).

Dennoch ähneln die Ergebnisse der beiden gegen *BIP* gerichteten siRNAs, der erhöhte und nicht weiter durch DTT oder Tun forcierbare Kalziumefflux, dem Resultat in Anwesenheit der Sec61 α -Y344H Mutante (vgl. Abb. IV-23D/E und IV-20D) und liefern auf Grund einer

ähnlichen phänotypischen Auswirkung einen ersten Hinweis auf die später ausführlicher postulierte Sec61 α -BiP Interaktion im Bereich der Tyrosinmutation des Sec61 α -Y344H (s. Kapitel V.4.1).

V.2.2 Effiziente BiP Spaltung durch das Zytotoxin Subtilase (SubAB)

Die Analyse der Subtilasewirkung demonstriert die vollständige Spaltung des intakten BiP Proteins in HeLa-Zellen innerhalb von nur zwei Stunden. Die durch die Serinprotease vermittelte Spaltung in der hydrophoben „linker“ Region (vgl. Kapitel II.3.3.3) erlaubt die Detektion eines N- und C-terminalen Fragmentes deren Einzelmassen in der Summe dem intakten BiP gleichkommen (s. Abb. IV-25). Der große Vorteil dieser Methode ist neben ihrer Effizienz auch die rapide BiP Depletion. Trotz der Elimination des intakten BiP um über 95 % manifestiert sich die durch die BiP Spaltung aktivierte UPR (qRT-PCR Analyse; Daten nicht gezeigt) noch nicht auf Proteinebene. Zwei Zielgene der UPR (*GRP170* und *GRP94*) sind 2 h nach der BiP Elimination auf Proteinebene noch nicht verändert (s. Abb. IV-26).

V.2.2.1 BiP ist nicht nur für HeLa-Zellen essentiell

Die Analyse des Zellindex (s. Kapitel III.6.7), also die Messung der Zellkonfluenz, durch das xCELLigence Gerät demonstriert die hohe Toxizität der SubAB für die drei Zelllinien HeLa, PC3 und HEK-293 (s. Abb. IV-28). Da BiP das einzige bekannte Zielprotein der SubAB ist (Paton *et al.* 2006), spricht die Echtzeit-Zellanalyse gleichzeitig auch für die essentielle Funktion von BiP. Die gewählten Konzentrationen des aktiven Toxins von 100 und 1000 ng/ml sind für die 10.000 ausgesäten Zellen binnen ein bis drei Tagen absolut letal. Die gleiche Letalität zeigt sich auch in Mäusen bei intraperitonealer Injektion des Toxins binnen weniger Tage (Wang *et al.* 2007). Mit Ausnahme der HeLa-Zellen, ist die geringe Toxinkonzentration von 10 ng/ml ebenfalls tödlich. Auch Lass *et al.* (2008) berichten in Zusammenhang mit HeLa-Zellen von einer sich nach der Toxinbehandlung bildenden Subpopulation, welche in der Lage ist die BiP Synthese über das Niveau der toxinvermittelten Degradation zu steigern und so die UPR zu bewältigen bevor es zur Apoptose kommt. Die Gründe hierfür können vielfältig sein (kürzere Halbwertszeit des Toxins; geringere Toxininternalisation durch eine verringerte Rezeptorzahl; Modifikation der SubAB in HeLa), wurden aber nicht weiter untersucht oder bewertet. Trotz der rapiden BiP Depletion kommt es nach Zugabe des Toxins nicht unmittelbar zu einem Wachstumsarrest und zum Absterben der

Zellen, sondern es zeigt sich ein Delay der Auswirkung des Toxins auf den Zellindex von etwa 8 - 12 h. Das gleiche Resultat der Verzögerung nach BiP Spaltung bis zum Einsetzen der Letalität zeigt die morphologische Analyse mittels Auflichtmikroskopie (vgl. Abb. III-03 und Abb. IV-28). Nach Zugabe von Subtilase dauert es ungefähr fünf Minuten bis das Toxin internalisiert wird, retrograd bis ins ER Lumen wandert und dort via Immunfluoreszenz nachweisbar ist (Chong *et al.* 2008).

V.2.2.2 Die zweistündige BiP Fragmentierung ist ohne Auswirkung auf den passiven Kalziumausstrom oder das „store-operated calcium entry“ (SOCE)

Wider erwarten führte die effiziente BiP Depletion durch die Subtilase zu keiner Änderung des passiven Kalziumausstroms aus dem ER (s. Abb. IV-29), dessen Beeinflussung durch die Faltungsantagonisten (s. Abb. IV-29) oder aber bezüglich des SOCE (s. Abb. IV-30). Um die bestehenden Literaturdaten, welche BiP durch Fluoreszenzquenchinganalysen *in vitro* als luminalen Verschluss des kalziumpermeablen Sec61 Komplexes diskutieren (Haigh & Johnson 2002; Alder *et al.* 2005) jedoch nicht zu falsifizieren, muss man sich die Wirkungsweise der Subtilase vor Augen halten. Diese spaltet BiP in der Verbindungsdomäne („linker“) in eine nach 2 h noch persistierende N- und C-terminale Domäne (vgl. Abb. IV-25/26). Durch die Fragmentierung verliert BiP *in vivo* seine Funktionalität des Hsp70 Zyklus (s. Kapitel II.3.3.3), jedoch behalten beide Domänen ihre intrinsische Eigenschaft der Nukleotidbindung (N-Terminus) oder der Peptidbindung (C-Terminus) bei (Kumar *et al.* 2011; Marcinowski *et al.* 2011). Demnach wäre die durch die vorliegende Arbeit postulierte und in Kapitel V.4.1 ausführlicher diskutierte Hypothese der BiP-Sec61 Komplex Interaktion über den luminalen loop7 des Sec61 α durch die Peptid-Bindedomäne (PBD) des BiP noch gewährleistet. Vermutlich verbleibt die durch die Proteolyse erzeugte PBD am Sec61 Komplex und hält diesen vergleichbar zum kompletten BiP „verschlossen“. Erst der durch die Xenobiotika DTT und Tun erzeugte, massive Überschuss fehlgefalteter Proteine konkurriert mit Sec61 α um die PBD (allerdings ohne Durchlaufen eines Hsp70 Zyklus) und erhöht dann ebenfalls den Kalziumausstrom auf Ebene des Sec61 Komplexes. In identischer Weise lässt sich diese Argumentation auch auf den fehlenden Unterschied zwischen der aktiven und mutierten Subtilase bei Betrachtung des SOCE anwenden (vgl. Abb. IV-30).

Gestützt wird diese Interpretationsweise durch drei Fakten. Erstens, der durch die Subtilase gespaltene „linker“ des BiP Moleküls ist vor allem in der BiP-ADP Form (hohe Substrat-affinität) exponiert und damit für die Spaltung zugänglich (Smock *et al.* 2010; Kumar *et al.*

2011). Demnach würde BiP während seiner Interaktion mit loop7 des Sec61 α gespalten und die PBD verbliebe arretiert. Zweitens, die Affinität der Hsp70 Chaperone für ADP ist sechsmal höher als für ATP, was eine unkatalysierte Transition aus der ADP- in die „offene“ ATP-Konformation mit geringer Substrataffinität unterbindet (Schröder & Kaufman 2005). Drittens, SubAB spaltet hauptsächlich neu-synthetisiertes BiP (Hu *et al.* 2009), was ermöglichen könnte, dass eine Restmenge an BiP zumindest eine gewisse Dauer den Sec61 Komplex reguliert. Letzteres ist jedoch auf Grund der Effizienz der BiP Spaltung durch die hohe Konzentration an Subtilase zu vernachlässigen (vgl. Abb. III-04). Durch die Fragmentierung entsteht also hauptsächlich die PBD in der „ADP-Konformation“ mit hoher Substrataffinität. Ob die PBD allerdings in selbiger Konformation verharrt ist unklar.

V.2.2.3 Die längerfristige BiP Fragmentierung reduziert den Kalziumgehalt

Eine erste Auswirkung der toxinvermittelten BiP Fragmentierung auf die Kalziumhomöostase folgt aus der Bestimmung des durch Ionomycin detektierbaren, freien Kalziumgehaltes. Während die zweistündige Behandlung mit Subtilase nicht in einer Änderung des Kalziumgehaltes resultiert, manifestiert sich nach 16 h eine starke Reduktion (s. Abb. IV-31). Auffällig ist, dass sich im Vergleich zum zwei Stunden Wert ebenfalls in den mit der inaktiven Mutante der Subtilase behandelten Zellen der messbare Kalziumgehalt um ein Viertel reduziert. Dies ist eine in der Literatur bisher nicht beschriebene Veränderung von Zellen durch die Behandlung mit der SubAB Mutante. Zur Bestätigung muss der gezeigte Experimenttyp künftig um unbehandelte Zellen ergänzt werden und deren Verlauf des Kalziumgehalts parallel mitbestimmt werden.

V.2.2.4 Die Behandlung mit Subtilase erhöht die cytosolische Kalziumkonzentration

Abseits der Beeinflussung des Kalziumgehaltes (s. Kapitel V.2.2.3), haben sowohl die aktive als auch die veränderte Variante der Subtilase einen messbaren, direkten Einfluss auf die cytosolische Kalziumkonzentration (s. Abb. IV-32). Die Zugabe einer der beiden Subtilase-Varianten zu HeLa-Zellen in kalziumfreier Lösung führt nach einer kurzen Verzögerung von wenigen Minuten zu einer langsamen, doch steten Erhöhung des cytosolischen Kalziumgehaltes. Die Verzögerung ist bedingt durch die Dauer der Toxininternalisation und dem retrogradem Transport ins ER Lumen (Chong *et al.* 2008). Auf Grund der dafür notwendigen, identischen B-Untereinheit der aktiven und inaktiven Toxinvariante sollte deren Aufnahme in

die Zelle und Sortierung innerhalb der Zelle jedoch identisch sein. Im Gegensatz zur Toxinbehandlung ist die Menge an cytosolischem Kalzium in unbehandelten Zellen innerhalb des Zeitraums von 1 h konstant und schließt somit eine falsch-positiv interpretierte Veränderung der Kalziumkonzentration durch Ausbleichen des Fura-2 aus.

Wie die Verringerung des Gesamtkalziumgehaltes ist auch die Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration durch die aktive Subtilase signifikant größer als durch ihr inaktives Pendant und ist damit eine weitere in der Literatur bisher nicht beschriebene Veränderung von Zellen durch die Behandlung mit der SubAB Mutante (vgl. Abb. IV-31 und IV-32).

Unter biochemischen Gesichtspunkten sind aber beide Phänomene nachvollziehbar. Auch die Subtilase besitzt die für Serinproteasen typische katalytische Triade aus Ser-His-Asp (Berg *et al.* 2003). Um ihre katalytische und zytotoxische Aktivität zu inhibieren (> 99,9 %) genügt der Austausch des entscheidenden Serinrestes (Ser₂₇₂) der Triade zu Alanin (Paton *et al.* 2004). Durch die Punktmutation im Ser₂₇₂ geht jedoch nicht die hohe Bindungsspezifität der inaktiven Subtilase für BiP verloren. Vorstellbar ist, dass der permanente Bindungsversuch der inaktiven Subtilase an BiP selbiges transient in seiner Aktivität und Funktionalität behindert und so Einfluss auf die durch BiP stabilisierte Kalziumhomöostase nehmen könnte. Während es sich also bei der inaktiven Subtilase um einen transienten, stöchiometrischen Effekt handelt, ist die Inhibition von BiP durch die aktive Subtilase permanenter und katalytischer Natur. Eine aktive Subtilase spaltet irreversibel eine Vielzahl an BiP Molekülen.

Warum sich aber der gerade beschriebene Effekt auf die zelluläre Kalziumkonzentration nicht nach zwei Stunden Subtilasebehandlung als erhöhte basale Kalziumkonzentration im „imaging“ zu erkennen gibt, ist völlig unklar. Einerseits könnte es im bisher nicht untersuchten Zeitfenster zwischen einer und zwei Stunden zu einer regulatorischen Anpassung der behandelten Zellen kommen (z.B. Erhöhung der SERCA-Aktivität), welche den cytosolischen Kalziumspiegel wieder normalisiert. Andererseits könnte es auch mit dem unterschiedlichen Versuchsaufbau korrelieren. Im Falle der direkten Subtilasebehandlung (s. Abb. IV-32) befinden sich die Zellen bereits eine Minute vor der Toxinapplikation und danach weiterhin im kalziumfreien Puffer (s. Kapitel III.6.9.4), wohingegen die zweistündige Behandlung vor den zugehörigen Messungen (s. Abb. IV-29/30) in Medium bei physiologischen Kalziumkonzentrationen erfolgt. Eine weitere Alternative wäre, dass der direkt nach der Toxinapplikation gemessene Anstieg des cytosolischen Kalziumlevels im Zuge des retrograden Transportes aus einem anderen Organell wie dem Golgi entspringt oder aber durch die Invagination der Plasmamembran hervorgerufen wird. Dieses Szenario ist allerdings unwahrscheinlich, da in diesem Fall eine einheitliche Erhöhung für beide Toxinversionen zu

fordern wäre. Zudem sollte BiP, das einzige Zielprotein des Toxins, wegen seines ER Retentionssignals nur im ER lokalisiert sein (Dudek *et al.* 2009).

V.2.2.5 BiP beeinflusst substratspezifisch den Proteintransport ins ER

Für alle zugehörigen Transportversuche erfolgte die *BIP* Expressionsminderung durch die Subtilase. Tabelle IV-02, eine Zusammenfassung der Transportexperimente der toxin-behandelten HeLa-Zellen, verdeutlicht für die mit einer Signifikanzbestimmung versehenen Substrate drei Interpretationen. Zum Einen ist der substratspezifische Einfluss von BiP auf die Proteintranslokation unabhängig der posttranslationalen Modifikation des Vorläuferpolypeptids, da mit ppcecA und ERj3 sowohl Substrate betroffen sind deren charakterisierende Prozessierung entweder die Signalsequenzabspaltung (ppcecA) und/oder Glykosylierung (ERj3) betrifft. Zum Anderen sind mit ppcecA und ppinsulin zwei recht kurze (MW < 20 kDa) zu sezernierende Moleküle betroffen, wohingegen das längere ERj3 (≈ 40 kDa) ein ER luminales J-Domänen tragendes Protein darstellt. Demnach scheinen auch Sekretion und Molekulargewicht (MW) kein determinierendes Attribut. Ebenso wenig ist die Unterteilung in co- (ppinsulin, ERj3) und posttranslationale Substrate (ppcecA) charakteristisch für BiP abhängige Substrate. Unklar ist hingegen der Zusammenhang zwischen löslichen und membrangebundenen Proteinen. Bis dato beinhaltet die Substratliste lediglich lösliche Proteine, die durch die Fragmentierung von BiP in ihrer Translokation beeinflusst sind. Der kleine Satz (ivc, AQP2) an bisher getesteten Membranproteinsubstraten – „tail-anchor“ Proteine ausgenommen – erlaubt jedoch noch keine klare Differenzierung, dass BiP ausnahmslos lösliche Vorläuferpolypeptide zur Translokation unterstützt.

