

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

Pathogenetische Eigenschaften von ERj3, ERj6 und Sec62

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

2016

vorgelegt von: Pavel Lampel

geboren am: 31.07.1991 in Zelinograd (Kasachstan)

Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Institutsleiter: Prof. Dr. rer. nat. Richard Zimmermann

meinen Eltern und Geschwistern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zusammenfassung/Summary	1
2.	Einleitung	5
2.1	Das Prostatakarzinom – Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	5
2.2	Das Translokon des endoplasmischen Retikulums	8
2.2.1	Die Rolle von Sec62 bei der Translokation von Proteinen in das ER	10
2.2.2	Die Kombinationstherapie mit Calmodulin-Antagonisten und Thapsigargin	13
2.3	Die Hsp40-Cochaperone mit besonderem Augenmerk auf ERj3 und ERj6	15
2.3.1	ERj3	16
2.3.2	ERj6 (p58 ^{IPK})	17
2.4	Pathologien mit Bezug zu den Transportprozessen am ER	18
2.5	Die UPR („ <i>unfolded protein response</i> “) und ER-Stress	20
2.6	Mechanismen der Zellmigration	22
2.7	Zielsetzungen der Arbeit	24
3.	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
3.1.2	Chemikalien	27
3.1.3	RNA-Oligonuklide	28
3.1.4	Plasmide zur Transfektion von Zelllinien	29
3.1.5	Primärantikörper	29
3.1.6	Sekundärantikörper	30
3.1.7	Raue Mikrosomen	30
3.2	Methoden der Zellkultur	30
3.2.1	Kultivieren von Säugerzellen	30
3.2.2	Ernten von Säugerzellen	31

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Zählung mittels „Countess automated cell counter“-----	32
3.2.4	Posttranskriptionelles Gen-„silencing“ auf Basis von RNA-Interferenz-----	32
3.2.5	Plasmidtransfektion-----	34
3.2.6	Herstellung einer stabil SEC62-überexprimierenden Zelllinie-----	34
3.2.7	Kryokonservierung humaner Zellen-----	35
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Zellen-----	36
3.2.9	Analyse der Aktinmorphologie mithilfe der Phalloidin-FITC Färbung-----	37
3.2.10	Migrationsassay mit dem FluoroBlok-Insert-System-----	38
3.2.11	Echtzeit-Analyse der Proliferation (xCelligence)-----	39
3.3	Methoden der Proteinbiochemie-----	41
3.3.1	Herstellung von Zelllysat-----	41
3.3.2	SDS-PAGE-----	42
3.3.3	Western Blot und immunologische Proteindetektion auf PVDF-Membranen---	43
3.3.4	Co-Immunopräzipitation (Co-IP)-----	45
3.3.4.1	Herstellung geeigneter Säulen-----	45
3.3.4.2	Herstellung von geeignetem Zelllysat-----	46
3.3.4.3	Durchführung der Co-IP-----	47
3.3.4.4	Wessel-Flügge-Fällung-----	48
4.	Ergebnisse-----	49
4.1	Untersuchungen zu Eigenschaften der Hsp40-Cochaperone ERj3 und ERj6-----	49
4.1.1	UPR und Genexpression in Fibroblasten ERj6-defizienter Patienten-----	49
4.1.2	Migrationspotential von HeLa-Zellen nach ERj3- bzw. ERj6-Depletion-----	55
4.1.3	Proliferation von HeLa-Zellen nach ERj3- bzw. ERj6-Depletion-----	56
4.1.4	Das Aktinzytoskelett bei HeLa-Zellen nach ERj3-Depletion-----	59
4.1.5	SEC62-„cross-rescue“ bei ERj3- bzw. ERj6-depletierten HeLas-----	61
4.2	Herstellung SEC62-überexprimierender LNCaP-Zellen-----	64
4.2.1	Methodische Vorversuche-----	64
4.2.2	Darstellung der Abnahme der SEC62-Überexpression über Zeit-----	66
4.2.3	Migrationspotential SEC62-überexprimierender LNCaP-Zellen-----	68

Inhaltsverzeichnis

4.3	Untersuchungen zum Interaktom von Sec62-----	69
4.3.1	Co-Immunopräzipitation <i>SEC62</i> -überexprimierender HEK-Zellen-----	70
4.3.2	EP58- und β IGH3-Gehalt in Sec62-depletierten Zellen-----	71
5.	Diskussion-----	74
5.1	Die Hsp40-Cochaperone und deren Einfluss auf verschiedene Zellfunktionen----	74
5.1.1	Konstitutiver ERj6-Mangel und seine Folgen-----	74
5.1.2	Neurodegeneration, Diabetes mellitus und die UPR-----	75
5.1.3	Auswirkungen RNA-Interferenz-basierter Depletion von ERj3 bzw. ERj6-----	78
5.1.4	<i>SEC62</i> -„ <i>cross-rescue</i> “ nach ERj3- bzw. ERj6-Depletion-----	82
5.1.5	ERj3 als Therapieansatz bei lysosomalen Speicherkrankheiten-----	84
5.2	LNCaP und Möglichkeiten der stabilen Transfektion-----	85
5.3	Erkenntnisse zum Interaktom von Sec62-----	88
5.3.1	Vimentin und Hsp70 als Interaktionspartner von Sec62-----	88
5.3.2	EP58, β IGH3 und deren Abhängigkeit von der <i>SEC62</i> -Expression-----	89
	Literaturverzeichnis-----	92
	Abkürzungsverzeichnis-----	106
	Danksagung-----	109
	Publikationen-----	110

1. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Hsp40-Cochaperone ERj3 und ERj6 sowie Sec62 in Bezug auf deren mannigfaltige Funktionen im endoplasmatischen Retikulum. Besondere Beachtung fanden hier die Auswirkungen des erhöhten Calciumausstroms über Sec61 nach Depletion jedes der genannten Proteine, namentlich dessen Effekte auf Migration, Proliferation und das Zytoskelett. Weiterhin wurden der Zusammenhang eines ERj6-Mangels mit Neurodegeneration und Diabetes mellitus untersucht. Eine letzte Zielsetzung fand sich in der Betrachtung des Interaktoms von Sec62 mit besonderem Blick auf die molekularkonkologisch relevanten Interaktionspartner.

Zur Klärung der gestellten Fragen kamen unterschiedlichste Methoden der Zellkultur und der Proteinbiochemie zum Einsatz. So zeigten HeLa-Zellen nach Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6 in Migrationsassays ein signifikantes Migrationsdefizit. Parallel mithilfe des xCelligence-Systems angefertigte Proliferationsanalysen legten dar, dass dieses unabhängig einer Vitalitätseinschränkung der untersuchten Zellen bestand. Um die Vulnerabilität ERj3- beziehungsweise ERj6-depletierter Zellen gegenüber ER-Stress zu evaluieren, wurden diese während der besagten Proliferationsanalysen mit Thapsigargin behandelt. Dies führte zu einem tendenziell erkennbaren, statistisch allerdings nicht signifikanten Proliferationsdefizit von HeLa-Zellen, in denen jeweils eines der Hsp40-Cochaperone RNA-Interferenz-basiert depletiert wurde. Ähnliches zeigte sich in fluoreszenzmikroskopischen Versuchen zum Aktinzytoskelett von HeLa-Zellen, das sich weder nach „*silencing*“ von ERj3 noch von ERj6 erkennbar veränderte.

Die Auswirkungen eines konstitutiven ERj6-Mangels wurden anhand der Fibroblasten einer Familie mit erblicher Neurodegeneration und Diabetes mellitus untersucht. Diese zeigten in Western Blot-Kontrollen des UPR-induzierten Proteins GRP170 keinen dauerhaft erhöhten ER-Stress, reagierten jedoch tendenziell sensibler auf durch Tunicamycin induzierten ER-Stress als gesunde Kontroll-Fibroblasten. Die genannten Befunde sprechen zusammenfassend für Redundanzen in den Funktionen von ERj3 und ERj6, die sich durch zuvor publizierte Befunde zum additiven Effekt einer Co-Depletion auf das Calciumleck des ER bekräftigen lassen.

1. Zusammenfassung

Im Verlauf der beschriebenen Untersuchungen wurde eine Methode zur zuvor nicht möglichen Herstellung von Migrationsassays nach Plasmidtransfektion erarbeitet.

Um das Interaktom von Sec62 weitergehend zu bestimmen, wurden Co-Immunopräzipitationen mit anschließender Western Blot-Kontrolle der präzipitierten Proteine durchgeführt. Hierbei wurde gezeigt, dass Sec62 mit Vimentin und Hsp70 interagiert. Beide Proteine wurden in der rezent veröffentlichten Literatur als potentielle Tumormarker oder Zielstrukturen einer „*targeted therapy*“ diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden demnach die Hsp40-Cochaperone ERj3 und ERj6 als wichtige Komponenten in der Calciumhomöostase des endoplasmatischen Retikulums bestätigt und in ihren pathophysiologischen Eigenschaften näher charakterisiert. Gerade ERj6 zeigte sich hier als Bindeglied zwischen ER-Stress und Neurodegeneration sowie Diabetes mellitus. Sec62 deutete daneben als in der Tumorbilogie hochrelevante Struktur weitere Mechanismen seiner Einflussnahme auf die Entstehung maligner Erkrankungen an.