Wie bei Abwesenheit des Sec61 Komplexes, zeigt keines der drei getesteten „tail-anchor“ Membranproteine eine Beeinflussung der Membraninsertion unter Ausschluss von BiP, weshalb auch in diesem Fall die „tail-anchor“ Proteine als ideale Referenzsubstrate dienen (s. Abb. IV-35 und Tab. IV-02). Studien an Hefemutanten kommen zumindest für Cytochromb5 zum identischen Resultat (Yabal *et al.* 2003).

Besonders auffällig bei dieser Zusammenstellung ist, dass die Klasse (II) der BiP abhängigen Substrate (vgl. Klassifizierung in Kapitel IV.3.2.3) mit den Modellproteinen ERj3, ppcecA und auch ppinsulin exakt die gleichen Kandidaten umfasst wie Klasse (ii) der durch Sec61 α -Y344H ineffizient translozierten Substrate (vgl. Klassifizierung Kapitel IV.1.3.4). Dieses Übereinstimmende Substratspektrum zwischen BiP und der Tyrosinmutante des

Sec61 α ist ein weiteres Indiz für die Hypothese, dass BiP als potentieller Modulator und Interaktionspartner des humanen Sec61 Komplexes agiert. Eine ausführlichere Diskussion der potentiellen Interaktion zwischen BiP und dem Sec61 Komplex erfolgt in Kapitel V.4.1.

V.3 Interpretationen des *SEC62* „silencing“

Das Syntheseprodukt des *SEC62* Gens, eine weitere putative Untereinheit der menschlichen Translokase (s. Kapitel II.3.2.1), lässt sich ebenfalls durch unterschiedliche siRNAs binnen 96 h effizient depletieren (s. Abb. IV-22A). Die analysierte Auswirkung der Sec62 Depletion auf die Kalziumhomöostase liefert den ersten zellulären Hinweis auf eine mögliche Funktion des Proteins und einen weiteren potentiellen Regulator des Sec61 Komplexes.

V.3.1 Sec62 begrenzt die Kalziumleckage und Kalziumspeicherfunktion des ER

Wie Abbildung IV-22 verdeutlicht, gehen mit der Reduktion des Sec62 Proteingehaltes um rund 90 % drei messbare Veränderungen der Kalziumhomöostase einher. Zusätzlich zur Steigerung des durch TG visualisierten Kalziumausstroms des ER, zeigt sich gleichzeitig auch eine signifikante Anhebung der cytosolischen Ruhekalziumkonzentration und des durch Ionomycin freigesetzten Gesamtkalziumgehaltes. Ohne eine genauere, zeitliche Analyse bleibt die Rang- und Reihenfolge dieser Phänotypen spekulativ. Welcher der drei Effekte nun als Ursache, Folge oder Kompensation einzustufen ist, bleibt offen.

Auch wenn Datenbankenrecherchen zu Folge Sec62 als unspezifischer Kationenkanal operieren könnte (Saier 2000; Dudek *et al.* 2009), ist er als eigenständiger „leak“ Kanal auf Grund der Erhöhung des Kalziumeffluxes bei seiner Abwesenheit auszuschließen. Stattdessen könnte Sec62 direkt oder indirekt an der Modulation des Sec61 Komplexes beteiligt sein. Hierfür gibt es gleich mehrere stützende Fakten und Hinweise. Sec62 liegt im ER von Hundepankreaszellen in fast äquimolaren Konzentrationen zu Sec61 α vor (Tyedmers *et al.* 2000). D.h. jeder Sec61 Komplex könnte prinzipiell direkt durch ein Sec62 Molekül beeinflusst werden. Die bioinformatische Vorhersage cytosolisch gelegener EF-Hände im C-terminalen Teil des Sec62 (Greiner *et al.* 2011b), erlaubt die Annahme einer Kalziumabhängigkeit des Sec62 und somit eine von der Kalziumkonzentration beeinflusste Modulation des Sec61 Komplexes. Die Interaktion zwischen Sec62 und Sec63 gestattet die Spekulation über eine indirekte Regulation des Kalziumeffluxes auf Ebene des Sec61 Komplexes. Vermittelt durch die J-Domäne des Sec63 könnte das luminaire BiP via Sec62 und Sec63 zum Sec61 Komplex

rekrutiert werden und diesen wie in Kapitel V.2.1.1 angedeutet im passiven Kalziumefflux beschränken. Dafür spricht beispielsweise die ähnliche Erhöhung des Kalziumausstroms bei „silencing“ von Sec62 oder BiP. Ebenfalls vorstellbar wäre die indirekte Regulation des Sec61 Komplexes durch Sec62 von der cytosolischen Seite aus durch das Ribosom. Dank seiner hohen positiven Ladungsdichte, konzentriert in zwei cytosolisch gelegenen Peptiden des N-Terminus (Aminosäure 1-15 und 156-170), interagiert Sec62 hochaffin mit dem rRNA-Anteil von Ribosomen nahe des ribosomalen Tunnelausgangs (Müller *et al.* 2010). So könnte beispielsweise die Entstehung einer Kalziumnanodömäne in Umgebung der cytosolischen Öffnung des Sec61 Komplexes bewirken, dass die lokal erhöhte Kalziumkonzentration Sec62 befähigt das Ribosom dichter oder affiner auf den Sec61 Komplex zu „deckeln“ und so besser abzudichten. In Anlehnung an die Experimente nach Müller *et al.* (2011) könnte man die Methode der Oberflächenresonanzspektroskopie verwenden, um die für in diesem Szenario veränderte Affinität des Sec62 N-Terminus zum Ribosom in Abhängigkeit einer niedrigen [50 nM] und lokal erhöhten Kalziumkonzentration [10 μ M; (Clapham 2007)] zu bestimmen. Dass die Interaktion zwischen Ribosom und einem Membranprotein eine veränderbare Größe ist, zeigen die Daten von Benedix *et al.* (2010). ERj1 verringert seine Affinität gegenüber dem Ribosom durch die Interaktion der J-Domäne mit BiP. Kombiniert man nun die Idee der kalziumvariablen Ribosom-Sec62 Interaktion mit dem Fakt, dass Sec63 und das Ribosom nicht simultan mit Sec62 interagieren (Müller *et al.* 2010), hätte man mit Sec62 einen kalziumsensitiven, bi-lokalen Modulator des Sec61 Komplexes. Ein Kalziumimpuls („Ca²⁺ burst“) an der cytosolischen Öffnung des Sec61 Komplexes würde zu einer kompakteren Sec61 α -Ribosom Interaktion führen, wohingegen bei physiologischer, unstimulierter Kalziumkonzentration [50 - 100 nM] Sec62 mit Sec63 interagiert und so eine Regulation des Sec61 Komplexes mittels BiP luminal veranlassen könnte.

Eine weitere Alternative der indirekten Auswirkung des Sec62 auf die Kalziumhomöostase wäre die durch dessen Fehlen beeinflusste Synthese einer Komponente des Kalziumhaushaltes wie etwa die SERCA. Dazu passend ist die mittlerweile bestätigte Beteiligung des Sec62 Proteins der Hefe und des Säugers am Proteintransport (Deshaies *et al.* 1991; Plath *et al.* 2004; Johanna Dudek & Stefan Schorr, persönliche Mitteilung)

Im Falle des Sec62 „silencing“ scheint die nach 96 h zu beobachtende Änderung der Kalziumhomöostase offensichtlich nicht toxisch zu sein, da selbst eine deutlich längere Depletion des Sec62 von HeLa-Zellen toleriert wird (Melanie Theis, persönliche Mitteilung).

Die potentiellen Möglichkeiten der Modulation des Sec61 Komplexes durch Sec62 sind in der nachfolgenden Abbildung V-02 zusammengetragen.

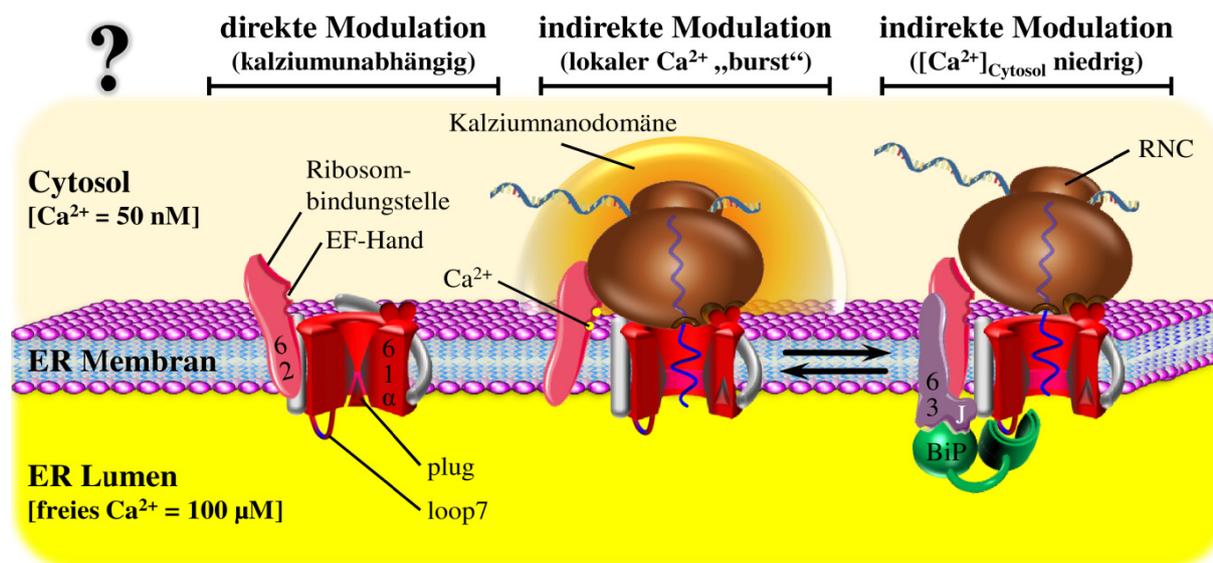


Abb. V-02: Hypothetische Beeinflussung des Kalziumausstroms des Sec61 Komplexes durch Sec62. Neben einer direkten, kalziumunabhängigen Modulation des Sec61 Komplexes durch Sec62 (62), könnte sich die Beeinflussung der Translokase auch indirekt, kalziumabhängig über die beiden potentiellen EF-Hände (EF-Hand) des Sec62, äußern. Die Entstehung einer Kalziumnanodomäne (Ca^{2+} „burst“) am Sec61 Komplex könnte durch die lokal erhöhte Kalziumkonzentration zur kompakteren Assoziation zwischen Ribosom und Sec61α (61α) führen und so den Kalziumefflux minimieren. Bei geringer Kalziumkonzentration im Cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cytosol}}$) könnte über eine ermöglichte Assoziation zwischen Sec62 und Sec63 (63) auch BiP zum Sec61 Komplex rekrutiert werden und dieses vom Lumen aus modulieren. Beide indirekten Mechanismen könnten eventuell auch alternierend oder gleichzeitig ineinander greifen (schwarze Pfeile).
 Ca^{2+} = Kalziumion; J = J-Domäne; RNC = Ribosom-naszierende Kette-Komplex

V.4 Physiologische Relevanz der Daten

Bei Analyse zellulärer Veränderungen auf Grund einer Zellmanipulation, wie sie in der vorliegenden Arbeit mehrfach gefunden wurden, ist deren Einordnung auf physiologischer Ebene von großer Bedeutung. Eine sinnvolle Einbettung der Ergebnisse in einen biologischen Kontext erlaubt nicht nur Rückschlüsse über die Qualität der Messungen und Resultate, sondern auch über die erhobenen Schlussfolgerungen. Was es bei der Arbeit mit Zelllinien allerdings stets zu Bedenken gilt, ist, dass durch deren vorangehende Immortalisierung bereits die Ergebnisse beeinflussende Veränderung entstanden sein könnten, welche in primären Zellen oder einem Organismus nicht zu finden sind.

V.4.1 Das ER Chaperon BiP moduliert die Funktionen des Sec61 Komplexes

Wie in verschiedenen Kapiteln bereits angedeutet mehrten sich die Anzeichen einer direkten Regulation des Sec61 Komplexes durch die geforderte Interaktion zwischen Sec61 α und BiP. BiP moduliert nicht nur die durch den Sec61 Komplex katalysierte Funktion des Proteintransports, sondern auch dessen Eigenschaft als passiven Kalziumeffluxkanal (s. Abb. V-03). Ferner wird durch die Analysen der diabetesassoziierten Punktmutation im loop7 des Sec61 α Proteins (Sec61 α -Y344H) die Interaktion zwischen BiP und Sec61 α auf diese luminaire Schleife eingegrenzt. Ausschlaggebend für die Annahme der Interaktion zwischen BiP und Sec61 α sind folgende Indizien. Durch die Mutation im Sec61 α -Y344H wird die Funktion des aktiven Proteintransports und des passiven Kalziumeffluxes nicht vollständig eliminiert. Stattdessen ergeben sich phänotypischen Übereinstimmungen bei der Expression des *SEC61A1-Y344H* und der Elimination von BiP.

Bei Depletion von BiP durch das Zytotoxin Subtilase zeigt sich für ERj3 und *ppcecA* die gleiche substratspezifische Beeinflussung des Proteintransports wie bei Anwesenheit des Sec61 α -Y334H (vgl. Tab. IV-01 und IV-02). Hier gilt es künftig die Prionproteinderivate (PrP Δ HD, PrP Δ GPI; vgl. Tab. IV-02) mit beiden Zellmanipulationen zu testen, um weitere potentielle Kandidaten zur Bestätigung des überlappenden Substratspektrums zu finden. Ferner müsste auch die sich nur schwach andeutende Proteintransportdifferenz des *ppinsulin* bei Komplementation mit Wildtyp und Mutante des *SEC61A1* (vgl. Tab. IV-01) ausführlicher bestimmt werden. Desweiteren sind die Auswirkungen der siRNA vermittelten BiP Reduktion auf die Analyse der cytosolischen Kalziumfluktuationen vergleichbar denen der Komplementation des Sec61 α depletierten zellulären Hintergrundes mit *SEC61A1-Y344H*. Beide Zellmanipulationen resultieren in einem permanent erhöhten Kalziumausstrom und der Insensitivität gegenüber den Perturbationen durch die Faltungsantagonisten DTT und Tun (vgl. Abb. IV-20C/D und IV-23C/E). Lässt sich die Idee der BiP-Sec61 α Interaktion vermittelt durch den luminalen loop7 des Sec61 α in ein sinnvolles Modell einordnen und ermöglicht dieses weitere Rückschlüsse über andere Phänotypen in Zusammenhang mit Sec61 α ?

Ausgehend vom Kristallstrukturmodell des Sec61 Komplexes (Van den Berg *et al.* 2004; Zimmermann *et al.* 2011) bietet der luminaire loop7 die ideale Position für BiP um Einfluss auf den Proteintransport und die Kalziumleckage des Sec61 α Proteins zu nehmen. Loop7 verbindet die beiden Transmembrandomänen (TMD) 7 und 8, die beide als Bestandteil des lateralen „gate“ gelten (vgl. Abb. II-03), um darüber die Beweglichkeit des Sec61 α Moleküls zu steuern. So kann BiP, vom Lumen aus vermittelt, über den loop7 Einfluss auf die Flexibilität des lateralen „gate“ nehmen und wäre damit am Öffnungszustand oder der Permeabilität des Sec61 Komplexes für Proteine und Ionen beteiligt. Während vermutlich die

Bindung von BiP an den loop7 die Permeabilität für Kalziumionen reduziert, also den Sec61 Komplex versiegelt, ist es womöglich die permanente Transition von BiP-ADP zu BiP-ATP und zurück, im Verlauf eines Hsp70 Zyklus, die den Proteintransport bestimmter Substrate gestattet (ERj3) oder unterstützt. Die Notwendigkeit des lateralen „gate“ für den Proteintransport folgert aus den Ergebnissen verschiedener Quervernetzungsstudien und bioinformatischer Simulationen (Plath *et al.* 1998; 2004; Junne *et al.* 2007; Mandon *et al.* 2009). Diese beschreiben das Interkalieren verschiedener Signalsequenzen zwischen den TMD des lateralen „gate“ zur anschließenden Entlassung der Signalsequenz in die Membran. Das determinierende Attribut zwischen BiP abhängigen Substraten und solchen die unbeeinflusst des BiP Gehaltes transportieren, liegt vermutlich in der „Effizienz“ einer Signalsequenz das Translokon zu öffnen kodiert (Kang *et al.* 2006). Darüber hinaus zeigen die Daten von Trueman *et al.* (2011) an Hefemutanten ebenfalls die Notwendigkeit des luminalen loop7 des Sec61p Komplexes für den co- und posttranslationalen Proteintransport, jedoch ohne Verbindung zu BiP. Zusammengenommen kann dies bedeuten, dass BiP den Sec61 Komplex womöglich auf verschiedene Weisen bezüglich der Kalziumblockade und dem Proteintransport moduliert, eventuell in Abhängigkeit weiterer Faktoren wie Sec63, Sec62 (s. Kapitel V.3.1) oder dem Ribosom (Gumbart *et al.* 2009). Die den loop7 flankierenden Transmembrandomänen 7 und 8 des Sec61 α partizipieren somit gleichzeitig luminal an der postulierten BiP Bindungsstelle (loop7), innerhalb der Membran am lateralen „gate“ und auf der cytosolischen Seite an der Ribosombindungsstelle (loop6 und loop8; vgl. Abb. II-03). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit der kooperativen oder sich ausschließenden Wechselwirkung der drei molekularen Maschinen BiP, Sec61 Komplex und Ribosom vermittelt über die „Signalkette“ im Sec61 α Protein: loop7 \leftrightarrow TMD7/8 \leftrightarrow loop6/8 (vgl. Abb. V-03).

Beachtet man den Umstand der molaren Verhältnisse von BiP (5 μ M) und Sec61 α (2 μ M) in rauen Mikrosomen des Hundepankreas (Bies *et al.* 1999; Guth *et al.* 2004), so könnte prinzipiell jedes Translokon durch BiP reguliert werden. Auch wenn *in vivo* der Beweis der direkten Interaktion zwischen BiP und Sec61 α noch aussteht, deuten erste *in vitro* Untersuchungen auf Basis von immobilisierten Peptidspots die Bindung des chemisch synthetisierten loop7 im Bereich des Tyrosin₃₄₄ durch lösliches BiP an. Zudem verhindert der alleinige Aminosäureaustausch des Tyrosin₃₄₄ zu Histidin (vgl. Sec61 α -Y344H) auch auf Peptidspotebene die Assoziation von BiP an die Sequenz des loop7 und festigt die Interpretationen der BiP Depletion und der Sec61 α -Y344H Mutante (Martin Jung, persönliche Mitteilung). Ob es sich bei der Bindung des loop7 durch BiP um eine reine Substratbindung durch die Peptid-Bindedomäne des BiP handelt, kann noch nicht beantwortet werden.

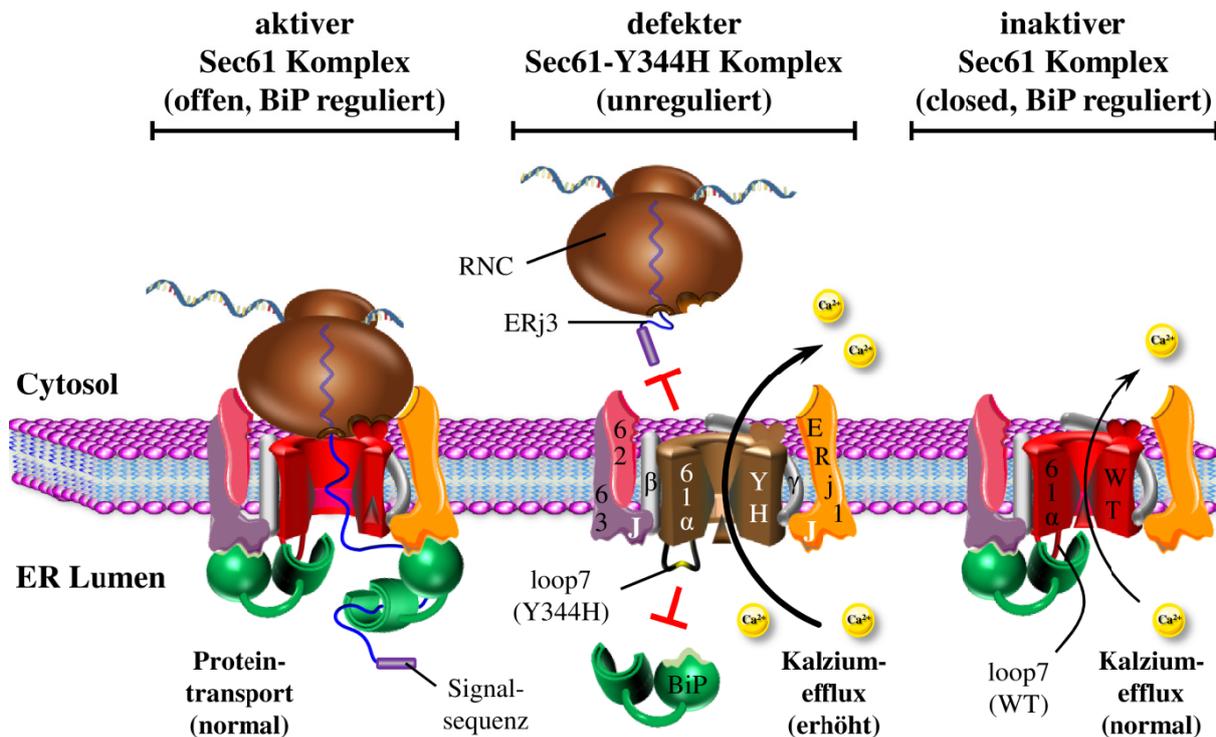


Abb. V-03: Modulation des Sec61 Komplexes durch die BiP-Sec61 α Interaktion am loop7
 In der Bildmitte ist die substratspezifische (ERj3) Blockade der Proteintranslokation durch das Sec61 α -Y344H (61 α YH) gezeigt, sowie der in Gegenwart dieser Mutation erhöhte Kalziumefflux. Beide Effekte sind vermutlich bedingt durch die fehlende BiP-loop7 Interaktion, welche beim wildtypischen Protein (61 α WT) eine normale Proteintranslokation (links) gewährleistet bei vergleichsweise verringerter (normaler) Kalziumeffluxrate (rechts). 62/63 = Sec62/63; β/γ = Sec61 β/γ ; J = J-Domäne; RNC = Ribosom-naszierende Kette-Komplex

Auf Grund der in dieser Arbeit ermittelten Zusammenhänge zwischen dem *SEC61A1* bzw. *SEC61A1-Y344H* und dem Kalziumausstrom bieten sich auch für bestehende Literaturdaten neue Interpretationsweisen. Das ungeklärte Absterben der β -Zellen des Pankreas der homozygoten Sec61 $\alpha^{Y344H/Y344H}$ Maus (Lloyd *et al.* 2010), könnte alternativ oder zusätzlich durch den permanent erhöhten Kalziumefflux Apoptose induzieren. Außerdem könnten verschiedene weitere Phänotypen des Mausmodells, wie Hepatomegalie oder die 30 % Verlust an Körpergewicht, in Zusammenhang mit der substratspezifisch veränderten Sekretion durch das Sec61 α -Y344H stehen. Auch die von Kanuka *et al.* (2005) beschriebene postmitotische Neurotoxizität, induziert von ektopisch in den Photorezeptorzellen der Fliege gebildetem Sec61 α , könnte anstelle der vorgeschlagenen vermehrten Retrotranslokation fehlgefalteter Substrate durch einen erhöhten Kalziumefflux vermittelt sein, der ebenso zur Apoptose führen würde.

V.5 Offene Fragen

Wie es in der Wissenschaft häufig der Fall ist, werfen neue Resultate gleichzeitig neue und weiterführende Fragen auf. So gehen auch aus der vorliegenden Arbeit weitere Fragestellungen hervor, welche künftig untersucht werden können und an dieser Stelle Raum für Spekulationen lassen, beispielsweise über die Substratspezifität und den Kalziumausstrom.

V.5.1 Die Grundlage der Substratspezifität von BiP und Sec61 α -Y344H?

Was ist das charakteristische Unterscheidungsmerkmal der BiP und Sec61 α -Y344H abhängigen Substrate? Diese sich aufdrängende Frage kann auf Grund des bisher erst kleinen Sets an getesteten Substraten noch nicht hinreichend beantwortet werden. Da aber zum betroffenen Substratspektrum auch cotranslational transportierte Substrate wie ERj3 zählen, muss das kennzeichnende Attribut der BiP/Sec61 α -Y344 abhängigen Substrate in ihrer Signalsequenz verborgen liegen. Dies ist zu fordern, da die reife Sequenz cotranslational transportierter Substrate auf Grund des Synthesearrestes im Zuge der Zielsteuerung („targeting“) noch nicht vollständig synthetisiert ist und noch verborgen im ribosomalen Tunnel vorliegt (vgl. Kapitel II.2.1.1). Ein erster Hinweis aus Vergleichen der Signalsequenzen mittels Hydrophatit-Plots und Ladungsverteilung zeigen, dass die Signalsequenz des ERj3 relativ kurz ist und keine geladenen Aminosäuren aufweist. Ihr fehlt der charakteristische tripartite Aufbau aus n-, h- und c-Region (vgl. Kapitel II.2.1) und sie ist überwiegend hydrophob (Johanna Dudek, persönliche Mitteilung). Ebenfalls völlig unklar ist, wie BiP auf das Translokon einwirkt, um es zur effizienten Translokation bestimmter Vorläuferproteine zu befähigen. Im Falle der posttranslationalen Substrate, wie ppeccA, könnte die Wirkung von BiP auch direkt auf die translozierende Kette gerichtet sein, anstelle einer Beeinflussung der Translokase. Da im posttranslationalen Modus Polypeptide nicht vom Ribosom durch den Sec61 Komplex geschoben werden, ist es die luminal Aktivität von BiP, welche in Form einer molekularen Ratsche die Richtung des Transportes durch den passiven Kanal vorgibt (Tyedmers *et al.* 2003; Escauriaza 2006). Einen weiteren Hinweis der Interaktion zwischen BiP und Sec61 α könnte künftig auch die Kombination aus BiP Depletion und Komplementation der Sec61 α depletierten Zellen mit Sec61 α -Y344H liefern. Die doppelte Zellmanipulation sollte im Idealfall keinen additiven Effekt gegenüber den Einzelmanipulationen zeigen, sofern BiP und Sec61 α -Y344H „in Reihe geschaltet“ agieren.

V.5.2 Kalziumefflux: aber warum?

Die zu diesem Zeitpunkt vermutlich am schwierigsten zu beantwortende Frage liegt im physiologischen Sinn des passiven Kalziumausstroms aus dem ER. Sie könnte schlicht evolutiver Zufall sein. Was bedeutet, es wäre der Zelle nicht möglich gewesen das ER hermetisch zu verriegeln, womöglich bedingt durch die ständigen Proteinströme in und aus dem ER. Umgekehrt, und das wäre die attraktivere Lösung, erfolgt durch den permanenten, aber veränderbaren, Kalziumausstrom (s. Effekte von Puromycin, DTT und Tunicamycin) eine Informationsübertragung aus dem ER ins Cytosol und/oder weitere Organellen, wie Mitochondrien. Damit wäre der passive Kalziumefflux des ER quasi ein beabsichtigter Signalweg vieler eukaryotischer Zellen. Doch welche Information könnte dieser „Kalziumefflux-Signalweg“ kodieren und an wen übermitteln? Ein rein spekulatives Modell dieser Frage, basierend auf den Resultaten der Wirkung der Xenobiotika Puromycin, DTT, Tunicamycin und der Calmodulininhibitoren Ophiobolin A und Trifluoperazin (Erdmann *et al.* 2011) zeigt die nachfolgende Abbildung V-04.

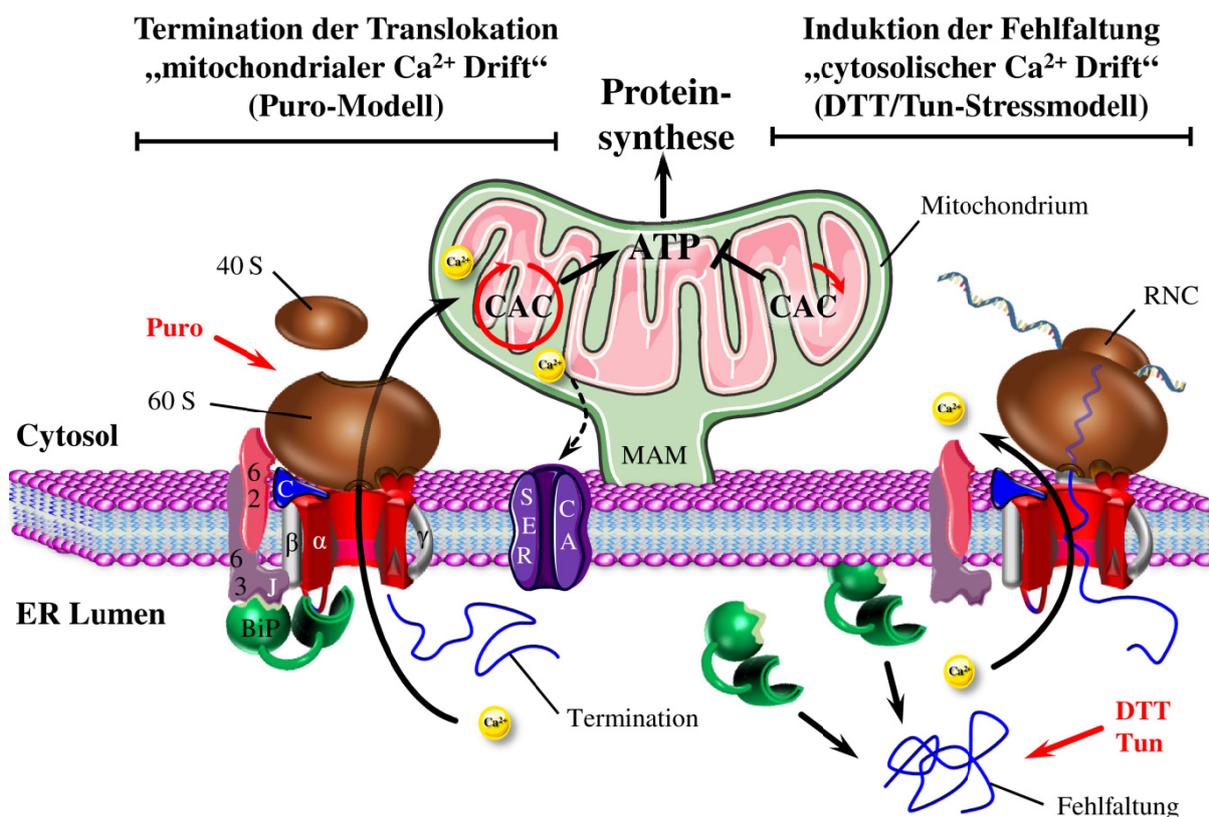


Abb. V-04: Erklärungsversuch der physiologischen Notwendigkeit des Kalziumausstroms des ER

Ausführliche Erläuterung im Text.