1. Summary – Pathogenetic Characteristics of ERj3, ERj6 and Sec62

The purpose of this work was the characterization of the hsp40-co-chaperones ERj3 and ERj6, as well as Sec62 in regard to their many functions in the endoplasmic reticulum. Special attention was paid to the effects of an increased calcium leakage from Sec61 after depletion of each of the aforementioned proteins, namely on its effects on migration, proliferation and the cytoskeleton. Another aim was the evaluation of a genetically caused loss of ERj6 and the resulting phenotypes of neurodegeneration and diabetes mellitus. Lastly efforts were undertaken to study the interactome of Sec62 which was done with a focus on proteins with relevance to molecular oncology.

To answer the asked questions, different methods of cell culture and protein biochemistry were applied. For one, HeLa cells showed significant migratory impairment in migration assays after ERj3 or ERj6 were depleted. Simultaneously conducted proliferation analysis with the xCelligence system confirmed that this migratory impairment was not due to lack of vitality, but resulted from specific effects of the protein depletion. To evaluate the potential increase in vulnerability to ER stress, ERj3 or ERj6 depleted HeLa cells were treated with increasing amounts of thapsigargin during the xCelligence proliferation analysis. The observed proliferation deficit and increased susceptibility to thapsigargin in these cells showed tendencies of significance but did not hold up to statistic testing. Similarly, the RNA interference based silencing of one of the mentioned hsp40-co-chaperones did not lead to any changes in the structure of HeLa cells' actin cytoskeleton which was tested via immunostaining fluorescence microscopy.

The consequences of a constitutive lack of ERj6 were studied by using cultured fibroblasts derived from a family with a history of inherited neurodegeneration and diabetes mellitus. These showed no signs of elevated basal ER stress. This conclusion was drawn after western blot analysis showed no difference in the GRP170 content of fibroblasts carrying the mutated ERj6 in comparison to healthy controls. However, the diseased cells reacted more sensitively to tunicamycin induced ER stress.

All these findings support the theory that ERj3 and ERj6 share mutual functionalities and are redundant in regard to their functions in chaperoning and ER calcium homeostasis. This is further underlined by previously published data showing an additive effect on calcium leakage from the ER after co-silencing of the two hsp40-co-chaperones.

While conducting research on ERj3, ERj6, Sec62 and their effects on the migratory potential of HeLa cells, a new method was established, allowing the hitherto impossible use of plasmid transfected cells in migration assays.

To create a better understanding of the interactome of Sec62 co-immunoprecipitations were performed. After western blot analysis of the precipitated proteins, Hsp70 and Vimentin were shown to interact with Sec62. In recently published literature, both proteins were discussed as potential tumor markers or targets for personalized treatments.

In this work, the hsp40-co-chaperones ERj3 and ERj6 were further characterized as important components of ER calcium homeostasis and their roles in pathophysiological processes were illuminated. Especially ERj6 turned out to be a link between ER stress, neurodegeneration and diabetes mellitus. Sec62 on the other hand cemented its standing in molecular oncology as a driving force in tumorigenesis and the development of targeted therapies.

2. Einleitung

2.1 Das Prostatakarzinom – Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Im Jahre 2012 wurden weltweit bei 14,1 Millionen Menschen Krebsleiden diagnostiziert, 8,2 Millionen sind an den Folgen ihrer malignen Neoplasie verstorben [Torre 2015]. Hinter den kardiovaskulären Krankheitsbildern wie der koronaren Herzkrankheit und dem Schlaganfall, denen 2012 geschätzt 17,5 Millionen Menschen erlegen sind, folgen sie dementsprechend an zweiter Stelle der globalen Todesursachenstatistik. (WHO)

In Deutschland waren 2010 die meisten krebsassoziierten Todesfälle bei Männern auf Neoplasien der Lunge (29.381 Tote) zurückzuführen, bei Frauen auf solche der Brustdrüse (17.466 Tote). Nach dem Darmkrebs (13.489 verstorbene Männer) folgt das Prostatakarzinom hier an dritter Stelle (12.676 Tote). (Robert-Koch-Institut, siehe Abb. 2.1) Betrachtet man jedoch die Häufigkeit der Krebsneuerkrankungen in Bezug auf die Tumorlokalisation, so zeigt sich bei Männern, dass das Prostatakarzinom noch mit Abstand vor dem Lungenkrebs liegt. (RKI, siehe Abb. 2.2)

Um diese Diskrepanz zu erklären ist es von Nöten, die Altersverteilung der Erkrankten zu betrachten. Analysiert man die altersspezifischen Erkrankungsrate so fällt auf, dass das Prostatakarzinom eine Erkrankung des alten Mannes ist. In den Jahren 2009 bis 2010 lag der Erkrankungsgipfel in Deutschland zwischen 65 und 85 Jahren. Die Wahrscheinlichkeit einen nicht krebsassoziierten Tod, beispielsweise im Rahmen einer kardiovaskulären Problematik, zu sterben ist hoch. Belegt wird diese Vermutung durch einen Vergleich der absoluten und relativen, sprich die in Bezug auf die erwartete Mortalität der Gesamtpopulation betrachteten, 5-Jahres-Überlebensraten von Prostatakarzinom-Patienten. Diese beträgt absolut circa 80%, relativ jedoch circa 93%.

Mehrere Faktoren bedingen die guten Überlebenschancen der Patienten. Zum Einen steht mit dem PSA ein hervorragender Tumormarker zur Verfügung, mit dem eine frühe Diagnose im noch metastasenfremden Stadium möglich ist [Andriole 2012]. Zum Anderen stehen gute kurative Behandlungsmöglichkeiten bei Prostatakarzinomen in niedrigen Stadien zur Verfügung. Circa 20-30% der Patienten haben bei Erstdiagnose ein noch nicht metastasiertes

2. Einleitung

Hoch-Risiko-Karzinom, das eine aggressive Therapie erfordert [Thompson 2006, Cooperberg 2008]. Hier ist vor allem die radikale Prostatektomie als etabliertes Verfahren zu nennen [Cooperberg 2010].

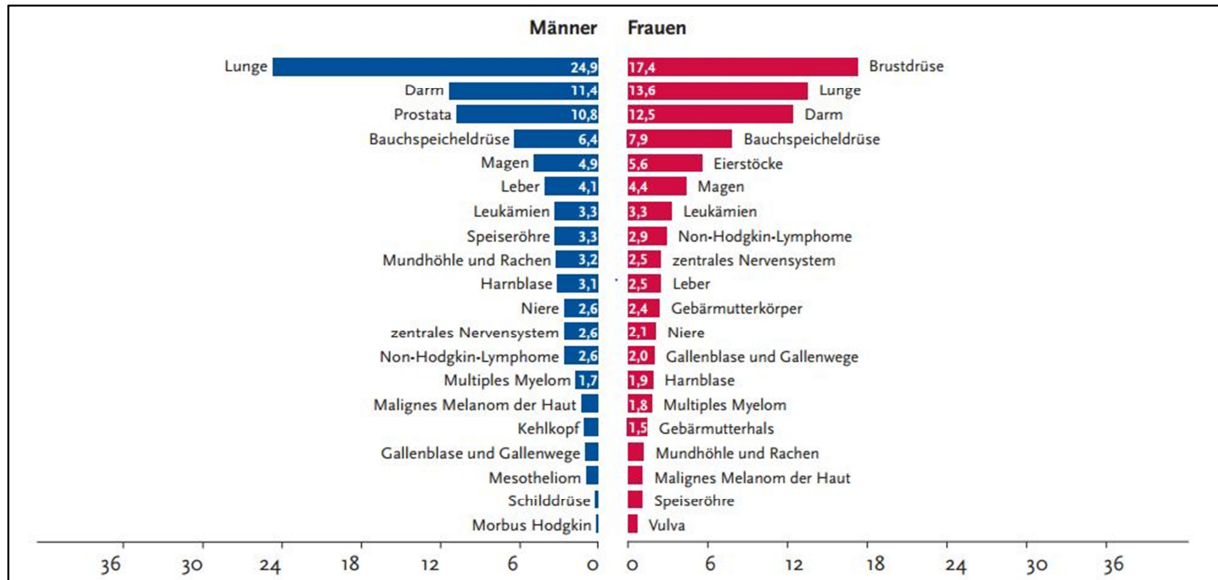


Abb. 2.1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisation an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010 [nach Robert-Koch-Institut 2013].

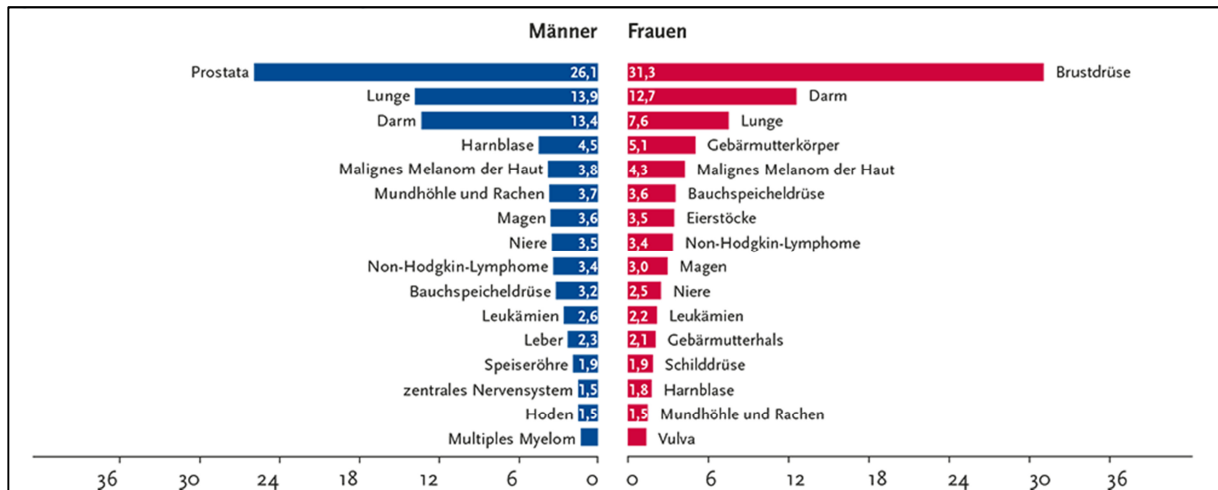


Abb. 2.2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisation an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2010 [nach Robert-Koch-Institut 2013].