40 S/60 S = kleine/große ribosomale Untereinheit; 62/63 = Sec62/63; α/β/γ = Sec61α/β/γ; C = Calmodulin; CAC = Zitronensäurezyklus; DTT = Dithiothreitol; J = J-Domäne; MAM = Mitochondrien-assoziierte ER Membran; Puro = Puromycin; RNC = Ribosom-naszierende Kette-Komplex; Tun = Tunicamycin

Die grundlegende Idee des Kalziumeffluxmodells liegt in der veränderbaren Kalziumroute in Abhängigkeit eines physiologischen oder pharmakologisch induzierten Stimulus.

Im Falle der Termination des Proteintransportes – hervorgerufen durch das in der mRNA kodierte Stoppcodon oder induziert durch die abrupte Freisetzung vieler naszierender Ketten durch Puromycin – entsteht eine kurzzeitige „Kanalisation“ des Kalziumefflux durch das Translokon, über das (disassemblierte?) Ribosom in die Mitochondrien. Letztere stehen über die MAM (s. Kapitel II.5.5.1) mit dem ER in einer idealen Distanz von 10 – 25 nm in engem Kontakt (Hayashi *et al.* 2009; de Brito & Scorrano 2010). Eine Distanz, welche gerade genügen würde eukaryotische 80 S Ribosomen in naher Umgebung zu beherbergen (Doudna & Rath 2002; Lur *et al.* 2009; Ben-Shem *et al.* 2010). Bis zur Versiegelung der inaktiven Translokase nach der Termination (eine unbekannte Zeitspanne) durch den „plug“ und „pore ring“ sowie weitere akzessorische Komponenten kommt es durch die Kanalisierung zum Strom an Kalziumionen in die Mitochondrien, welche diese durch den mitochondrialen Kalziumuniporter aufnehmen (Baughman *et al.* 2011). Dieser Kalziuminput ist wichtig für den Zitronensäurezyklus (CAC). Der CAC nutzt kalziumsensitive Dehydrogenasen (Pyruvat-, Isocitrat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase), welche bei ausreichender Kalziumkonzentration im Lumen der Mitochondrien die direkte GTP-Synthese und die ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung (Atmungskette) unterstützen (Rizzuto *et al.* 2009). GTP und ATP dienen wiederum direkt der Proteinsynthese.

Vermehrte Proteinfehlfaltung, die durch DTT oder Tun induziert werden kann, hingegen könnte den mitochondrialen zu einem cytosolischen Kalziumdrift abändern. Missgefaltete Proteine beordern BiP – sowohl aus einem „inaktiven“ Pool (Kang *et al.* 2006) als auch vom loop7 des Sec61 α – und führen damit zur möglichen Konformations- oder Permeabilitätsänderung des Sec61 Komplexes vermittelt durch loop7 (luminale BiP Interaktionsstelle) über TMD7/8 („lateral gate“) hin zu loop6/8 (cytosolische Ribosombindungsstelle; vgl. Kapitel V.4.1). Das noch synthetisierende, intakte 80 S Ribosom erlaubt unter diesen Umständen nicht die „Kanalisation“ und Kalzium entflieht stattdessen seitlich an der Grenzfläche zwischen Ribosom und Sec61 Komplex ins Cytosol. Dadurch wären die kalziumsensitiven Dehydrogenasen inaktiv und die ATP-Produktion, zumindest kurzzeitig, reduziert. Dieser schnelle Mechanismus würde durch die Reduktion des ATP-Gehaltes die generelle Blockade der Proteinsynthese im Zuge der UPR durch den PERK Zweig (Phosphorylierung des eIF2 α) unterstützen. Zudem führt die Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration zur Einleitung der Apoptose, sofern der permanent erhöhte Kalziumausstrom und die Proteinfehlfaltung durch das Gegenwirken der UPR nicht zügig reduziert werden. Das zeitlich sehr schnelle Umschalten des mitochondrialen auf den cytosolischen Kalziumdrift wäre also ein

erstes Signal aus dem ER, welches ein Problem der Faltungskapazität übermittelt. Ist das Faltungsproblem und der damit verbundene ER Stress allerdings von längerer Dauer, werden alle Signalwege der UPR (Ire1/XBP1, ATF6 und PERK) aktiviert und durch die Expression der Zielgene (z.B. SERCA1 (trunkierte Isoform), $\sigma 1$ Rezeptor) kommt es zu einem vermehrtem Kalziumeinstrom in die Mitochondrien, zur Kalziumüberladung und Einleitung der Apoptose (Berridge 2002; de Brito & Scorrano 2010; Abou-lovergne *et al.* 2011).

Der stete, aber veränderbare Kalziumefflux aus dem ER gibt laut Modell (s. Abb. V-04) also Auskunft über die Proteinfaltungskapazität und den Stresszustand, kurz die Physiologie des ER Lumens. Eventuell wäre es der Zelle auch möglich gewesen das „leakage“ des ER zu unterbinden und nur bei Fehlfaltung zu aktivieren. Der Vorteil eines geringen Kalziumausstroms (d.h. Efflux ungleich null) ist aber eine Reaktionsmöglichkeit oder Antwort der Zelle in beide Richtungen, wobei eine Erhöhung des Efflux vermutlich eine andere Information übermittelt als deren Verringerung.

Die Validität jedes Modells beruht auf dessen fortbestehender Gültigkeit bei Anwendung auf andere Fragestellungen. In diesem Fall könnte das die Frage nach der Auswirkung der Calmodulininhibitoren Ophiobolin A und Trifluoperazin oder der Depletion von Sec62 sein.

Calmodulin minimiert durch seine Bindung an den cytosolischen N-Terminus des Sec61 α genau an der Grenzfläche zwischen Ribosom und Sec61 Komplex (vgl. Abb. V-04) den Kalziumefflux (Erdmann *et al.* 2011). Durch die Inhibition von Calmodulin entsteht wie für DTT und Tunicamycin ein intensivierter Kalziumefflux nach Thapsigargingabe, der sich, wie man aus dem Modell abstrahieren würde, in einer Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration äußert. Auch für die Depletion von Sec62 zeigt sich eine Erhöhung des durch Thapsigargin demaskierten Kalziumausstroms (s. Abb. IV-22). In diesem Fall könnte, unter Einbeziehung der Spekulationen aus Kapitel V.3.1 (vgl. Abb. V-02), die Abwesenheit des Sec62 die Effizienz der Interaktion zwischen Ribosom und Sec61 Komplex behindern und würde ebenfalls in einem vermehrten seitlichen Efflux an Kalzium resultieren mit einer Erhöhung der cytosolischen Kalziumkonzentration. Offen lässt das Modell aber die regulatorische Anpassung nach der Depletion von Sec62, welche zu einer Anhebung der cytosolischen wie auch luminalen Kalziumkonzentration führt.

Weitere Bestätigung findet das Modell aus Abbildung V-04 durch die Arbeit mit dem Antagonisten der mitochondrialen Kalziumaufnahme Ru360. In Kombination mit Ru360 zeigt sich durch das Verhindern des mitochondrialen Kalziumdrifts auch für Puromycin eine Steigerung im cytosolischen Kalziumgehalt (Igor Gamayun, persönliche Mitteilung).

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Abell BM, Jung M, Oliver JD, Knight BC, Tyedmers J, Zimmermann R and High S (2003): Tail-anchored and Signal-anchored Proteins Utilize Overlapping Pathways during Membrane Insertion. *Journal of Biological Chemistry* 278(8): 5669-5678.
- Abell BM, Pool MR, Schlenker O, Sinning I and High S (2004): Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes. *EMBO Journal* 23(14): 2755-2764.
- Abell BM, Rabu C, Leznicki P, Young JC and High S (2007): Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *Journal of Cell Science* 120(10): 1743-1751.
- Abou-lovergne A, Collado-Hilly M, Monnet FP, Koukoui O, Prigent S, Coquil JF, Dupont G and Combettes L (2011): Investigation of the role of sigma1-receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate dependent calcium signaling in hepatocytes. *Cell Calcium* 50(1): 62-72.
- Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM and Johnson AE (2005): The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 168(3): 389-399.
- Amer MS, Li J, O'Regan DJ, Steele DS, Porter KE, Sivaprasadarao A and Beech DJ (2009): Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 296(4): H910-H916.
- Anderson DJ, Mostov KE and Blobel G (1983): Mechanisms of integration of de novo-synthesized polypeptides into membranes: signal-recognition particle is required for integration into microsomal membranes of calcium ATPase and of lens MP26 but not of cytochrome b5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(23): 7249-7253.
- Andreasson C, Rampelt H, Fiaux J, Druffel-Augustin S and Bukau B (2010): The endoplasmic reticulum Grp170 acts as a nucleotide exchange factor of Hsp70 via a mechanism similar to that of the cytosolic Hsp110. *Journal of Biological Chemistry* 285(16): 12445-12453.
- Andrews AT (1986): *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Oxford [Oxfordshire]; New York, Clarendon Press; Oxford University Press.
- Arispe N, Rojas E and Pollard HB (1993): Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(2): 567-571.
- Ashby MC and Tepikin AV (2001): ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12(1): 11-17.
- Auer J, Spicker G and Böck A (1991): Presence of a gene in the archaebacterium *Methanococcus vannielii* homologous to secY of eubacteria. *Biochimie* 73(6): 683-688.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A and Kelly JW (2008): Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* 319(5865): 916-919.
- Baluska F, Volkmann D and Barlow PW (2004): Eukaryotic Cells and their Cell Bodies: Cell Theory Revised. *Annals of Botany* 94(1): 9-32.
- Barrero MJ, Montero M and Alvarez J (1997): Dynamics of [Ca²⁺] in the Endoplasmic Reticulum and Cytoplasm of Intact HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(44): 27694-27699.
- Bassik MC and Kampmann M (2011): Knocking out the door to tunicamycin entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(29): 11731-11732.

- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL (2011): Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360): 341-345.
- Baumann O and Walz B (2001): Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *International Review of Cytology*, Academic Press. 205: 149-214.
- Becker T, Bhushan S, Jarasch A, Armache JP, Funes S, Jossinet F, Gumbart J, Mielke T, Berninghausen O, Schulten K (2009): Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science* 326(5958): 1369-1373.
- Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J and Paton JC (2010): Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends in Biochemical Sciences* 35(7): 411-418.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G and Yusupov M (2010): Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330(6008): 1203-1209.
- Benedix J, Lajoie P, Jaiswal H, Burgard C, Greiner M, Zimmermann R, Rospert S, Snapp EL and Dudek J (2010): BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERj1 for ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* 285(47): 36427-36433.
- Berbey Cl, Weiss N, Legrand C and Allard B (2009): Transient Receptor Potential Canonical Type 1 (TRPC1) Operates as a Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak Channel in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* 284(52): 36387-36394.
- Berg JM, Tymoczko JL and Stryer L (2003): *Biochemie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Berndt U, Oellerer S, Zhang Y, Johnson AE and Rospert S (2009): A signal-anchor sequence stimulates signal recognition particle binding to ribosomes from inside the exit tunnel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(5): 1398-1403.
- Berridge MJ (2002): The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32(5-6): 235-249.
- Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(7): 517-529.
- Berridge MJ, Lipp P and Bootman MD (2000): The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1(1): 11-21.
- Besemer J, Harant H, Wang S, Oberhauser B, Marquardt K, Foster CA, Schreiner EP, de Vries JE, Dascher-Nadel C and Lindley IJD (2005): Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature* 436(7048): 290-293.
- Biermann E, Baack M, Kreitz S and Knippers R (2002): Synthesis and turn-over of the replicative Cdc6 protein during the HeLa cell cycle. *European Journal of Biochemistry* 269(3): 1040-1046.
- Bies C, Guth S, Janoschek K, Nastainczyk W, Volkmer J and Zimmermann R (1999): A Scj1p homologue and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *Biological Chemistry* 380(10): 1175-1182.
- Blau M, Mullapudi S, Becker T, Dudek J, Zimmermann R, Penczek PA and Beckmann R (2005): ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nature Structural & Molecular Biology* 12(11): 1015-1016.
- Blobel G and Dobberstein B (1975a): Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *Journal of Cell Biology* 67(3): 835-851.

- Blobel G and Dobberstein B (1975b): Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *Journal of Cell Biology* 67(3): 852-862.
- Borel AC and Simon SM (1996): Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell* 85(3): 379-389.
- Borgese N, Brambillasca S, Soffientini P, Yabal M and Makarow M (2003a): Biogenesis of tail-anchored proteins. *Biochemical Society Transactions* 31(6): 1238-1242.
- Borgese N, Colombo S and Pedrazzini E (2003b): The tale of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Biology* 161(6): 1013-1019.
- Borgese N and Fasana E (2011): Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(3): 937-946.
- Borgese N, Mok W, Kreibich G and Sabatini DD (1974): Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *Journal of Molecular Biology* 88(3): 559-580.
- Borgese N and Righi M (2010): Remote origins of tail-anchored proteins. *Traffic* 11(7): 877-885.
- Bozkurt G, Wild K, Amlacher S, Hurt E, Dobberstein B and Sinning I (2010): The structure of Get4 reveals an α -solenoid fold adapted for multiple interactions in tail-anchored protein biogenesis. *FEBS Letters* 584(8): 1509-1514.
- Braakman I and Bulleid NJ (2011): Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry* 80(1): 71-99.
- Brambillasca S, Yabal M, Makarow M and Borgese N (2006): Unassisted translocation of large polypeptide domains across phospholipid bilayers. *Journal of Cell Biology* 175(5): 767-777.
- Brambillasca S, Yabal M, Soffientini P, Stefanovic S, Makarow M, Hegde RS and Borgese N (2005): Transmembrane topogenesis of a tail-anchored protein is modulated by membrane lipid composition. *EMBO Journal* 24(14): 2533-2542.
- Breyton C, Haase W, Rapoport TA, Kuhlbrandt W and Collinson I (2002): Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418(6898): 662-665.
- Brodsky JL, Goekeler J and Schekman R (1995): BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(21): 9643-9646.
- Brostrom MA and Brostrom CO (2003): Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* 34(4-5): 345-363.
- Buchkovich NJ, Maguire TG, Yu Y, Paton AW, Paton JC and Alwine JC (2008): Human Cytomegalovirus Specifically Controls the Levels of the Endoplasmic Reticulum Chaperone BiP/GRP78, Which Is Required for Virion Assembly. *Journal of Virology* 82(1): 31-39.
- Burda P and Aebi M (1999): The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426(2): 239-257.
- Burgard C (2009): Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der ER-Proteintranslokase. Homburg, Universität des Saarlandes, Dissertation.
- Calamini B, Silva MC, Madoux F, Hutt DM, Khanna S, Chalfant MA, Saldanha SA, Hodder P, Tait BD, Garza D (2012): Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases. *Nature Chemical Biology* 8(2): 185-196.
- Calo D and Eichler J (2011): Crossing the membrane in Archaea, the third domain of life. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(3): 885-891.
- Camello C, Lomax R, Petersen OH and Tepikin AV (2002): Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32(5-6): 355-361.