Eine weitere Säule ist die Androgen-ablative Therapie. Bereits 1941 wurden positive Effekte von Kastration beziehungsweise Östrogenapplikation auf das Prostatakarzinom gezeigt [Huggings 1941]. Die Einführung der Hormontherapie des Prostatakarzinoms wurde so zum ersten systemischen Ansatz einer Krebsbehandlung und wurde 1966 mit einem Nobelpreis geehrt. Heute erfolgt die Therapie mit einer Kombination aus Gonadotropin-releasing-hormone- (GnRH-)Agonisten und Androgenrezeptor-Antagonisten. Diese ist jedoch nicht kurativ einsetzbar und wird so vor allem bei Patienten mit Metastasen angewendet. [Heidenreich 2008]. Leider spricht nicht jedes Karzinom auf eine Androgenablation an. Dieser Umstand ist mit einer signifikant schlechteren Prognose vergesellschaftet [Crawford 2010]. Um Behandlungsoptionen auch für solche Tumoren zu schaffen, muss ein grundlegendes Verständnis für die Pathogenese des Prostatakarzinoms geschaffen werden.

In der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML), war die Entdeckung der t(9:22)-Translokation ein gewaltiger Durchbruch [Rowley 1973]. Mit der darauf folgenden Entwicklung des Bcr-Abl-Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib konnte eine hervorragende Kontrolle der zuvor gefürchteten Erkrankung erreicht werden [Hochhaus 2009].

Eine solch bahnbrechende Angriffsstelle konnte für das Prostatakarzinom noch nicht identifiziert werden. Der Androgenrezeptor (AR) ist auch für metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinome (mCRPC) noch relevant, da auch diese auf AR-gekoppelte Signalwege angewiesen sind [Mohler 2008]. Hier wurde zum Beispiel Abirateronacetat, ein irreversibler Inhibitor des für die Androgensynthese essentiellen CYP-17-Enzyms, eingeführt [Potter 1995] und für wirksam befunden [De Bono 2011].

Direkte AR-Blockade ist weiterhin wichtig für die laufende Forschung. So wurde beispielsweise ein hochaffiner selektiver AR-Antagonist namens Enzalutamid (MDV-3100) getestet, der die ligandeninduzierte nukleäre Translokation des Rezeptors, seine Bindung an die DNA und die Proliferation der Zelle inhibiert [Scher 2010].

Zur Identifikation gefährdeter Patienten wurden eine Vielzahl genetischer Marker identifiziert und auf ihre klinische Signifikanz hin getestet. Hier ist zum Beispiel die Amplifikation des *MYC*-Lokus auf dem Chromosom 8q24 zu nennen [Ribeiro 2007].

Eine exakte Charakterisierung des Prostatakarzinoms, seiner Ursachen und möglicher „*targets*“ bleibt somit eine wichtige Domäne der molekularonkologischen Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die weitere Charakterisierung eines solchen „*targets*“, Sec62, und es wurde der Versuch unternommen, Zelllinien eines Prostatakarzinoms herzustellen, die in *in vivo* Experimenten zur Testung einer „*targeted therapy*“ Verwendung finden sollten.

2.2 Das Translokon des endoplasmatischen Retikulums

Da die in dieser Arbeit beleuchteten Proteine wichtige Rollen bei der Translokation von Peptidketten in das endoplasmatische Retikulum (ER) spielen, soll dieser essentielle Vorgang der eukaryotischen Zelle näher beleuchtet werden.

Der Transport von Peptidketten ins ER ist ein lebensnotwendiger zellbiologischer Prozess, der bei der Synthese transmembraner, sekretorischer, peroxisomaler und lysosomaler Proteine eine zentrale Rolle inne hat [Palade 1975].

Prinzipiell ist dieser Vorgang in drei Schritte gegliedert, namentlich das „*targeting*“ der ER-Membran, die Insertion in die Translokationspore und die Elongation beziehungsweise Termination des Transportes. Weiterhin gibt es zwei in einigen Punkten unterschiedliche Mechanismen, abhängig davon, ob die Peptidkette bereits parallel zur Synthese oder erst danach die ER-Membran passiert. Es wird somit zwischen einem cotranslationalen [Rapoport 1996, High und Laird 1997, Matlack 1998] und einem posttranslationalen [Kutay 1995, Whitley 1996] Transport unterschieden.

Zur Initiation eines cotranslationalen Transports bindet zunächst der Ribonucleoproteinkomplex SRP („*signal recognition particle*“) [Walter und Blobel 1980] an eine aminoternale hydrophobe Signalsequenz des am Ribosom synthetisierten Proteins [von Heijne 1985, Zheng und Nicchitta 1999], sowie an das Ribosom an sich [Walter 1981]. Diese Wechselwirkung führt zu einem vorübergehenden Stopp der Translation [Walter und Blobel 1981], der so lange anhält bis SRP an den ER-ständigen SRP-Rezeptor bindet. Hierdurch kommt es zu einer Interaktion zwischen dem SRP-Rezeptor und dem Sec61-Komplex [Görllich und Rapoport 1993], was schließlich zur Insertion der naszierenden Peptidkette in diese „Proteintranslokationspore“ des ER führt. Es kommt zur Hydrolyse des an SRP gebundenen GTP-Moleküls, wodurch SRP sich von Ribosom und SRP-Rezeptor löst

2. Einleitung

[Römisch 1989, Rapiejko und Gilmore 1997, Mitra 2006]. Die Hemmung der Translation wird so aufgehoben und der Terminationsschritt kann beginnen.

Entscheidend an diesem Vorgang beteiligt sind die Hsp70-Chaperone BiP („*immunoglobulin heavy chain binding protein*“) und GRP170, die als sogenannte „*molecular ratchets*“ dienen und unter ATP-Hydrolyse den unidirektionalen Transport der naszierenden Peptidkette durch den Translokasekomplex bewirken [Tyedmers 2003, Alder 2005, Dudek 2008]. Über die Interaktion mit der luminalen J-Domäne transmembranärer Hsp40-Chaperone (Sec63, ERj1) gelangen die Hsp70-Chaperone zum Translokon (Sec61c) [Nguyen 1991, Sanders 1992, Brodsky und Schekman 1993, Panzner 1995, Lyman und Scheckmann 1995, Matlack 1996] und werden dort durch den „*nucleotide exchange factor*“ (NEF) Sil1/BAP in ihrer Funktion unterstützt [Chung 2002]. GRP170 kann ebenfalls die Aufgaben eines NEF erfüllen [Weitzmann 2006]. Ist das Protein vollständig durch das Translokon getreten, erfolgt eine Abspaltung der Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex [Blobel und Dobberstein 1975] und die verbleibende Peptidkette kann ER-luminal mithilfe von Faltungsenzymen und Chaperonen gefaltet und im Anschluss posttranslational modifiziert werden, beispielsweise in Form von Glykosylierung durch Oligosaccharyltransferasen [Knauer und Lehle 1999].

Erfolgt der Transport des zu translozierenden Proteins posttranslational, ergeben sich einige wesentliche Unterschiede zum cotranslationalen Transport. So zeigen sich Signalsequenzen am Aminoterminus, die ob ihrer geringeren Hydrophobizität oder der allgemeinen Kürze des zu translozierenden Peptids schwächer bis garnicht an SRP binden. Der SRP-induzierte Translationsarrest unterbleibt somit [Cross 2009]. Um eine prämatüre Faltung zu verhindern, binden zytosolische Hsp40- und Hsp70-Chaperone an das vollständig synthetisierte Peptid und halten dieses unter ATP-Verbrauch in einer translokationsfähigen Konformation [Müller und Zimmermann 1987, Zimmermann und Sagstetter 1988, Wiech 1990, Brodsky 1995]. Wie in Hefe gezeigt wurde erfolgt das „*targeting*“ des synthetisierten Proteins zum Sec61-Komplex noch vor Insertion in die ER-Membran über die beiden Transmembranproteine Sec62p und Sec71p, sowie das membranassoziierte Protein Sec72p [Deshaies und Schekman 1989, Green 1992], die als Teil des heptameren SEC-Komplexes entscheidend sind [Rothblatt 1989, Deshaies 1989, Panzner 1995]. Bei der eigentlichen Translokation spielt auch beim posttranslationalen Transport BiP eine wichtige Rolle, das ebenfalls über J-Domänen von ER-

Proteinen wie Sec63 und ERj1 an seinen Bestimmungsort am Translokation gelenkt wird [Nguyen 1991, Sanders 1992, Brodsky und Schekman 1993, Panzner 1995, Lyman und Schekman 1995, Matlack 1997, Misselwitz 1999, Dudek 2005, Blau 2005]. Elongation und Termination des posttranslationalen Transports sind denen des cotranslationalen sehr ähnlich. Eine schematische Darstellung der Vorgänge ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

Ob ein Peptid co- oder posttranslational transloziert wird und welche exakte Zusammensetzung der Translokasekomplex jeweils annimmt, hängt maßgeblich von der Struktur und der Größe des jeweiligen Peptids ab [Mitra 2006, Rapoport 2008].

2.2.1 Die Rolle von Sec62 bei der Translokation von Proteinen in das ER

Als Verbindungsglied zwischen Proteintranslokation und Tumorbio­logie steht in dieser Arbeit Sec62. Dieses ist ein Membranprotein des ER. Es besteht aus zwei Transmembrandomänen, die durch einen ER-luminalen „loop“ miteinander in Verbindung stehen. N-Terminus und C-Terminus liegen beide im Zytosol und weisen jeweils mehrere funktionelle Domänen auf. So befinden sich am N-Terminus eine Bindungsstelle für Ribosomen und eine Interaktionsstelle für Sec63, in der zweiten Transmembrandomäne eine potentielle Oligomerisierungsstelle und am C-Terminus zwei potentielle EF-Hand-Motive, die als wichtige Bindungsstellen für Ca^{2+} in Frage kommen.

Der erste Nachweis sowie die Aufklärung der Struktur von Sec62/TLOC1 gelang in den späten 1980er Jahren in *Saccharomyces cerevisia* [Deshaies und Schekman 1989, Deshaies und Schekman 1990, Deshaies 1991]. Die Entdeckung des Säuger-Homologs erfolgte erst einige Jahre später [Makoto 1997]. In Hefezellen ist Sec62 Teil eines tetrameren Komplexes mit den Bestandteilen Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p, der größte Wichtigkeit für den posttranslationalen Transport hat [Panzner 1995] und mit dem trimeren Komplex aus Sec61p, Sbh1 und Sss1 das sogenannte „post-translocon“ bildet [Harada 2010]. Die Funktion von Sec62 bei der Proteintranslokation in Säug­erzellen konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine Assoziation mit Sec61 und Sec63 besteht sowohl in Hefen als auch in Säugern [Meyer 2000, Tyedmers 2000, Wittke 2000].

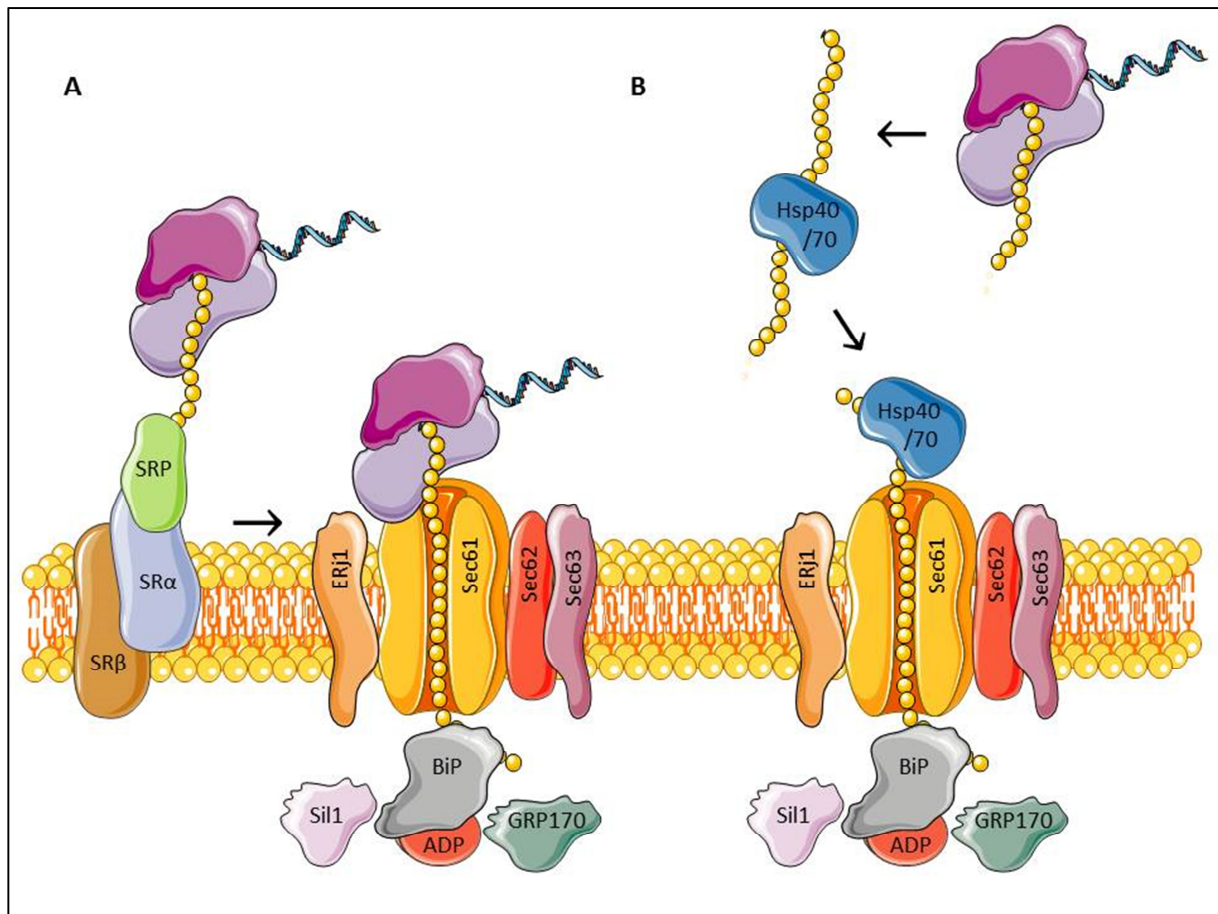


Abb. 2.3: Schema des co- und posttranslationalen Transports in das Säuger-ER. Beim in **A** gezeigten cotranslationalen Transport erfolgt zunächst die Bindung einer N-terminalen Signalsequenz entsprechender sich noch im Ribosom befindlicher Proteine an SRP („*signal recognition particle*“), was zu einem reversiblen Stopp der Translation führt. SRP bindet nun an den aus zwei Untereinheiten bestehenden SRP-Rezeptor, welcher seinerseits unter Abspaltung von SRP zu einer Assoziation des Ribosoms mitsamt naszierender Peptidkette und Sec61 mit seinen assoziierten Transmembranproteinen (ERj1, Sec62, Sec63) führt. Der Elongationsarrest am Ribosom wird so aufgehoben und es erfolgt die weitere Synthese der Peptidkette direkt in die Pore des Sec61-Komplexes. Die luminalen J-Domänen von Sec63 und ERj1 rekrutieren das Hsp70-Chaperon BiP zum teilweise translozierten Peptid, das als sogenanntes „*molecular ratchet*“ ein Zurückgleiten ins Zytosol und weiterhin eine Aggregation des noch ungefalteten Proteins verhindert. Sil1 und GRP170 dienen BiP als NEFs („*nucleotide exchange factors*“). Beim in **B** dargestellten posttranslationalen Transport wird ein bereits im Zytosol vollständig synthetisiertes Peptid durch zytosolische Hsp40- und Hsp70-Chaperone gebunden und unter ATP-Verbrauch an der vorzeitigen Faltung gehindert, damit eine Translokation noch möglich ist. Die folgenden Schritte entsprechen denen des cotranslationalen Transports.

Jedoch weist das Sec62 von Säugetieren Eigenschaften auf, die dem Homolog der Hefen fehlen. Es kann also von einem evolutionären Funktionszugewinn gesprochen werden

[Müller 2010]. Dieser zeigt sich in Form zweier konservierter Peptidmotive im N-terminalen Bereich, die Sec62 zur Interaktion mit einem Ribosom befähigen.

In Zusammenschau dieser strukturellen Befunde ist Sec62 beim Säugetier nun also dazu befähigt über Bindung des Proteintranslokations- und Ca^{2+} -Leck-Kanals Sec61 den Proteintransport über die ER-Membran und die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase zu beeinflussen. Weiterhin ist es in der Lage über die Rekrutierung von Sec63 die Funktion von BiP, dem Schlüsselenzym der „*unfolded protein response*“ (UPR), und somit die Reaktion der Zelle auf ER-Stress zu beeinflussen [Greiner 2011]. Mehrere EF-Hand-Motive im zytosolischen C-Terminus von Sec62 (www.bioinformatics.org/calpred/index.html) sprechen für eine darüber hinausgehende Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase, beziehungsweise der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und legen somit eine wichtige Rolle von Sec62 im Rahmen verschiedener Ca^{2+} -abhängiger Prozesse wie der Apoptose [McConkey und Orrenius 1997, Tombal 2000, Zhang 2001, He 2002, Scorrano 2003] oder der Zellmigration [Huang 2004] nahe. In der Tat wurde unter siRNA-vermittelter Depletion von Sec62 ein deutlich gesteigerter Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER gezeigt [Greiner 2011, Linxweiler 2012, Linxweiler 2013].