- Cao TB and Saier Jr MH (2003): The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609(1): 115-125.
- Carafoli E, Santella L, Branca D and Brini M (2001): Generation, Control, and Processing of Cellular Calcium Signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36(2): 107-260.
- Carvalho P, Stanley AM and Rapoport TA (2010): Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* 143(4): 579-591.
- Case RM, Eisner D, Gurney A, Jones O, Muallem S and Verkhratsky A (2007): Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium* 42(4-5): 345-350.
- Chami M, Gozuacik D, Lagorce D, Brini M, Falson P, Peaucellier Gr, Pinton P, Lecoœur H, Gougeon M-L, le Maire M (2001): SERCA1 Truncated Proteins Unable to Pump Calcium Reduce the Endoplasmic Reticulum Calcium Concentration and Induce Apoptosis. *Journal of Cell Biology* 153(6): 1301-1314.
- Chami M, Oules B, Szabadkai G, Tacine R, Rizzuto R and Paterlini-Brechot P (2008): Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Molecular Cell* 32(5): 641-651.
- Chami M, Prandini A, Campanella M, Pinton P, Szabadkai G, Reed JC and Rizzuto R (2004): Bcl-2 and Bax Exert Opposing Effects on Ca²⁺ Signaling, Which Do Not Depend on Their Putative Pore-forming Region. *Journal of Biological Chemistry* 279(52): 54581-54589.
- Chartron JW, Suloway CJM, Zaslaver Ma and Clemons WM (2010): Structural characterization of the Get4/Get5 complex and its interaction with Get3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(27): 12127-12132.
- Cheetham ME and Caplan AJ (1998): Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3(1): 28-36.
- Cheetham ME, Jackson AP and Anderton BH (1994): Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSJ1a and HSJ1b. *European Journal of Biochemistry* 226(1): 99-107.
- Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR (2012): *Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast*. *Nucleic Acids Research* 40(D1): D700-D705.
- Cheung K-H, Mei L, Mak D-OD, Hayashi I, Iwatsubo T, Kang DE and Foskett JK (2010): Gain-of-Function Enhancement of IP₃ Receptor Modal Gating by Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin Mutants in Human Cells and Mouse Neurons. *Science Signaling* 3(114): ra22.
- Cheung K-H, Shineman D, Müller M, Cárdenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VMY and Foskett JK (2008): Mechanism of Ca²⁺ Disruption in Alzheimer's Disease by Presenilin Regulation of InsP₃ Receptor Channel Gating. *Neuron* 58(6): 871-883.
- Chong DC, Paton JC, Thorpe CM and Paton AW (2008): Clathrin-dependent trafficking of subtilase cytotoxin, a novel AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Cellular Microbiology* 10(3): 795-806.
- Chu FF and Doyle D (1985): Turnover of plasma membrane proteins in rat hepatoma cells and primary cultures of rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry* 260(5): 3097-3107.
- Clapham DE (2007): Calcium signaling. *Cell* 131(6): 1047-1058.
- Cline J, Braman JC and Hogrefe HH (1996): PCR Fidelity of Pfu DNA Polymerase and Other Thermostable DNA Polymerases. *Nucleic Acids Research* 24(18): 3546-3551.
- Colbeau A, Nachbaur J and Vignais PM (1971): Enzymatic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 249(2): 462-492.

- Colombo SF, Longhi R and Borgese N (2009): The role of cytosolic proteins in the insertion of tail-anchored proteins into phospholipid bilayers. *Journal of Cell Science* 122(14): 2383-2392.
- Combettes L, Dumont M, Berthon B, Erlinger S and Claret M (1988): Release of calcium from the endoplasmic reticulum by bile acids in rat liver cells. *Journal of Biological Chemistry* 263(5): 2299-2303.
- Connolly T, Rapiejko PJ and Gilmore R (1991): Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* 252(5010): 1171-1173.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JLY, Toufighi K, Mostafavi S (2010): The Genetic Landscape of a Cell. *Science* 327(5964): 425-431.
- Coultas L and Strasser A (2003): The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 13(2): 115-123.
- Cross BCS, McKibbin C, Callan AC, Roboti P, Piacenti M, Rabu C, Wilson CM, Whitehead R, Flitsch SL, Pool MR (2009): Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 122(23): 4393-4400.
- Cross BCS, Sinning I, Luirink J and High S (2009): Delivering proteins for export from the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(4): 255-264.
- Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA and Hajnóczky G (2006): Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *Journal of Cell Biology* 174(7): 915-921.
- Csordás G, Várnai P, Golenár T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T and Hajnóczky G (2010): Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell* 39(1): 121-132.
- Davila S, Furu L, Gharavi AG, Tian X, Onoe T, Qian Q, Li A, Cai Y, Kamath PS, King BF (2004): Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nature Genetics* 36(6): 575-577.
- de Brito OM and Scorrano L (2010): An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO Journal* 29(16): 2715-2723.
- Demuro A, Mina E, Kayed R, Milton SC, Parker I and Glabe CG (2005): Calcium Dysregulation and Membrane Disruption as a Ubiquitous Neurotoxic Mechanism of Soluble Amyloid Oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 280(17): 17294-17300.
- Deng X, Wang Y, Zhou Y, Soboloff J and Gill DL (2009): STIM and Orai: Dynamic Intermembrane Coupling to Control Cellular Calcium Signals. *Journal of Biological Chemistry* 284(34): 22501-22505.
- Denmeade SR and Isaacs JT (2005): The SERCA pump as a therapeutic target: Making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy* 4(1): 14-22.
- Deshaies R and Schekman R (1989): SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 109(6, Pt. 1): 2653-2664.
- Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA and Schekman R (1991): Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349(6312): 806-808.
- Devaraneni PK, Conti B, Matsumura Y, Yang Z, Johnson AE and Skach WR (2011): Stepwise Insertion and Inversion of a Type II Signal Anchor Sequence in the Ribosome-Sec61 Translocon Complex. *Cell* 146(1): 134-147.
- Dill KA, Ozkan SB, Shell MS and Weikl TR (2008): The Protein Folding Problem. *Annual Review of Biophysics* 37(1): 289-316.

- Doudna JA and Rath VL (2002): Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome: The Next Frontier. *Cell* 109(2): 153-156.
- Driessen AJM and Nouwen N (2008): Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *Annual Review of Biochemistry* 77(1): 643-667.
- du Plessis DJF, Nouwen N and Driessen AJM (2011): The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(3): 851-865.
- Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L and Zimmermann R (2009): Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(9): 1556-1569.
- Dudek J, Greiner M, Müller A, Hendershot LM, Kopsch K, Nastainczyk W and Zimmermann R (2005): ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nature Structural & Molecular Biology* 12(11): 1008-1014.
- Dudek J, Volkmer J, Bies C, Guth S, Müller A, Lerner M, Feick P, Schäfer K-H, Morgenstern E, Hennessy F (2002): A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. *EMBO Journal* 21(12): 2958-2967.
- Dwyer JL (1993): *Electrophoretic Techniques of Analysis and Isolation*. 313-363.
- Edelmann L, Vecerdea A, Lipp P and Spohner D (2007): High Pressure Freezing and Freeze-Substitution of Cardiac Myocytes. *Microscopy and Microanalysis* 13(S3): 146-147.
- Egea PF, Shan SO, Napetschnig J, Savage DF, Walter P and Stroud RM (2004): Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* 427(6971): 215-221.
- Eilenberg H, Klinger E, Przedeki F and Shechter I (1989): Inactivation and activation of various membranous enzymes of the cholesterol biosynthetic pathway by digitonin. *Journal of Lipid Research* 30(8): 1127-1135.
- Elbashir SM (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836): 494-498.
- Erdmann F, Jung M, Eyrich S, Lang S, Helms V, Wagner R and Zimmermann R (2009): Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity. *FEBS Letters* 583(14): 2359-2364.
- Erdmann F, Schäuble N, Lang S, Jung M, Honigsmann A, Ahmad M, Dudek J, Benedix J, Harsman A, Kopp A (2011): Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca^{2+} leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 30(1): 17-31.
- Escauriaza MDd (2006): Zur Rolle von luminalen Proteinen und Membranproteinen des endoplasmatischen Retikulums bei der Biogenese sekretorischer Proteine. Homburg, Universität des Saarlandes, Dissertation.
- Favaloro V, Vilardi F, Schlecht R, Mayer MP and Dobberstein B (2010): Asna1/TRC40-mediated membrane insertion of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science* 123(9): 1522-1530.
- Fedeles SV, Tian X, Gallagher A-R, Mitobe M, Nishio S, Lee SH, Cai Y, Geng L, Crews CM and Somlo S (2011): A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nature Genetics* 43(7): 639-647.
- Feldheim D, Rothblatt J and Scheckman R (1992): Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. *Molecular and Cellular Biology* 12(7): 3288-3296.
- Feske S (2007): Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology* 7(9): 690-702.
- Fleischer B, Zambrano F and Fleischer S (1974): Biochemical characterization of the golgi complex of mammalian cells. *Journal of Supramolecular Structure* 2(5-6): 737-750.

- Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi Vy, Beck B, Skryma R and Prevarskaya N (2006): Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB Journal* 20(8): 1215-1217.
- Focia PJ, Shepotinovskaya IV, Seidler JA and Freymann DM (2004): Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science* 303(5656): 373-377.
- Fons RD, Bogert BA and Hegde RS (2003): Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *Journal of Cell Biology* 160(4): 529-539.
- Fourie AM, Sambrook JF and Gething MJ (1994): Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 269(48): 30470-30478.
- Freymann DM, Keenan RJ, Stroud RM and Walter P (1997): Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature* 385(6614): 361-364.
- Friedman JR and Voeltz GK (2011): The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends in Cell Biology* 21(12): 709-717.
- Gallego-Sandín S, Alonso MT and García-Sancho J (2011): Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress. *Biochemical Journal* 437(3): 469-475.
- Garrison JL, Kunkel EJ, Hegde RS and Taunton J (2005): A substrate-specific inhibitor of protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Nature* 436(7048): 285-289.
- Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119(3): 493-501.
- Geiger R, Andrichke D, Friebe S, Herzog F, Luisoni S, Heger T and Helenius A (2011): BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nature Cell Biology* 13(11): 1305-1314.
- Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJC, Hallett M (2006): Quantitative Proteomics Analysis of the Secretory Pathway. *Cell* 127(6): 1265-1281.
- Gilmore R, Blobel G and Walter P (1982a): Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *Journal of Cell Biology* 95(2): 463-469.
- Gilmore R, Walter P and Blobel G (1982b): Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *Journal of Cell Biology* 95(2): 470-477.
- Giunti R, Gamberucci A, Fulceri R, Banhegyi G and Benedetti A (2007): Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462(1): 115-121.
- Goder V, Crottet P and Spiess M (2000): In vivo kinetics of protein targeting to the endoplasmic reticulum determined by site-specific phosphorylation. *EMBO Journal* 19(24): 6704-6712.
- Görlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU and Rapoport TA (1992a): A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71(3): 489-503.
- Görlich D and Rapoport TA (1993): Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75(4): 615-630.
- Greene MK, Maskos K and Landry SJ (1998): Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(11): 6108-6113.

- Greiner M, Kreutzer B, Jung V, Grobholz R, Hasenfus A, Stöhr RF, Tornillo L, Dudek J, Stöckle M, Unteregger G (2011a): Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *International Journal of Cancer* 128(10): 2284-2295.
- Greiner M, Kreutzer B, Lang S, Jung V, Cavalie A, Unteregger G, Zimmermann R and Wullich B (2011b): Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *Prostate* 71(10): 1074-1083.
- Gruss OJ, Feick P, Frank R and Dobberstein B (1999): Phosphorylation of components of the ER translocation site. *European Journal of Biochemistry* 260(3): 785-793.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260(6): 3440-3450.
- Guerini D, Coletto L and Carafoli E (2005): Exporting calcium from cells. *Cell Calcium* 38(3-4): 281-289.
- Gumbart J, Chipot C and Schulten K (2011): Free-energy cost for translocon-assisted insertion of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(9): 3596-3601.
- Gumbart J and Schulten K (2006): Molecular Dynamics Studies of the Archaeal Translocon. *Biophysical journal* 90(7): 2356-2367.
- Gumbart J, Trabuco LG, Schreiner E, Villa E and Schulten K (2009): Regulation of the Protein-Conducting Channel by a Bound Ribosome. *Structure* 17(11): 1453-1464.
- Guth S, Volzing C, Muller A, Jung M and Zimmermann R (2004): Protein transport into canine pancreatic microsomes: a quantitative approach. *European Journal of Biochemistry* 271(15): 3200-3207.
- Haas IG and Wabl M (1983): Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306(5941): 387-389.
- Haigh NG and Johnson AE (2002): A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *Journal of Cell Biology* 156(2): 261-270.
- Halic M, Becker T, Pool MR, Spahn CM, Grassucci RA, Frank J and Beckmann R (2004): Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427(6977): 808-814.
- Halic M and Beckmann R (2005): The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Current Opinion in Structural Biology* 15(1): 116-125.
- Hamilton AJ and Baulcombe DC (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441): 950-952.
- Hamman BD, Chen J-C, Johnson EE and Johnson AE (1997): The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89(4): 535-544.
- Hamman BD, Hendershot LM and Johnson AE (1998): BiP Maintains the Permeability Barrier of the ER Membrane by Sealing the Luminal End of the Translocon Pore before and Early in Translocation. *Cell* 92(6): 747-758.
- Hammond C and Helenius A (1995): Quality control in the secretory pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 7(4): 523-529.
- Harsman A, Bartsch P, Hemmis B, Krüger V and And Wagner R (2011a): Exploring protein import pores of cellular organelles at the single molecule level using the planar lipid bilayer technique. *European Journal of Cell Biology* 90(9): 721-730.
- Harsman A, Kopp A, Wagner R, Zimmermann R and Jung M (2011c): Calmodulin regulation of the calcium-leak channel Sec61 is unique to vertebrates. *Channels* 5(4): 293-298.