Im Jahre 2006 wurde Sec62 durch Analyse von Prostatakarzinomgewebe und Prostatakarzinomzelllinien zum ersten Mal mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass das *SEC62*-Gen im Tumor signifikant überexprimiert wird und ein erhöhter Sec62-Proteingehalt in den Zellen vorhanden ist [Jung 2006]. Hierbei wurde des Weiteren eine signifikante Korrelation von *SEC62*-Expression und Gleason-Score und somit dem Grad der Dedifferenzierung gezeigt. Weiterhin war es möglich durch siRNA-vermittelte Reduktion des Sec62-Proteingehalts die Migrationsfähigkeit von Prostatakarzinomzellen zu hemmen und deren Sensibilität gegen durch Thapsigargin (TG), einem Inhibitor der SERCA, verursachten ER-Stress zu erhöhen [Greiner 2011]. Sec62 könnte somit zum einen als prognostischer Marker mit Korrelation zum Grad der Dedifferenzierung bei Prostatakarzinompatienten, zum anderen im Rahmen einer „*targeted therapy*“ als Indikator für das Ansprechen auf eine Therapie mit TG oder Substanzen mit ähnlichem Wirkmechanismus dienen.

Abgesehen vom Prostatakarzinom konnten erhöhte Sec62-Proteinniveaus auch in Gewebeproben von Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden [Greiner 2010]. Somit stellt es eine wichtige Angriffsstelle im Rahmen neuer „*targeted therapy*“-Konzepte verschiedenster Tumorentitäten dar.

2.2.2 Die Kombinationstherapie mit Calmodulin-Antagonisten und Thapsigargin

Um den von Sec62 vermittelten Schutz gegenüber den antiproliferativen und antimetastatischen Effekten von TG in beispielsweise Prostatakarzinomzellen zu minimieren, wäre eine siRNA-basierte Depletion von Sec62 denkbar. Leider scheitern RNA-Interferenz basierte Verfahren in vivo zum Einen an der schlechten Erreichbarkeit des Zielgewebes, zum Anderen an den schweren Nebenwirkungen einer solchen Therapie [Bonetta 2009].

Interessanterweise wurde ein Ansatz erarbeitet, dessen Grundlage nicht die RNA-Interferenz ist, der jedoch denselben Phänotyp zeigt wie die Depletion von Sec62 [Linxweiler 2013]. So konnte unter der Behandlung von HeLa-Zellen mit den Calmodulin-Antagonisten Ophiobolin A oder Trifluoperazin (TFP) ein erhöhter Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER gezeigt werden. Weiterhin konnte die Sensitivität der Zellen gegenüber TG erhöht werden. In HeLa- und PC3-Zellen waren sowohl das Migrationspotential als auch die Proliferation unter TG-Behandlung in Kombination mit den Calmodulin-Antagonisten verringert. Diese Effekte konnten durch simultane RNA-Interferenz basierte Depletion von Sec62 noch weiter verstärkt und durch die plasmidvermittelte Überexpression von SEC62 wieder aufgehoben werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass der durch Sec62-Depletion verursachte Ca^{2+} -Strom durch den Sec61-Komplex fließt. Ein solcher Strom wurde sowohl für TFP als auch für Ophiobolin A beschrieben [Erdmann 2011, Lang 2011]. Des Weiteren wurde eine calciumabhängige Interaktion von Sec62 und dem N-Terminus von Sec61 gezeigt. Diese wird wahrscheinlich von den beiden EF-Hand-Motiven am C-terminalen Ende von Sec62 (siehe 2.2.1) vermittelt, da eine Punktmutation dieser Bereiche den Phänotyp einer Sec62-Depletion imitiert.

2. Einleitung

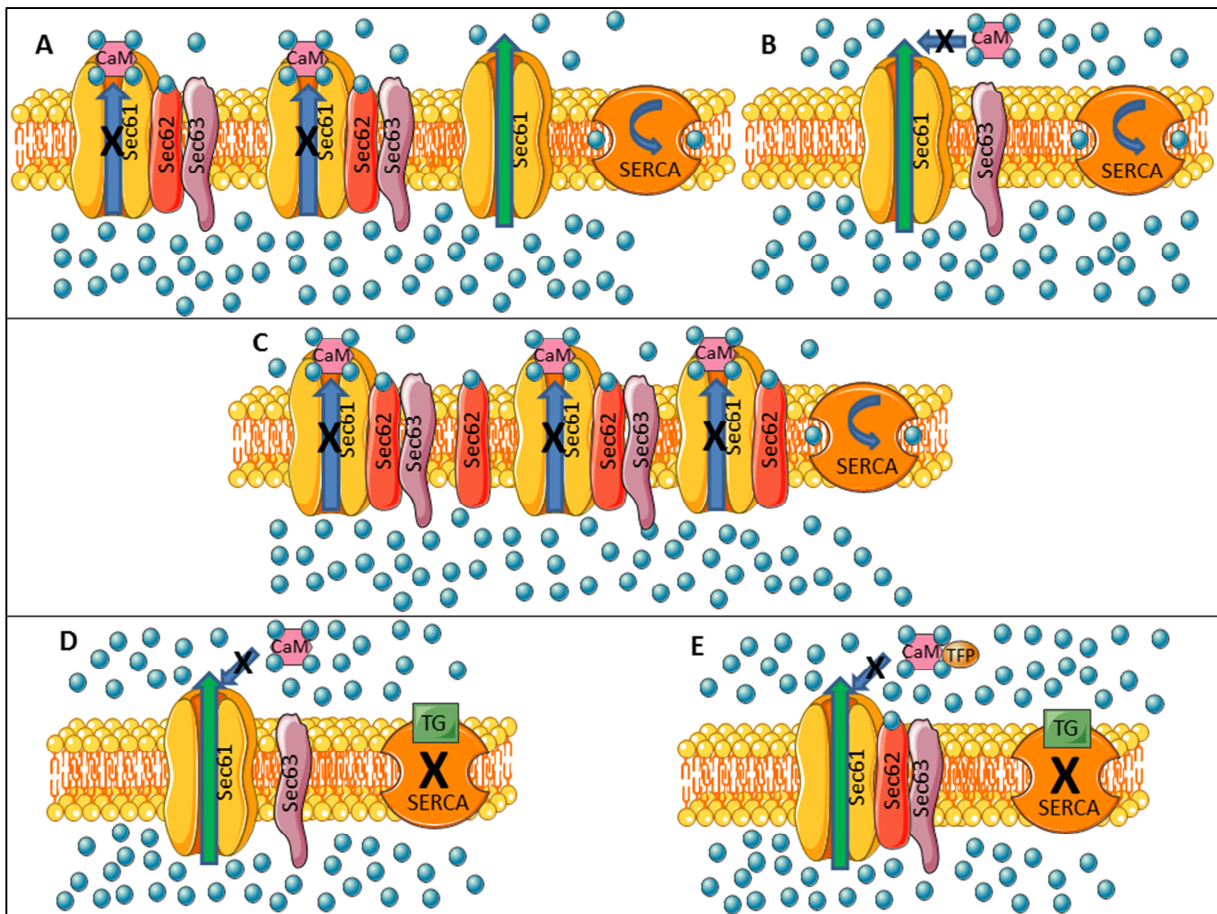


Abb. 2.4: Einfluss von Sec62 auf die Calciumhomöostase des ER [nach Linxweiler 2013]. **A:** Schema der physiologischen Funktion. Die überwiegende Mehrzahl der Sec61-Komplexe liegt in Assoziation mit Sec62/Sec63 vor. Sec62 detektiert mit seinen EF-Hand-Motiven freie Ca^{2+} -Ionen im Zytosol und ermöglicht so eine Interaktion von Calmodulin (CaM) und Sec61, wodurch dieser Komplex verschlossen wird. Die wenigen nicht mit Sec62/Sec63-Komplexen besetzten Sec61-Komplexe ermöglichen einen permanenten „ Ca^{2+} -Leckstrom“, der durch die SERCA ausgeglichen wird. **B:** Zustand nach Depletion von Sec62. Aufgrund fehlender Detektion freier Ca^{2+} -Ionen im Zytosol durch Sec62 findet keine Rekrutierung von CaM an Sec61 mehr statt. Es kommt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Leckstrom mit erhöhter zytosolischer Ca^{2+} -Konzentration. **C:** Zustand bei Überexpression von *SEC62*. Konträr zu B kommt es hier zu einem Überangebot von Sec62 mit verstärkter Rekrutierung von CaM an Sec61. Der Leckstrom wird geringer, die Gefahr des ER-Stress ebenfalls. **D:** Zustand nach Depletion von Sec62 und Behandlung mit Thapsigargin (TG). Der erhöhte Leckstrom wird nicht mehr durch die SERCA ausgeglichen. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt stark. **E:** Zustand bei Behandlung mit TFP und TG. TFP inhibiert die Rekrutierung von CaM durch Sec62 und imitiert so den Phänotyp der Sec62-Depletion. TG blockiert die SERCA. Es kommt zu dem gleichen Phänotyp wie bei D.

All diese Ergebnisse führen in ihrer Zusammenschau zu folgender Arbeitshypothese: Im ER gibt es ein bedeutsames „Ca²⁺-Leck“, Sec61. Um den Ca²⁺-Ausstrom zu minimieren, unterliegt dieser einer strengen Regulation durch BiP und Calmodulin [Harsman 2011, Schäuble 2012]. Die ausströmenden Ca²⁺-Ionen werden von den EF-Hand-Motiven von Sec62 detektiert, was dessen Bindung an Sec61 auflöst und eine Bindungsstelle für Calmodulin an Sec61 freigibt. Calmodulin verschließt daraufhin den Kanal (siehe Abbildung 2.4).

Die beschriebenen Versuche und Ergebnisse zeigten, dass eine Antagonisierung von Calmodulin über den als Arbeitshypothese beschriebenen Prozess den Phänotyp einer Sec62-Depletion kopiert und somit als guter Therapieansatz für SEC62-überexprimierende Tumoren anzusehen ist. In dieser Funktion ist vor allem TFP hochinteressant, da es für den Einsatz am Mensch bereits eine Zulassung als Neuroleptikum hat [Shen 1999].

2.3 Die Hsp40-Cochaperone mit besonderem Augenmerk auf ERj3 und ERj6

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben ist das Hsp70-Chaperon BiP ein zentraler Bestandteil der Proteintranslokation über die ER-Membran. Dessen einfache Funktionsweise, bestehend aus einem Zyklus von ATP-Hydrolyse und unselektiver Substratbindung, ist in der Lage komplexe zelluläre Prozesse zu kontrollieren und zu steuern. Dieses Phänomen kann durch die unbedingt notwendige Interaktion von BiP mit einem Hsp40-Cochaperon während des ATPase-Zyklus erklärt werden [Szabo 1994, Mayer und Bukau 2005]. Mitglieder dieser Gruppe von Proteinen (ERj1 – ERj7) zeigen eine große Diversität in Struktur und Funktion [Craig 2006, Hageman und Kampigna 2009]. Es ist demnach begründet zu vermuten, dass BiP in Abhängigkeit des gebundenen Hsp40-Cochaperons in der Lage ist, verschiedene zelluläre Funktionen zu erfüllen.

Gemeinsames Merkmal dieser Proteine ist eine konservierte, aus circa 70 Aminosäuren bestehende J-Domäne mit einem charakteristischen His-Pro-Asp (HPD) Tripeptid-Motiv [Pellecchia 1996, Hennessy 2005]. Diese interagiert direkt mit BiP und stimuliert unter anderem dessen ATPase-Aktivität [Cheetham 1994, Qian 1996, Cheetham 1998, Suh 1998, Suh 1999, Jiang 2007, Swain 2007].

Im ER von Säugetieren findet man neben den zwei Hsp70-Chaperonen BiP und GRP170 (siehe 2.2) sieben Hsp40-Cochaperone, deren J-Domäne in das ER-Lumen ragt. Diese heißen ERj1, ERj2 (Sec63), ERj3, ERj4, ERj5, ERj6 (p58^{IPK}) und ERj7 [Zahedi 2009, Kampigna und Craig 2010, Otero 2010]. Interessanterweise kopiert nur die Depletion von ERj3 oder ERj6, den beiden einzigen luminalen und nicht membranständigen Hsp40-Cochaperonen, den Phänotyp einer BiP-Depletion [Schorr 2015], der sich in einem erhöhten Ca²⁺-Leckstrom aus dem Sec61-Kanal äußert [Schäuble 2012]. Aufgrund dieser Beobachtung wurden in dieser Arbeit ERj3 und ERj6 ausführlicher beleuchtet.

2.3.1 ERj3

ERj3 stellt das Säugetierhomolog des Hefeproteins Scj1p dar [Bies 1999, Ohtsuka und Hata 2000, Yu 2000, Meunier 2002, Bies 2004]. Seine Expression steht unter der Kontrolle der UPR („*unfolded protein response*“) und es ist dazu im Stande an neu synthetisierte ungefaltete beziehungsweise fehlgefaltete Proteine zu binden und diese so der Faltungsmaschinerie zuzuführen [Shen und Hendershot 2005, Marcus 2007, Jin 2008, Jin 2009]. Des Weiteren war es möglich zu zeigen, dass ERj3 an der Retrotranslokation von Shiga-Toxin beteiligt ist und hier eine Rolle bei der initialen Entfaltung von Proteinen während der ERAD („*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*“) spielt [Yu und Haslam 2005].

Betrachtet man die Interaktion mit BiP genauer, so stellt man fest, dass ERj3 zunächst selbst einen hydrophoben Bereich von etwa neun Aminosäuren der naszierenden Peptidkette bindet und so unerwünschte Faltung verhindert. Erst dann rekrutiert ERj3 mit seiner J-Domäne BiP. Es entsteht ein Hsp40-Hsp70-Substratkomplex. Abschließend stimuliert ERj3 vor seiner endgültigen Lösung aus dem Komplex die ATPase-Aktivität von BiP, was dessen Substratbindung in die hochaffine Form überführt. So ist eine sichere Bindung des Hsp70-Chaperons an sein Substrat hergestellt [Guo und Snapp 2013].

Durch 2D-Elektrophorese wurde weiterhin gezeigt, dass ERj3 in einem Komplex mit weiteren wichtigen Komponenten der Translokase wie zum Beispiel Sec61 α vorliegt [Dejgaard 2010,

Guo und Snapp 2013]. In Zusammenschau dieser Befunde ist ERj3 demnach eine luminale, akzessorische Komponente des Translokons mit wichtiger Funktion bei der Rekrutierung von BiP an seine Substrate.

2.3.2 ERj6 (p58^{IPK})

ERj6 wurde zunächst im Zytosol lokalisiert und dort als Protein charakterisiert, das von der UPR induziert wird und die Phosphorylierung der PERK („*protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*“) negativ beeinflusst [Yan 2002, van Huizen 2003]. Etwas später wurden jedoch ein funktionales Signalpeptid sowie eine ER-luminale Lokalisation nachgewiesen [Rutkowski 2007]. In derselben Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass ERj6 höchstwahrscheinlich keine Rolle als ERAD-Adapter spielt.

Viel mehr deuteten die Daten darauf hin, dass ERj6 eine dem ERj3 nicht unähnliche Funktion bei der Rekrutierung von BiP aufweist. Hierbei bindet es selektiv an missgefaltete Proteine, bildet einen trimeren Hsp40-Hsp70-Substratkomplex mit BiP, stimuliert dessen ATPase-Aktivität und löst sich schließlich aus dem Komplex. Dieser Mechanismus ist zwingend auf die Anwesenheit von ATP, sowie die Interaktion von J-Domäne und BiP angewiesen [Petrova 2008]. So stellt ERj6 nicht nur einen stabilen Hsp70-Substratkomplex her, sondern gewährleistet bis dorthin auch das wichtige „*chaperoning*“. Weiterhin wurde eine direkte Interaktion zwischen ERj6 und dem Sec61-Komplex gezeigt [Oyadomari 2006].

In Mäusen mit homozygoter Ablation des *ERJ6*-Gens kommt es zu Wachstumsretardierung, gestörtem Fettstoffwechsel und einem altersabhängigen Diabetes Typ II, der durch Apoptose der pankreatischen β -Zellen verursacht wird [Ladiges 2005]. Hierbei gibt es eine auffallende Ähnlichkeit mit dem Phänotyp der Sec61A1^{Y344H}-Mutation, die die Bindung von BiP an Sec61 verhindert und so die Regulation des Ca²⁺-Ausstroms durch Sec61 α beeinträchtigt [Lloyd 2010, Schäuble 2012].