- Harsman A, Krüger V, Bartsch P, Honigmann A, Schmidt O, Rao S, Meisinger C and Wagner R (2011b): Protein conducting nanopores. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22(45): 454102.
- Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Görlich D, Jentsch S and Rapoport TA (1994): Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367(6464): 654-657.
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G and Su T-P (2009): MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology* 19(2): 81-88.
- Hegde RS and Keenan RJ (2011): Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(12): 787-798.
- Heifetz A, Keenan, R. and Elbein, A. (1979): Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichyl-phosphate Glc-NAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry* 18(11): 2186-2192.
- Helmers J, Schmidt D, Glavy JS, Blobel G and Schwartz T (2003): The beta-subunit of the protein-conducting channel of the endoplasmic reticulum functions as the guanine nucleotide exchange factor for the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *Journal of Biological Chemistry* 278(26): 23686-23690.
- Hennessy F, Cheetham ME, Dirr HW and Blatch GL (2000): Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress Chaperones* 5(4): 347-358.
- Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME and Blatch GL (2005): Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Science* 14(7): 1697-1709.
- Heritage D and Wonderlin WF (2001): Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *Journal of Biological Chemistry* 276(25): 22655-22662.
- Hessa T, Sharma A, Mariappan M, Eshleman HD, Gutierrez E and Hegde RS (2011): Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* 475(7356): 394-397.
- Hewavitharana T, Deng X, Wang Y, Ritchie MF, Girish GV, Soboloff J and Gill DL (2008): Location and Function of STIM1 in the Activation of Ca²⁺ Entry Signals. *Journal of Biological Chemistry* 283(38): 26252-26262.
- High S (1995): Protein translocation at the membrane of the endoplasmic reticulum. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 63(2): 233-250.
- High S, Andersen SSL, Görlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA and Dobberstein B (1993): Sec61p is adjacent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion. *Journal of Cell Biology* 121(4): 743-750.
- Hori O, Miyazaki M, Tamatani T, Ozawa K, Takano K, Okabe M, Ikawa M, Hartmann E, Mai P, Stern DM (2006): Deletion of SERP1/RAMP4, a Component of the Endoplasmic Reticulum (ER) Translocation Sites, Leads to ER Stress. *Molecular and Cellular Biology* 26(11): 4257-4267.
- Hoseki J, Ushioda R and Nagata K (2009): Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Journal of Biochemistry* 147(1): 19-25.
- Hu CC, Dougan SK, Winter SV, Paton AW, Paton JC and Ploegh HL (2009): Subtilase cytotoxin cleaves newly synthesized BiP and blocks antibody secretion in B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 206(11): 2429-2440.
- Hurtley SM, Bole DG, Hoover-Litty H, Helenius A and Copeland CS (1989): Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *Journal of Cell Biology* 108(6): 2117-2126.
- Ito K, Date T and Wickner W (1980): Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. *Journal of Biological Chemistry* 255(5): 2123-2130.

- Ito K, Wittekind M, Nomura M, Shiba K, Yura T, Miura A and Nashimoto H (1983): A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell* 32(3): 789-797.
- Jaepel J and Blum R (2011): Capturing ER calcium dynamics. *European Journal of Cell Biology* 90(8): 613-619.
- Jaiswal JK (2001): Calcium - how and why? *Journal of Biosciences* 26(3): 357-363.
- Janda CY, Li J, Oubridge C, Hernandez H, Robinson CV and Nagai K (2010): Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* 465(7297): 507-510.
- Jensen CG and Pedersen S (1994): Concentrations of 4.5S RNA and Ffh protein in *Escherichia coli*: the stability of Ffh protein is dependent on the concentration of 4.5S RNA. *Journal of Bacteriology* 176(23): 7148-7154.
- Jermey AJ, Willer M, Davis E, Wilkinson BM and Stirling CJ (2006): The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *Journal of Biological Chemistry* 281(12): 7899-7906.
- Jiang J, Maes EG, Taylor AB, Wang L, Hinck AP, Lafer EM and Sousa R (2007): Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Molecular Cell* 28(3): 422-433.
- Jinek M and Doudna JA (2009): A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457(7228): 405-412.
- John LM, Lechleiter JD and Camacho P (1998): Differential Modulation of SERCA2 Isoforms by Calreticulin. *Journal of Cell Biology* 142(4): 963-973.
- Johnson AE (2003): Maintaining the permeability barrier during protein trafficking at the endoplasmic reticulum membrane. *Biochemical Society Transactions* 31(6): 1227-1231.
- Johnson AE (2009): The structural and functional coupling of two molecular machines, the ribosome and the translocon. *Journal of Cell Biology* 185(5): 765-767.
- Jung V, Kindlich R, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz W, Engers R, Unteregger G, Stöckle M, Zimmermann R (2006): Genomic and Expression Analysis of the 3q25-q26 Amplification Unit Reveals TLOC1/SEC62 as a Probable Target Gene in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Research* 4(3): 169-176.
- Jungnickel B and Rapoport TA (1995): A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 82(2): 261-270.
- Junne T, Schwede T, Goder V and Spiess M (2007): Mutations in the Sec61p Channel Affecting Signal Sequence Recognition and Membrane Protein Topology. *Journal of Biological Chemistry* 282(45): 33201-33209.
- Kalbfleisch T, Cambon A and Wattenberg BW (2007): A Bioinformatics Approach to Identifying Tail-Anchored Proteins in the Human Genome. *Traffic* 8(12): 1687-1694.
- Kalies K-U, Rapoport TA and Hartmann E (1998): The beta-Subunit of the Sec61 Complex Facilitates Cotranslational Protein Transport and Interacts with the Signal Peptidase during Translocation. *Journal of Cell Biology* 141(4): 887-894.
- Kamariah N, Eisenhaber F, Adhikari S, Eisenhaber B and Gruber G (2011): Purification and crystallization of yeast glycosylphosphatidylinositol transamidase subunit PIG-S (PIG-S71-467). *Acta Crystallographica Section F* 67(8): 896-899.
- Kampinga HH and Craig EA (2010): The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(8): 579-592.
- Kang S-W, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Taunton J and Hegde RS (2006): Substrate-Specific Translocational Attenuation during ER Stress Defines a Pre-Emptive Quality Control Pathway. *Cell* 127(5): 999-1013.
- Kanuka H, Hiratou T, Igaki T, Kanda H, Kuranaga E, Sawamoto K, Aigaki T, Okano H and Miura M (2005): Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61alpha translocon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1726(3): 225-237.

- Kapp K, Schrempf, S., Lemberg, M. and Dobberstein, B. (2009): Post-Targeting Functions of Signal Peptides. Protein transport into the Endoplasmic Reticulum. R. Zimmermann, Landes Bioscience: 1-16.
- Karlin S and Brocchieri L (1998): Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *Journal of Molecular Evolution* 47(5): 565-577.
- Kato Y, Nishiyama K-i and Tokuda H (2003): Depletion of SecDF-YajC causes a decrease in the level of SecE: implication for their functional interaction. *FEBS Letters* 550(1-3): 114-118.
- Kaufman RJ (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Development* 13(10): 1211-1233.
- Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM and Walter P (2001): The Signal Recognition Particle. *Annual Review of Biochemistry* 70(1): 755-775.
- Kelleher DJ and Gilmore R (2006): An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16(4): 47R-62R.
- Kihara A, Akiyama Y and Ito K (1995): FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(10): 4532-4536.
- Kim SJ, Mitra D, Salerno JR and Hegde RS (2002): Signal Sequences Control Gating of the Protein Translocation Channel in a Substrate-Specific Manner. *Developmental Cell* 2(2): 207-217.
- Kinch LN, Saier JMH and Grishin NV (2002): Sec61beta - a component of the archaeal protein secretory system. *Trends in Biochemical Sciences* 27(4): 170-171.
- Knittler MR, Dirks S and Haas IG (1995): Molecular chaperones involved in the protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(5): 1764-1768.
- Knittler MR and Haas IG (1992): Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO Journal* 11(4): 1573-1581.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST and van Oers MH (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84(5): 1415-1420.
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS and Walter P (2009): An ER-Mitochondria Tethering Complex Revealed by a Synthetic Biology Screen. *Science* 325(5939): 477-481.
- Krieg PA and Melton DA (1984): Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Research* 12(18): 7057-7070.
- Kroczyńska B, Evangelista CM, Samant SS, Elguindi EC and Blond SY (2004): The SANT2 domain of the murine tumor cell DnaJ-like protein 1 human homologue interacts with alpha1-antichymotrypsin and kinetically interferes with its serpin inhibitory activity. *Journal of Biological Chemistry* 279(12): 11432-11443.
- Kumar DP, Vorvis C, Sarbeng EB, Cabra Ledesma VC, Willis JE and Liu Q (2011): The Four Hydrophobic Residues on the Hsp70 Inter-Domain Linker Have Two Distinct Roles. *Journal of Molecular Biology* 411(5): 1099-1113.
- Kurdi-Haidar B, Aebi S, Heath D, Enns RE, Naredi P, Hom DK and Howell SB (1996): Isolation of the ATP-Binding Human Homolog of the *arsA* Component of the Bacterial Arsenite Transporter. *Genomics* 36(3): 486-491.
- Kurdi-Haidar B, Heath D, Aebi S and Howell SB (1998): Biochemical Characterization of the Human Arsenite-stimulated ATPase (hASNA-I). *Journal of Biological Chemistry* 273(35): 22173-22176.

- Kutay U, Ahnert-Hilger G, Hartmann E, Wiedenmann B and Rapoport TA (1995): Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO Journal* 14(2): 217-223.
- Kutay U, Hartmann E and Rapoport TA (1993): A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends in Cell Biology* 3(3): 72-75.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakkaraju AK, Mary C, Scherrer A, Johnson AE and Strub K (2008): SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. *Cell* 133(3): 440-451.
- Lakkaraju AKK, Luyet P-P, Parone P, Falguières T and Strub K (2007): Inefficient targeting to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle elicits selective defects in post-ER membrane trafficking. *Experimental Cell Research* 313(4): 834-847.
- Lass A, Kujawa M, McConnell E, Paton AW, Paton JC and Wójcik C (2008): Decreased ER-associated degradation of α -TCR induced by Grp78 depletion with the SubAB cytotoxin. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(12): 2865-2879.
- Le Gall S, Neuhofer A and Rapoport T (2004): The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules. *Molecular Biology of the Cell* 15(2): 447-455.
- Lee AS (2001): The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in Biochemical Sciences* 26(8): 504-510.
- Legate KR, Falcone D and Andrews DW (2000): Nucleotide-dependent binding of the GTPase domain of the signal recognition particle receptor beta-subunit to the alpha-subunit. *Journal of Biological Chemistry* 275(35): 27439-27446.
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV and Aravind L (2002): Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *Journal of Molecular Biology* 317(1): 41-72.
- Lemberg MK and Martoglio B (2002): Requirements for Signal Peptide Peptidase-Catalyzed Intramembrane Proteolysis. *Molecular Cell* 10(4): 735-744.
- Lemberg MK and Martoglio B (2004): On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS Letters* 564(3): 213-218.
- Leznicki P, Clancy A, Schwappach B and High S (2010): Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *Journal of Cell Science* 123(13): 2170-2178.
- Li W, Schulman S, Boyd D, Erlandson K, Beckwith J and Rapoport TA (2007): The Plug Domain of the SecY Protein Stabilizes the Closed State of the Translocation Channel and Maintains a Membrane Seal. *Molecular Cell* 26(4): 511-521.
- Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L and Meldolesi J (1997): BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry* 272(49): 30873-30879.
- Linxweiler M, Linxweiler J, Barth M, Benedix J, Jung V, Kim Y, Bohle RM, Zimmermann R and Greiner M (2012): Sec62 Bridges the Gap from 3q Amplification to Molecular Cell Biology in Non-Small Cell Lung Cancer. *American Journal of Pathology* 180(2): 473-483.
- Liu Y, Law BK and Luesch H (2009): Apratoxin A Reversibly Inhibits the Secretory Pathway by Preventing Cotranslational Translocation. *Molecular Pharmacology* 76(1): 91-104.
- Liu Y, Schirra C, Edelmann L, Matti U, Rhee J, Hof D, Bruns D, Brose N, Rieger H, Stevens DR (2010): Two distinct secretory vesicle-priming steps in adrenal chromaffin cells. *Journal of Cell Biology* 190(6): 1067-1077.
- Lloyd DJ, Wheeler MC and Gekakis N (2010): A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* 59(2): 460-470.

- Lomax RB, Camello C, Van Coppenolle F, Petersen OH and Tepikin AV (2002): Basal and Physiological Ca²⁺ Leak from the Endoplasmic Reticulum of Pancreatic Acinar Cells. *Journal of Biological Chemistry* 277(29): 26479-26485.
- Lu Z, Zhou L, Killela P, Rasheed AB, Di C, Poe WE, McLendon RE, Bigner DD, Nicchitta C and Yan H (2009): Glioblastoma Proto-oncogene SEC61gamma Is Required for Tumor Cell Survival and Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Research* 69(23): 9105-9111.
- Luik RM, Wu MM, Buchanan J and Lewis RS (2006): The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *Journal of Cell Biology* 174(6): 815-825.
- Lur G, Haynes LP, Prior IA, Gerasimenko OV, Feske S, Petersen OH, Burgoyne RD and Tepikin AV (2009): Ribosome-free Terminals of Rough ER Allow Formation of STIM1 Puncta and Segregation of STIM1 from IP3 Receptors. *Current Biology* 19(19): 1648-1653.
- Lyko F, Martoglio B, Jungnickel B, Rapoport TA and Dobberstein B (1995): Signal sequence processing in rough microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 270(34): 19873-19878.
- Lyman SK and Schekman R (1996): Polypeptide translocation machinery of the yeast endoplasmic reticulum. *Experientia* 52(12): 1042-1049.
- Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJ and Thomas DY (2010): Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21(5): 500-511.
- Machamer CE, Doms RW, Bole DG, Helenius A and Rose JK (1990): Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of Biological Chemistry* 265(12): 6879-6883.
- Mandon EC, Trueman SF and Gilmore R (2009): Translocation of proteins through the Sec61 and SecYEG channels. *Current Opinion in Cell Biology* 21(4): 501-507.
- Marcinowski M, Höller M, Feige MJ, Baerend D, Lamb DC and Buchner J (2011): Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions. *Nature Structural & Molecular Biology* 18(2): 150-158.
- Mariappan M, Li X, Stefanovic S, Sharma A, Mateja A, Keenan RJ and Hegde RS (2010): A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466(7310): 1120-1124.
- Mariappan M, Mateja A, Dobosz M, Bove E, Hegde RS and Keenan RJ (2011): The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. *Nature* 477(7362): 61-66.
- Martin SE and Caplen NJ (2007): Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 8(1): 81-108.
- Martoglio B and Dobberstein B (1998): Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology* 8(10): 410-415.
- Martoglio B, Graf R and Dobberstein B (1997): Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *EMBO Journal* 16(22): 6636-6645.
- Martoglio B, Hofmann MW, Brunner J and Dobberstein B (1995): The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell* 81(2): 207-214.
- Mateja A, Szlachcic A, Downing ME, Dobosz M, Mariappan M, Hegde RS and Keenan RJ (2009): The structural basis of tail-anchored membrane protein recognition by Get3. *Nature* 461(7262): 361-366.
- Matlack KES, Misselwitz B, Plath K and Rapoport TA (1999): BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-a factor across the ER membrane. *Cell* 97(5): 553-564.