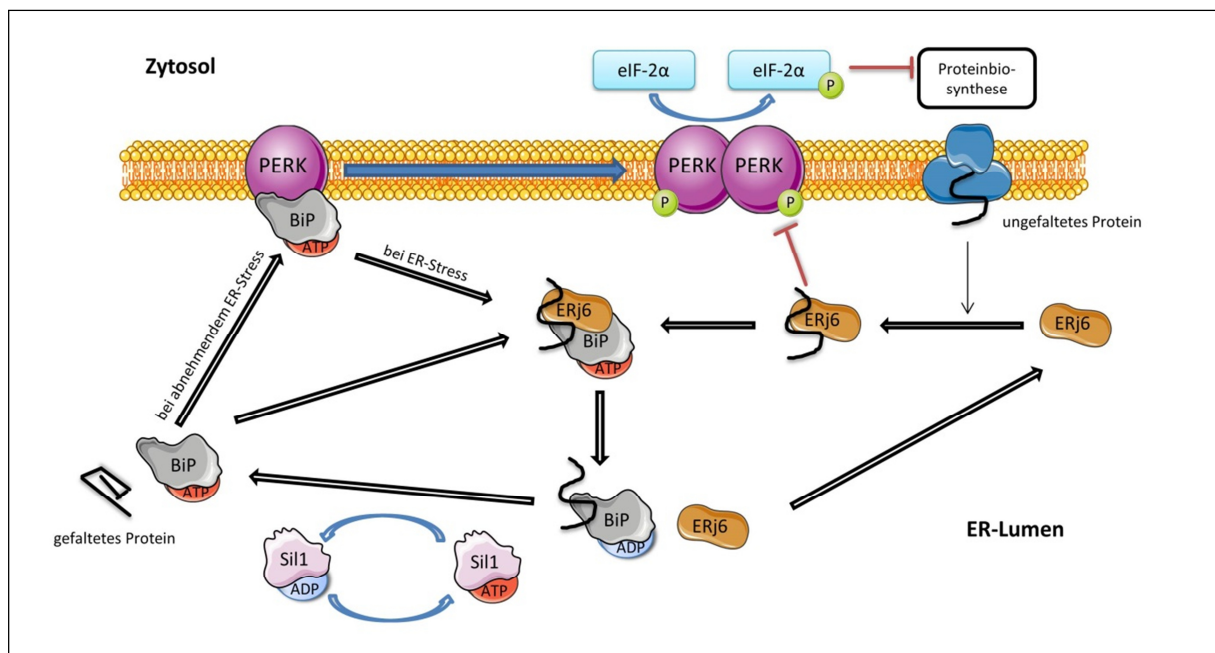


Abb. 2.5: Die Funktionen von ERj6. Zu sehen sind die beiden voneinander unabhängigen Funktionen von ERj6. Zum Einen bindet ERj6 un- oder missgefaltete Peptidketten, führt diese an BiP heran und initiiert die Bildung eines BiP-ERj6-Substratkomplexes. Vor der Ablösung von diesem stimuliert ERj6 BiPs ATPase-Aktivität, was zu einer festen Bindung zwischen BiP und Substrat führt. BiP beginnt nun seinen Zyklus aus ATP-abhängiger Bindung und Lösung vom Substrat und überführt dieses so in seine regelrecht gefaltete Form. Das verbrauchte ATP wird über NEFs wie Sil1 regeneriert. Im unbelasteten ER liegt BiP teilweise an die PERK gebunden vor und verhindert so deren Oligomerisierung. Im Rahmen der UPR wird BiP verstärkt im ER-Lumen benötigt. Es dissoziiert von der PERK, diese oligomerisiert, phosphoryliert sich selbst und beginnt damit den eIF-2α (Elongationsinitiationsfaktor der Translation) zu phosphorylieren. Dieser stellt dadurch seine Funktion ein, was die gesamte Proteinbiosynthese unspezifisch drosselt. ERj6 inhibiert die Kinaseaktivität der oligomerisierten PERK. Entsprechend ermöglicht es die Wiederaufnahme der PBS nach Reduktion der ER-luminalen Proteinlast.

2.4 Pathologien mit Bezug zu den Transportprozessen am ER

Durch die genetische Analyse von Tumorgeweben und daraus hergestellten Primärkulturen konnten in jüngerer Zeit diverse Mutationen in Genen, die redundante ER-Transport-Komponenten kodieren, nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden auch nicht neoplastische Erkrankungen mit Mutationen solcher Proteine in Verbindung gebracht [Zimmermann 2006, Luheshi und Dobson 2009].

Beispielsweise konnte für Subgruppen des Marinesco-Sjögren-Syndroms eine ursächliche Mutation im *SIL1*-Gen nachgewiesen werden [Senderek 2005]. Bei diesem

neurodegenerativen Syndrom kommt es durch einen Defekt im ER-luminalen NEF Sil1 (siehe 2.2) zum Untergang von Purkinje- und Körnerzellen der Kleinhirnlappen I bis VIII. In den betroffenen Zellen kann man eine Proteinakkumulation in ER und Zellkern sehen [Zhao 2005].

Der autosomal dominanten polyzystischen Lebererkrankung (ADPLD) liegt eine Mutation des *SEC63*-Gens zugrunde [Davila 2004, Müller 2011]. Mutationen des *PRKCSH*-Gens, das an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen im ER beteiligt ist, verursachen den gleichen Phänotyp.

Auf der anderen Seite konnten Bestandteile des ER-Transportkomplexes als mögliche Zielstrukturen antimikrobieller Therapie, zum Beispiel gegen Trypanosomen, dargestellt werden [Zimmermann und Blatch 2009, Patham 2009].

Im infektiologischen Rahmen konnte weiterhin eine Einflussnahme von Krankheitserregern auf Komponenten des ER gezeigt werden. So aktiviert zum Beispiel das Coxsackievirus B3 die UPR durch Herabregulation von ERj6 und Steigerung der Aktivität von CHOP und SREBP1 und bewirkt so die Apoptose seiner Wirtszelle [Zhang 2010]. Ein anderes Beispiel stellt die Interaktion der Cholera-Toxin Untereinheit A1 mit ERj3 dar [Massey 2011].

Bei den neoplastischen Erkrankung ist unter anderem zu erwähnen, dass in bestimmten Brustkrebszelllinien durch eine Hochregulation von ERj6 ein Arrest des Tumorwachstums erreicht werden konnte [Gao 2012]. Das *SEC62*-Gen konnte als prognoserelevanter genetischer Marker bei Patienten mit kolorektalem Karzinom identifiziert [Eschrich 2005] und in Prostata-, Schilddrüsen- und Lungenkarzinomzellen überexprimiert nachgewiesen werden [Jung 2006, Greiner 2010] (siehe 2.2.1).

Proteine des ER sind demnach an einer Vielzahl von menschlichen Erkrankungen kausal beteiligt. Ein fundiertes Verständnis ihrer Funktion und Interaktion sowie den pathogenetischen Mechanismen während der genannten und weiteren Krankheiten fehlt jedoch noch häufig.

2.5 Die UPR („*unfolded protein response*“) und ER-Stress

Ursprünglich bezeichnete der Begriff ER-Stress eine Situation, in der die Syntheserate neuer Proteine die zelluläre Kapazität zur Faltung und Modifikation dieser Proteine übersteigt und so die ER-Homöostase stört [Seyle 1985]. Der komplexe Signaltransduktionsmechanismus, der auf eine solche Überladung mit un- und fehlgefalteten Proteinen folgt, wird in seiner Gesamtheit als „*unfolded protein response*“ (UPR) bezeichnet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ER-Stress auch durch Fehler im Lipidmetabolismus, virale Infektionen, physiologische Differenzierungsprozesse und durch Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER bedingt sein kann [Calton 2002].

Die UPR führt zu spezifischen Veränderungen der Zellphysiologie. Um eine weitere Überladung des ER mit un- und fehlgefalteten Proteinen zu vermeiden, werden Transkription und Translation im Allgemeinen inhibiert. Auf der anderen Seite aber kommt es zu einer verstärkten Synthese von Chaperonen und Faltungsenzymen, sowie einer Induktion der ERAD (ER-assoziierte Proteindegradation). Weiterhin wird die Phospholipidsynthese angeregt, was zu einer Vergrößerung des ER führt [Harding 1999, Travers 2000]. Kann die Zelle den ER-Stress durch diese Maßnahmen nicht kompensieren, induziert sie die Apoptose. Bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen stellt diese Apoptoseinduktion den entscheidenden pathogenetischen Faktor dar [Davis 1999].

Man kann die Signaltransduktion des ER-Stress verschiedenster Genese auf drei „*pathways*“ mit den transmembranären ER-Schlüsselproteinen ATF6, IRE1 und PERK reduzieren [Schröder und Kaufmann 2005]. BiP ist in der Stresssituation vor allem für Faltung und Qualitätskontrolle intraluminaler Proteine verantwortlich und bindet seltener an die luminale Domäne von ATF6. Hierdurch kommt es auf bislang weitgehend ungeklärte Weise zu einem Transport von ATF6 zum Golgi-Apparat [Shen 2002]. Dort kommt es zur Spaltung von ATF6, wodurch sich der zytosolische Teil des Proteins löst und als Transkriptionsfaktor mit Leucin-Zipper-Struktur in den Zellkern transloziert wird, wo er mit Hilfe des „*nuclear factor Y*“ (NF-Y) an „*ATF/cAMP response elements*“ (CRE) und die „*ER-stress response systems*“ 1 und 2 (ERSE1, ERSE2) bindet.

IRE1 und PERK werden vermutlich dadurch aktiviert, dass unter ER-Stress ihre normalerweise BiP-besetzten Di- und Oligomerisierungsdomänen freigelegt sind [Liu 2002]. Durch Oligomerisierung können die Proteine ihre Funktionen aufnehmen. PERK beginnt in seiner aktivierten Form mit der Phosphorylierung des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 2α (eIF-2 α) und des Transkriptionsfaktor Nrf2. Die Phosphorylierung von eIF-2 α führt zu dessen Inaktivierung und somit zu einer Hemmung der gesamten Translationsmaschinerie. Im Gegensatz dazu wird Nrf2 aktiviert und bindet an „*antioxidant response elements*“ (ARE) der DNA [Cullinan 2003]. IRE1 aktiviert sich durch Oligomerisierung und Autophosphorylierung und erhält so eine funktionsfähige RNase-Domäne, die unspezifisch mRNAs spaltet, was ebenfalls zu einer allgemeinen Reduktion der Translationsvorgänge führt. Außerdem wird eine zytosolische Endoribonucleasedomäne IRE1 aktiviert, die spezifisch die mRNA des Transkriptionsfaktors XBP-1 spleißt. Dieser bindet anschließend an „*unfolded protein response elements*“ (UPRE), die sogenannte „*upstream repressing sequence 1*“ (URS1) und die „*subtelomeric ATF/CREB GTA variant elements*“ (SACE) [Cox und Walter 1996].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung von ATF6, IRE1 und PERK zur allgemeinen Hemmung der Translation mit gleichzeitiger Aktivierung mannigfaltiger Transkriptionsfaktoren führen. Die genannten Transkriptionsfaktoren dienen hierbei der Lenkung der Genexpression in eine für die Proteinfaltung und –degradation förderliche Richtung, zum Beispiel durch eine gesteigerte Lipidsynthese zur Vergrößerung des ER, eine gesteigerte Produktion von Chaperonen oder einer Aktivierung der ERAD. Im weiteren Verlauf kommt es auch zu einer Apoptoseinduktion durch vermehrten Einbau von Bax- und Bak-Oligomeren in die ER-Membran, wodurch es zu einem Anstieg des Ca^{2+} -Ausstroms aus dem ER kommt [Scorrano 2003]. Die daraufhin einsetzenden Vorgänge führen zum Zelltod. Wann die Zelle im Rahmen der UPR unweigerlich in die Apoptose eintritt und wann sie wieder zu ihrer physiologischen Funktion zurückkehrt ist derzeit Gegenstand der Forschung.