- Matlack KES, Mothes W and Rapoport TA (1998): Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92(3): 381-390.
- Mayer MP and Bukau B (2005): Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(6): 670-684.
- Mechler B and Vassalli P (1975): Membrane-bound ribosomes of myeloma cells. III. The role of the messenger RNA and the nascent polypeptide chain in the binding of ribosomes to membranes. *Journal of Cell Biology* 67(1): 25-37.
- Meldolesi J and Pozzan T (1998): The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in Biochemical Sciences* 23(1): 10-14.
- Ménétret JF, Hegde RS, Aguiar M, Gygi SP, Park E, Rapoport TA and Akey CW (2008): Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure* 16(7): 1126-1137.
- Meyer H-A, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehn S, Kalies K-U and Hartmann E (2000): Mammalian Sec61 Is Associated with Sec62 and Sec63. *Journal of Biological Chemistry* 275(19): 14550-14557.
- Michalak M, Robert Parker JM and Opas M (2002): Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32(5-6): 269-278.
- Miller JD, Tajima S, Lauffer L and Walter P (1995): The β subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the α subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology* 128(3): 273-282.
- Milner RE, Baksh S, Shemanko C, Carpenter MR, Smillie L, Vance JE, Opas M and Michalak M (1991): Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 266(11): 7155-7165.
- Mizuta K and Warner JR (1994): Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Molecular and Cellular Biology* 14(4): 2493-2502.
- Moazed D (2009): Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457(7228): 413-420.
- Moran U, Phillips R and Milo R (2010): SnapShot: Key Numbers in Biology. *Cell* 141(7): 1262.
- Mori K (2009): Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *Journal of Biochemistry* 146(6): 743-750.
- Morrow MW and Brodsky JL (2001): Yeast ribosomes bind to highly purified reconstituted Sec61p complex and to mammalian p180. *Traffic* 2(10): 705-716.
- Mothes W, Jungnickel B, Brunner J and Rapoport TA (1998): Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology* 142(2): 355-364.
- Mothes W, Prehn S and Rapoport TA (1994): Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO Journal* 13(17): 3973-3982.
- Mueckler M and Lodish HF (1986): Post-translational insertion of a fragment of the glucose transporter into microsomes requires phosphoanhydride bond cleavage. *Nature* 322(6079): 549-552.
- Mukhopadhyay R, Ho Y-S, Swiatek PJ, Rosen BP and Bhattacharjee H (2006): Targeted disruption of the mouse *Asn1* gene results in embryonic lethality. *FEBS Letters* 580(16): 3889-3894.
- Müller G and Zimmermann R (1987): Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO Journal* 6(7): 2099-2107.

- Müller L, Diaz de Escauriaza M, Lajoie P, Theis M, Jung M, Müller A, Burgard C, Greiner M, Snapp EL, Dudek J (2010): Evolutionary Gain of Function for the ER Membrane Protein Sec62 from Yeast to Humans. *Molecular Biology of the Cell* 21(5): 691-703.
- Müller L, Funato Y, Miki H and Zimmermann R (2011): An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease. *FEBS Letters* 585(4): 596-600.
- Munro S and Pelham HRB (1986): An hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46(2): 291-300.
- Mutka SC and Walter P (2001): Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Molecular Biology of the Cell* 12(3): 577-588.
- Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Müller-Esterl W (2001): Functional specialization of calreticulin domains. *Journal of Cell Biology* 154(5): 961-972.
- Ng DT, Brown JD and Walter P (1996): Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology* 134(2): 269-278.
- Ni M and Lee AS (2007): ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Letters* 581(19): 3641-3651.
- Niggli E (1999): Localized intracellular calcium signals in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annual Review of Physiology* 61(1): 311-335.
- Nikonov AV, Hauri H-P, Lauring B and Kreibich G (2007): Climp-63-mediated binding of microtubules to the ER affects the lateral mobility of translocon complexes. *Journal of Cell Science* 120(13): 2248-2258.
- Nikonov AV, Snapp E, Lippincott-Schwartz J and Kreibich G (2002): Active translocon complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 158(3): 497-506.
- Nilsson I, Kelleher DJ, Miao Y, Shao Y, Kreibich G, Gilmore R, von Heijne G and Johnson AE (2003): Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *Journal of Cell Biology* 161(4): 715-725.
- Nilsson I, Ohvo-Rekila H, Slotte JP, Johnson AE and von Heijne G (2001): Inhibition of Protein Translocation across the Endoplasmic Reticulum Membrane by Sterols. *Journal of Biological Chemistry* 276(45): 41748-41754.
- Nishiyama K-i, Hanada M and Tokuda H (1994): Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO Journal* 13(14): 3272-3277.
- Ohishi K, Nagamune K, Maeda Y and Kinoshita T (2003): Two Subunits of Glycosylphosphatidylinositol Transamidase, GPI8 and PIG-T, Form a Functionally Important Intermolecular Disulfide Bridge. *Journal of Biological Chemistry* 278(16): 13959-13967.
- Ong HL, Liu X, Sharma A, Hegde RS and Ambudkar IS (2007): Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflügers Arch* 453(6): 797-808.
- Otero JH, Lizak B and Hendershot LM (2010): Life and death of a BiP substrate. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21(5): 472-478.
- Ou WJ, Thomas DY, Bell AW and Bergeron JJ (1992): Casein kinase II phosphorylation of signal sequence receptor alpha and the associated membrane chaperone calnexin. *Journal of Biological Chemistry* 267(33): 23789-23796.
- Paetzel M, Karla A, Strynadka NCJ and Dalbey RE (2002): Signal Peptidases. *Chemical Reviews* 102(12): 4549-4580.

- Palmer AE and Tsien RY (2006): Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nature Protocols* 1(3): 1057-1065.
- Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S and Rapoport TA (1995): Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81(4): 561-570.
- Papp S, Dziak E, Michalak M and Opas M (2003): Is all of the endoplasmic reticulum created equal? The effects of the heterogeneous distribution of endoplasmic reticulum Ca²⁺-handling proteins. *Journal of Cell Biology* 160(4): 475-479.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W and Lechleiter JD (2008): Chemical calcium indicators. *Methods* 46(3): 143-151.
- Park E and Rapoport TA (2012): Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes. *Annual Review of Biophysics* 41(1): advance online publication.
- Park M, Tepikin A and Petersen O (2002): What can we learn about cell signalling by combining optical imaging and patch clamp techniques? *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 444(3): 305-316.
- Parker JS, Roe SM and Barford D (2005): Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434(7033): 663-666.
- Paton AW, Beddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MC, Rossjohn J, Talbot UM and Paton JC (2006): AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* 443(7111): 548-552.
- Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H and Paton JC (2004): A New Family of Potent AB5 Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Medicine* 200(1): 35-46.
- Perara E, Rothman RE and Lingappa VR (1986): Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. *Science* 232(4748): 348-352.
- Periasamy M and Kalyanasundaram A (2007): SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle & Nerve* 35(4): 430-442.
- Pezzati R, Bossi M, Podini P, Meldolesi J and Grohovaz F (1997): High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell* 8(8): 1501-1512.
- Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ and Rapoport TA (1998): Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94(6): 795-807.
- Plath K, Wilkinson BM, Stirling CJ and Rapoport TA (2004): Interactions between Sec Complex and Prepro- α -Factor during Posttranslational Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 15(1): 1-10.
- Plempner RK, Böhmeler S, Bordallo J, Sommer T and Wolf DH (1997): Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde transport for ER degradation. *Nature* 388(6645): 891-895.
- Pomorski T, Hrafnadóttir S, Devaux PF and Meer Gv (2001): Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12(2): 139-148.
- Pool MR (2009): A trans-membrane segment inside the ribosome exit tunnel triggers RAMP4 recruitment to the Sec61p translocase. *Journal of Cell Biology* 185(5): 889-902.
- Potter MD and Nicchitta CV (2000): Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry* 275(43): 33828-33835.
- Potter MD and Nicchitta CV (2002): Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 277(26): 23314-23320.

- Potter MD, Seiser RM and Nicchitta CV (2001): Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends in Cell Biology* 11(3): 112-115.
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW and Balch WE (2009): Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry* 78(1): 959-991.
- Pressman S, Bei Y and Carthew R (2007): SnapShot: Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 130(3): 570.
- Prinz A, Behrens C, Rapoport TA, Hartmann E and Kalies K-U (2000): Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO Journal* 19(8): 1900-1906.
- Puhka M, Vihinen H, Joensuu M and Jokitalo E (2007): Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 179(5): 895-909.
- Qian YQ, Patel D, Hartl F-U and McColl DJ (1996): Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *Journal of Molecular Biology* 260: 224-235.
- Rabu C, Schmid V, Schwappach B and High S (2009): Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *Journal of Cell Science* 122(20): 3605-3612.
- Rabu C, Wipf P, Brodsky JL and High S (2008): A Precursor-specific Role for Hsp40/Hsc70 during Tail-anchored Protein Integration at the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 283(41): 27504-27513.
- Raden D, Song W and Gilmore R (2000): Role of the cytoplasmic segments of Sec61a in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *Journal of Cell Biology* 150(1): 53-64.
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE and Ellerby HM (2002): Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program. *Journal of Biological Chemistry* 277(24): 21836-21842.
- Rapoport TA, Jungnickel B and Kutay U (1996): Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annual Review of Biochemistry* 65(1): 271-303.
- Raue U, Oellerer S and Rospert S (2007): Association of Protein Biogenesis Factors at the Yeast Ribosomal Tunnel Exit Is Affected by the Translational Status and Nascent Polypeptide Sequence. *Journal of Biological Chemistry* 282(11): 7809-7816.
- Reiling JH, Clish CB, Carette JE, Varadarajan M, Brummelkamp TR and Sabatini DM (2011): A haploid genetic screen identifies the major facilitator domain containing 2A (MFSD2A) transporter as a key mediator in the response to tunicamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(29): 11756-11765.
- Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R (2009): Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787(11): 1342-1351.
- Rizzuto R and Pozzan T (2006): Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews* 86(1): 369-408.
- Robert V, De Giorgi F, Massimino ML, Cantini M and Pozzan T (1998): Direct Monitoring of the Calcium Concentration in the Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle Myotubes. *Journal of Biological Chemistry* 273(46): 30372-30378.
- Robinson C and Bolhuis A (2001): Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(5): 350-356.
- Robinson C and Bolhuis A (2004): Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694(1-3): 135-147.
- Ron D and Walter P (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(7): 519-529.

- Roy A and Wonderlin WF (2003): The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 278(7): 4397-4403.
- Sadlish H, Pitonzo D, Johnson AE and Skach WR (2005): Sequential triage of transmembrane segments by Sec61alpha during biogenesis of a native multispanning membrane protein. *Nature Structural & Molecular Biology* 12(10): 870-878.
- Saier MH, Jr. (2000): A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(2): 354-411.
- Sammels E, Parys JB, Missiaen L, De Smedt H and Bultynck G (2010): Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium* 47(4): 297-314.
- Saparov SM, Erlandson K, Cannon K, Schaletzky J, Schulman S, Rapoport TA and Pohl P (2007): Determining the Conductance of the SecY Protein Translocation Channel for Small Molecules. *Molecular Cell* 26(4): 501-509.
- Savitz AJ and Meyer DI (1990): Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. *Nature* 346(6284): 540-544.
- Savitz AJ and Meyer DI (1993): 180-kD ribosome receptor is essential for both ribosome binding and protein translocation. *Journal of Cell Biology* 120(4): 853-863.
- Schäfer A and Wolf DH (2009): Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *EMBO Journal* 28(19): 2874-2884.
- Schaletzky J and Rapoport TA (2006): Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Molecular Biology of the Cell* 17(9): 3860-3869.
- Schlenstedt G, Gudmundsson GH, Boman HG and Zimmermann R (1990): A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and posttranslationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 265(23): 13960-13968.
- Schlenstedt G, Gudmundsson GH, Boman HG and Zimmermann R (1992): Structural requirements for transport of preprocecropin A and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *Journal of Biological Chemistry* 267(34): 24328-24332.
- Schlenstedt G, Zimmermann M and Zimmermann R (1994): A stably folded presecretory protein associates with and upon unfolding translocates across the membrane of mammalian microsomes. *FEBS Letters* 340(1-2): 139-144.
- Schlenstedt G and Zimmermann R (1987): Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO Journal* 6(3): 699-703.
- Schröder M and Kaufman RJ (2005): The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry* 74(1): 739-789.
- Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B, Boone C, Greenblatt JF (2005): Exploration of the Function and Organization of the Yeast Early Secretory Pathway through an Epistatic Miniarray Profile. *Cell* 123(3): 507-519.
- Schwartz T and Blobel G (2003): Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell* 112(6): 793-803.
- Senderek J, Krieger M, Stendel C, Bergmann C, Moser M, Breitbach-Faller N, Rudnik-Schoneborn S, Blaschek A, Wolf NI, Harting I (2005): Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nature Genetics* 37(12): 1312-1314.
- Setoguchi K, Otera H and Mihara K (2006): Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO Journal* 25(24): 5635-5647.

- Shannon TR, Ginsburg KS and Bers DM (2000): Reverse Mode of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump and Load-Dependent Cytosolic Calcium Decline in Voltage-Clamped Cardiac Ventricular Myocytes. *Biophysical journal* 78(1): 322-333.
- Shao S and Hegde RS (2011a): Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27(1): 25-56.
- Shao S and Hegde RS (2011b): A Calmodulin-Dependent Translocation Pathway for Small Secretory Proteins. *Cell* 147(7): 1576-1588.
- Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA, Palazzo AF, Kozlov MM and Rapoport TA (2010): Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* 143(5): 774-788.
- Shibata Y, Voeltz GK and Rapoport TA (2006): Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell* 126(3): 435-439.
- Siomi H and Siomi MC (2009): On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457(7228): 396-404.
- Skach WR (2009): Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nature Structural & Molecular Biology* 16(16): 606-612.
- Skowronek MH, Rotter M and Haas IG (1999): Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biological Chemistry* 380(9): 1133-1138.
- Smock RG, Rivoire O, Russ WP, Swain JF, Leibler S, Ranganathan R and Gierasch LM (2010): An interdomain sector mediating allostery in Hsp70 molecular chaperones. *Molecular Systems Biology* 6(1).
- Snapp E, Reinhart G, Bogert B, Lippincott-Schwartz J and Hegde R (2004): The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 164(7): 997-1007.
- Soll J and Schleiff E (2004): Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(3): 198-208.
- Song W, Raden D, Mandon EC and Gilmore R (2000): Role of Sec61a in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. *Cell* 100(3): 333-343.
- Spiller MP and Stirling CJ (2011): Preferential Targeting of a Signal Recognition Particle-dependent Precursor to the Ssh1p Translocon in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* 286(25): 21953-21960.
- Stefanovic S and Hegde RS (2007): Identification of a Targeting Factor for Posttranslational Membrane Protein Insertion into the ER. *Cell* 128(6): 1147-1159.
- Stefer S, Reitz S, Wang F, Wild K, Pang Y-Y, Schwarz D, Bomke J, Hein C, Löhr F, Bernhard F (2011): Structural Basis for Tail-Anchored Membrane Protein Biogenesis by the Get3-Receptor Complex. *Science* 333(6043): 758-762.
- Stephens SB, Dodd RD, Brewer JW, Lager PJ, Keene JD and Nicchitta CV (2005): Stable ribosome binding to the endoplasmic reticulum enables compartment-specific regulation of mRNA translation. *Molecular Biology of the Cell* 16(12): 5819-5831.
- Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R and Schekman R (1992): Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 3: 129-142.
- Suh W-C, Burkholder WF, Lu CZ, Zhao X, Gottesman ME and Gross CA (1998): Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(26): 15223-15228.
- Suh W-C, Lu CZ and Gross CA (1999): Structural features required for the interaction of the hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *Journal of Biological Chemistry* 274(43): 30534-30539.
- Tajima S, Lauffer L, Rath VL and Walter P (1986): The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *Journal of Cell Biology* 103(4): 1167-1178.

- Tamborero S, Vilar M, Martinez-Gil L, Johnson AE and Mingarro I (2011): Membrane Insertion and Topology of the Translocating Chain-Associating Membrane Protein (TRAM). *Journal of Molecular Biology* 406(4): 571-582.
- Targos R, Baranska J and Pomorski P (2005): Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochimica Polonica* 52(2): 397-409.
- Terzi L, Pool MR, Dobberstein B and Strub K (2003): Signal Recognition Particle Alu Domain Occupies a Defined Site at the Ribosomal Subunit Interface upon Signal Sequence Recognition. *Biochemistry* 43(1): 107-117.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR and Dawson AP (1990): Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(7): 2466-2470.
- Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drøbak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB and Hanley MR (1994): Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Inflammation Research* 43(3): 187-193.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H and Ogawa H (2000): Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405(6787): 647-655.
- Toyoshima C and Nomura H (2002): Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418(6898): 605-611.
- Trueman SF, Mandon EC and Gilmore R (2011): Translocation channel gating kinetics balances protein translocation efficiency with signal sequence recognition fidelity. *Molecular Biology of the Cell* 22(17): 2983-2993.
- Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee S-F, Hao Y-H, Serneels L, De Strooper B, Yu G and Bezprozvanny I (2006): Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations. *Cell* 126(5): 981-993.
- Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, Haas IG, Heim N, Nastainczyk W, Volkmer J and Zimmermann R (2000): Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(13): 7214-7219.
- Tyedmers J, Lerner M, Wiedmann M, Volkmer J and Zimmermann R (2003): Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Reports* 4(5): 505-510.
- Tyson JR and Stirling CJ (2000): LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 19(23): 6440-6452.
- Ueno T, Kaneko K, Sata T, Hattori S and Ogawa-Goto K (2011): Regulation of polysome assembly on the endoplasmic reticulum by a coiled-coil protein, p180. *Nucleic Acids Research*: advance online publication.
- Ueno T, Tanaka K, Kaneko K, Taga Y, Sata T, Irie S, Hattori S and Ogawa-Goto K (2010): Enhancement of Procollagen Biosynthesis by p180 through Augmented Ribosome Association on the Endoplasmic Reticulum in Response to Stimulated Secretion. *Journal of Biological Chemistry* 285(39): 29941-29950.
- van Anken E, Romijn EP, Maggioni C, Mezghrani A, Sitia R, Braakman I and Heck AJR (2003): Sequential Waves of Functionally Related Proteins Are Expressed When B Cells Prepare for Antibody Secretion. *Immunity* 18(2): 243-253.
- Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E and Prevarskaya N (2004): Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *Journal of Cell Science* 117(18): 4135-4142.
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC and Rapoport TA (2004): X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427(6969): 36-44.

- van der Werf S, Bradley J, Wimmer E, Studier FW and Dunn JJ (1986): Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(8): 2330-2334.
- Vandecaetsbeek I, Trekels M, De Maeyer M, Ceulemans H, Lescrinier E, Raeymaekers L, Wuytack F and Vangheluwe P (2009): Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(44): 18533-18538.
- Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R and Prevarskaya N (2006): Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *Journal of Cell Biology* 174(4): 535-546.
- Vasil I (2008): A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27(9): 1423-1440.
- Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma H-T and Gill DL (2002): The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biology* 4(11): E263-E272.
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R (2006): CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science* 312(5777): 1220-1223.
- Vilardi F, Lorenz H and Dobberstein B (2011): WRB is the receptor for TRC40/Asn1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Journal of Cell Science* 124(8): 1301-1307.
- Voeltz G, Rolls M and Rapoport T (2002): Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports* 3(10): 944-950.
- Voigt S, Jungnickel B, Hartmann E and Rapoport TA (1996): Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Cell Biology* 134(1): 25-35.
- von Heijne G (1983): Patterns of Amino Acids near Signal-Sequence Cleavage Sites. *European Journal of Biochemistry* 133(1): 17-21.
- von Heijne G (1985): Signal sequences: The limits of variation. *Journal of Molecular Biology* 184(1): 99-105.
- von Heijne G (1986): Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *Journal of Molecular Biology* 189(1): 239-242.
- Voss NR, Gerstein M, Steitz TA and Moore PB (2006): The Geometry of the Ribosomal Polypeptide Exit Tunnel. *Journal of Molecular Biology* 360(4): 893-906.
- Walter P and Blobel G (1981): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory proteins. *Journal of Cell Biology* 91(2): 551-565.
- Walter P and Blobel G (1982): Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299(5885): 691-698.
- Walter P and Blobel G (1983): Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods in Enzymology* 96(1): 84-93.
- Walter P, Ibrahimi I and Blobel G (1981): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *Journal of Cell Biology* 91(2): 545-550.
- Walter P and Ron D (2011): The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334(6059): 1081-1086.
- Wang F, Brown EC, Mak G, Zhuang J and Denic V (2010): A chaperone cascade sorts proteins for posttranslational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell* 40(1): 159-171.

- Wang H, Paton JC and Paton AW (2007): Pathologic Changes in Mice Induced by Subtilase Cytotoxin, a Potent New Escherichia coli AB5 Toxin That Targets the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Infectious Diseases* 196(7): 1093-1101.
- Wang L and Dobberstein B (1999): Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 457(3): 316-322.
- Wang X and Ward RE (2010): Sec61 α is required for dorsal closure during Drosophila embryogenesis through its regulation of Dpp signaling. *Developmental Dynamics* 239(3): 784-797.
- Wati S, Soo ML, Zilm P, Li P, Paton AW, Burrell CJ, Beard M and Carr JM (2009): Dengue Virus Infection Induces Upregulation of GRP78, Which Acts To Chaperone Viral Antigen Production. *Journal of Virology* 83(24): 12871-12880.
- Watts C, Wickner W and 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* 80(10): 2809-2813.
- Weber K and Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 244(16): 4406-4412.
- Weitzmann A, Baldes C, Dudek J and Zimmermann R (2007): The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *FEBS Journal* 274(19): 5175-5187.
- Weitzmann A, Volkmer J and Zimmermann R (2006): The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sil1 function in man and mouse. *FEBS Letters* 580(22): 5237-5240.
- White SH and von Heijne G (2008): How Translocons Select Transmembrane Helices. *Annual Review of Biophysics* 37(1): 23-42.
- Wiech H, Sagstetter M, Müller G and Zimmermann R (1987): The ATP requiring step in assembly of M13 procoat protein into microsomes is related to preservation of transport competence of the precursor protein. *EMBO Journal* 6(4): 1011-1016.
- Wilkinson B and Stirling CJ (2009): Sec Complexes in the Yeast ER. Protein transport into the Endoplasmic Reticulum. R. Zimmermann, Landes Bioscience: 55-64.
- Willer M, Jermy A, Steel G, Garside H, S. C and Stirling C (2003): An in vitro assay using overexpressed yeast SRP demonstrates that cotranslational translocation is dependent upon the J-domain of Sec63p. *Biochemistry* 42(23): 7171-7177.
- Williams EJB, Pal C and Hurst LD (2000): The molecular evolution of signal peptides. *Gene* 253(2): 313-322.
- Wilson CM and High S (2007): Ribophorin I acts as a substrate-specific facilitator of N-glycosylation. *Journal of Cell Science* 120(Pt 4): 648-657.
- Wilson R, Allen AJ, Oliver J, Brookman JL, High S and Bulleid NJ (1995): The translocation, folding, assembly and redox-dependent degradation of secretory and membrane proteins in semi-permeabilized mammalian cells. *Biochemical Journal* 307(3): 679-687.
- Wirth A, Jung M, Bies C, Frien M, Tyedmers J, Zimmermann R and Wagner R (2003): The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Molecular Cell* 12(1): 261-268.
- Wittke S, Dunnwald M and Johnsson N (2000): Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Molecular Biology of the Cell* 11(11): 3859-3871.
- Wolfson JJ, May KL, Thorpe CM, Jandhyala DM, Paton JC and Paton AW (2008): Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways. *Cellular Microbiology* 10(9): 1775-1786.

- Yabal M, Brambillasca S, Soffientini P, Pedrazzini E, Borgese N and Makarow M (2003): Translocation of the C Terminus of a Tail-anchored Protein across the Endoplasmic Reticulum Membrane in Yeast Mutants Defective in Signal Peptide-driven Translocation. *Journal of Biological Chemistry* 278(5): 3489-3496.
- Yahiro K, Morinaga N, Satoh M, Matsuura G, Tomonaga T, Nomura F, Moss J and Noda M (2006): Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. *Molecular Microbiology* 62(2): 480-490.
- Young JC (2010): Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochemistry and Cell Biology* 88(2): 291-300.
- Zahedi RP, Volzing C, Schmitt A, Frien M, Jung M, Dudek J, Wortelkamp S, Sickmann A and Zimmermann R (2009): Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics* 9(13): 3463-3473.
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA and Cahalan MD (2006): Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(24): 9357-9362.
- Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, Lee JW and Ackerman SL (2005): Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nature Genetics* 37(9): 974-979.
- Zhou M and Schekman R (1999): The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Molecular Cell* 4: 925-934.
- Ziman AP, Ward CW, Rodney GG, Lederer WJ and Bloch RJ (2010): Quantitative Measurement of Ca²⁺ in the Sarcoplasmic Reticulum Lumen of Mammalian Skeletal Muscle. *Biophysical Journal* 99(8): 2705-2714.
- Zimmermann R and Blatch GL (2009): A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends in Parasitology* 25(4): 147-150.
- Zimmermann R, Eyrisch S, Ahmad M and Helms V (2011): Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(3): 912-924.
- Zimmermann R, Sagstetter M, Lewis MJ and Pelham HRB (1988): Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO Journal* 7(9): 2875-2880.
- Zimniak P, Little JM, Radomska A, Oelberg DG, Anwer MS and Lester R (1991): Taurine-conjugated bile acids act as calcium ionophores. *Biochemistry* 30(35): 8598-8604.
- Zopf D, Bernstein H, Johnson A and Walter P (1990): The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO Journal* 9(13): 4511-4517.

VII DANKSAGUNG

Mein erster Dank und eine besondere Anerkennung gelten meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann. Während der letzten fünf Jahre ist er mir auf wissenschaftlicher als auch menschlicher Ebene stets als großartiger Mentor ein Vorbild gewesen. Sein Engagement und Ideenreichtum waren ebenso wie seine stete Diskussionsbereitschaft und Orientierungshilfe ein wahrer Katalysator für die unter seiner Leitung angefertigte Arbeit. Vielen Dank!

Prof. Dr. Adolfo Cavalié danke ich sowohl für die Übernahme des Korreferates als auch seine sorgsame und geduldige Betreuung im Zuge der Kalziummessungen.

Zudem möchte ich mich herzlich bei einigen Kollaborationspartnern bedanken. Dazu zählen Prof. Dr. Nica Borgese, Dr. Adrienne und Prof. Dr. James Paton sowie Prof. Dr. Stephen High, welche allesamt, ohne Zögern, einige ihrer hilfreichen molekularbiologischen Werkzeuge zur Verfügung stellten.

Desweiteren bedanke ich mich auch bei der Unterstützung und Hilfe durch Dr. Claudia Schirra, Detlef Hof und Birgit Klemmer. Alle drei haben durch ihr jeweiliges Know-how meine Arbeit deutlich vorangebracht.

Daneben möchte ich mich natürlich auch herzlichst bei den Mitgliedern der AG Zimmermann bedanken. Die permanente und vortreffliche Fürsorge durch unsere „Postdocs“ (Dr. Johanna Dudek, Dr. Markus Greiner, Dr. Carolin Jalal und Dr. Martin Jung) sowie die unschätzbare Hilfe durch Monika Lerner, Anika Müller, Simone Amann und Nicole Heim waren imposant. Ebenso war die gegenseitige Unterstützung der Doktoranten untereinander eine dauernde Hilfe. Danke Julia Benedix, Carsten Burgard, Sabine Cappel, Sarah Haßdenteufel, Tina Keller, Armin Melnyk, Linda Müller, Nico Schäuble, Andreas Schmitt, Stefan Schorr und Melanie Theis!

Ein großes Dankeschön gilt nochmals Dr. Markus Greiner für das Korrekturlesen der Arbeit und das instantane Unterbinden eines „burst“ an Anglizismen und Wortkreationen ;-).

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich beim GRK845 sowie dessen Koordinatorin Dr. Gabriele Amoroso bedanken.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, welche mir während der Doktorarbeit unglaublichen Rückhalt geliefert haben. Ohne einen Gedanken an jegliche Gegenleistung haben sie mir stets Tür, Ohr und Herz bei meinen Anliegen geöffnet! Gleiches gilt für mein Babe Simone! Dir möchte ich von Herzen danken, dass du mich in den letzten beiden Jahren bei diesem Großprojekt mit viel Einsatz, Verständnis und einigen guten Ratschlägen begleitet hast!! VIELEN DANK!

VIII PUBLIKATIONEN

Publizierte Artikel (peer-reviewed):

- **Lang S**, Benedix J, Fedeles S, Schorr S, Schirra C, Schäuble N, Jalal C, Greiner M, Haßdenteufel S, Tatzelt J, Kreutzer B, Edelmann L, Krause E, Rettig J, Somlo S, Zimmermann R & Dudek J (2012): Differential effects of Sec61 α -, Sec62- and Sec63-depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells (advance online publication; doi: 10.1242/jcs.096727)
- Johnson N, Vilardi F, **Lang S**, Leznicki P, Zimmermann R & High S: TRC-40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon (advance online publication; doi:10.1242/jcs.102608)
- **Lang S**, Schäuble N, Cavalié A & Zimmermann R (2011) Live cell calcium imaging combined with siRNA mediated gene silencing identifies Ca²⁺ leak channels in the ER membrane and their regulatory mechanisms. Journal of Visualized Experiments (doi: 10.3791/2730, published: 07/07/2011 ID: 2730)
- **Lang S**, Erdmann F, Jung M, Wagner R, Cavalié A & Zimmermann R (2011) Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. Channels 5:3, 228-235
- Greiner M, Kreutzer B, **Lang S**, Jung V, Cavalié A, Unteregger G, Zimmermann R & Wullich B (2011) Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. The Prostate 71(10):1074-83
- Erdmann F, Schäuble N, **Lang S**, Jung M, Honigmann A, Mazen A, Dudek J, Benedix J, Harsman A, Kopp A, Helms V, Cavalié A, Wagner R & Zimmermann R (2011) Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. EMBO Journal 30: 17-31
- Erdmann F, Jung M, Eyrisch S, **Lang S**, Helms V, Wagner R & Zimmermann R (2009) Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity. FEBS Letters 583: 2359-2364

Artikel in Revision:

- **Lang S**, Schäuble N, Cappel S, Schorr S, Dudek J, Blum R, Cavalié A & Zimmermann R: BiP-mediated closing of the Sec61 channel via loop 7 interaction limits Ca²⁺ leakage from the mammalian ER

Eingereichte Artikel:

- Pfeffer S, Brandt F, Hrabe T, Eibauer M, **Lang S**, Zimmermann R & Förster F: Structure and 3D arrangement of ER-membrane associated ribosomes