2.6 Mechanismen der Zellmigration

Da in dieser Arbeit unter anderem die Auswirkungen RNA-Interferenz basierter Depletion von ERj3 und ERj6 auf die Zellmigration untersucht wurden, sollen folgend deren molekularbiologische Grundlagen dargestellt werden.

Die zentralen Mechanismen der gerichteten Bewegung von Zellen stellen die Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten zur Bildung von Lamellipodien und Filopodien am sogenannten Leitsaum („*leading edge*“), sowie die Bildung von zum Beispiel Integrinen, die als Haftstrukturen zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett fungieren, dar [Pollard 2003]. Diese Prozesse werden durch sogenannte Chemokine in Gang gesetzt, die als zelluläre Lockstoffe wirken und über verschiedene Rezeptoren Signalkaskaden starten. So aktiviert beispielsweise die Bindung des „*hepatozyte growth factor*“ (HGF/SF) an den Rezeptor Met über mehrere Zwischenschritte unter anderem Rho-GTPasen und WASP/WAVE, die über Stimulation von Arp2/3 die Ausbildung eines Aktinnetzwerks am Führungssaum steuern und so zum „*branching*“, der Bildung von Lamelli- und Filopodien, führen [Birchmeier 2003]. Weiterhin aktivieren die Rho-GTPasen Integrine. Außer Arp2/3 spielen noch mannigfaltige andere mit Aktinfilamenten assoziierte Proteine eine wichtige Rolle bei der Migration, so zum Beispiel Profilin, das Aktinmonomere bindet oder F-Aktin-quervernetzende Proteine wie Filamin A und α -Aktinin [Svitkina und Borisy 1999]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Zellpolarität als wichtige Voraussetzung der Zellmigration unter anderem dadurch hergestellt wird, dass am Führungssaum vermehrt Phosphatidylinositol-3-4-5-triphosphat (PIP₃) bereitgestellt, am migrationsrichtungsabgewandten Pol jedoch vermehrt abgebaut wird, um so verschiedene Signalkaskaden unterhalten zu können.

Als eine Grundlage der Metastasierung von epithelialen Tumorzellen wurde ein Abbau des Proteins E-Cadherin, das große Wichtigkeit bei der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten spielt, nachgewiesen [Cavallaro 2001]. Ebenso wie die verstärkte Expression von Arp2/3 wird auch der übermäßige E-Cadherin-Abbau von Rho-GTPasen stimuliert [Kaibuchi 1999]. Adhäsionsmoleküle wiederum, die nicht der Bildung von Zell-Zell-Kontakten dienen, sondern die Zelle mit der Extrazellulärmatrix verbinden (zum Beispiel N-Cadherin), werden in diesen Tumorzellen verstärkt produziert [Li 2001].

Ca^{2+} konnte eine wesentliche Rolle bei der Zellmigration zugewiesen werden. So werden beispielsweise am der Bewegungsrichtung abgewandten Zellpol mechanisch aktivierte Ca^{2+} -Kanäle geöffnet, indem die amöboide Zellbewegung in Kombination mit noch bestehenden extrazellulären Haftkontakten einen Zug auf diese Kanäle ausübt. Der resultierende Ca^{2+} -Einstrom bewirkt den lokalen Abbau von Integrinen [Lee 1999]. Auch am Führungssaum übernimmt Ca^{2+} wichtige Aufgaben. So werden zum Beispiel die beiden Enzyme „*myosin-light-chain-kinase*“ (MLCK) und „*myosin-light-chain-phosphatase*“ (MLCP) durch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in ihrer Aktivität gesteuert und können so wiederum die Aktivität von Myosin II lenken. Myosin II ist ein für die Zellmigration unabdingbares Motorprotein, das mit Aktin interagiert und nur dann aktiv ist, wenn seine leichte Kette durch die MLCK phosphoryliert worden ist. Ein hoher intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel begünstigt dies und ist somit entscheidend für die gerichteten Bewegungsvorgänge am Führungssaum [Ridley 2003]. Weiterhin sind sowohl Zellmigration als auch –invasion von periodisch auftretenden, intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsspiques abhängig. Diese breiten sich in Form einer Ca^{2+} -Welle unidirektional in der Zelle aus. Maßgeblich an der Auslösung solcher Ca^{2+} -spikes beteiligt sind die sogenannten „*low voltage-activated*“ (LVA) und „*nonvoltage gated*“ (NVG) Ca^{2+} -Kanäle, deren Inhibition zu einem deutlich verringerten Migrations- und Invasionspotential der Zelle führt [Huang 2004]. Auch Integrine sind zur Beeinflussung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Lage, indem sie diese auf verschiedenen Wegen erhöhen und so ihre eigene Aktivierung hervorrufen [Sjaastad und Nelson 1997].

Im Zusammenhang der Krebsentstehung wurde gezeigt, dass unterschiedliche Tumoren (zum Beispiel Schilddrüsen- und Lungenkarzinome) den für die Zellmigration wichtigen Met-Rezeptor und dessen Ligand HGF/SF über dem Niveau gesunder Zellen synthetisieren [Birchmeier 2003]. Auf diese Weise stimulieren sie auto- und parakrin ihre eigene Migration. In anderen Untersuchungen wurde bei metastasierten Tumoren im Vergleich zu nicht metastasierten kein typisches Genexpressionsmuster nachgewiesen [Petersen 2000]. Einzig eine höhere Zahl genetischer Aberrationen (unter anderem gehäuft Deletionen des Chromosomenabschnitts 4p und 1q-Amplifikationen) wurde nachgewiesen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in den letzten Jahren viele Erkenntnisse zur Funktionsweise der Zellmigration gewonnen worden sind, die potentielle Angriffspunkte zur

antimetastatischen Tumorthherapie liefern. Die Umsetzung solcher Therapiekonzepte stellt einen wichtigen Schwerpunkt der heutigen Forschung dar.

2.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

Basierend auf den geschilderten Erkenntnissen zu Funktion und Pathophysiologie von Sec62 vor allem in Bezug auf Ca^{2+} -Homöostase, Migration und Proliferation in verschiedenen Tumorarten [Greiner 2011, Linxweiler 2012, Florian Bochen Masterarbeit], sowie den Beobachtungen, dass die Depletion des Hsp70-Chaperons BiP [Schäuble 2012] ebenso wie die Depletion von ERj3 oder ERj6 [Schorr 2015] zu einem erhöhten Ca^{2+} -Efflux aus dem endoplasmatischen Retikulum führt, wurden die Experimente dieser Arbeit durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Fragestellungen verfolgt. So sollten unter anderem im Rahmen einer Studie zum Interaktom von Sec62 bereits aus einer 2D-DIGE (zweidimensionale, differentielle Gelelektrophorese) und aus massenspektrometrischen Experimenten gewonnene Daten mithilfe der konventionellen SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot bestätigt werden.

Zur Vorbereitung der *in vivo* Untersuchung der beschriebenen „targeted therapy“ mit Calmodulin-Antagonisten und Thapsigargin SEC62-überexprimierender Tumoren [Linxweiler 2013] im Mausmodell war es von Nöten Zelllinien zu generieren, die gängigen tierschutzrechtlichen Standards entsprechen und gleichzeitig eine stabile Überexpression von SEC62 gewährleisten.

Den Schwerpunkt der Arbeit bildete die Untersuchung von ERj3 und ERj6. Hierbei wurde versucht nachzuweisen, dass die Depletion eines dieser Proteine phänotypisch nicht nur den erhöhten Ca^{2+} -Efflux bei Sec62-Depletion nachahmt, sondern auch die gleichen Effekte auf andere integrale Funktionen der Zelle zeigt. Um die klinische Relevanz der Hsp40-Cochaperone zu untermauern, wurden weiterhin Fibroblastenkulturen zweier Familien mit symptomatischer DNAJC3-Mutation auf Zeichen der UPR hin untersucht.

2. Einleitung

Demnach beschäftigt sich diese Arbeit mit der Rolle verschiedener ER-Komponenten in Bezug auf wichtige Funktionen der Zelle wie Migration und Proliferation sowie deren Interaktion untereinander.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Abimed, Düsseldorf:

ACEA Bioscience Inc., San Diego, CA, USA:

American National Can, Neenah, USA:

BD Biosciences, Bedford, MA, USA:

Beckman Instruments GmbH, München:

Eppendorf, Hamburg:

Fermentas Life Sciences, Waltham, MA, USA:

GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien:

Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim:

Gerhard Menzel, Braunschweig:

Greiner bio-one GmbH, Gremsmünster, Österreich:

Heraeus, Hanau:

IBS Integra, Fernwald:

Invitrogen GmbH, Karlsruhe:

IKA, Staufen:

Julabo, Seelbach:

KGW Isotherm, Karlsruhe:

Labortechnik Fröbel GmbH, Bodensee:

Millipore Co., Bedford, MA, USA:

Nikon, Tokio, Japan:

Qiagen, Hilden:

PAA, Pasching, Österreich:

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen:

Pharmacia Biotech, Schweden:

Gilson-Pipetten

E-Plate 96

Parafilm® M

Zellkulturflaschen, Falcon Inserts HTS

Fluoro-Blok

L-80 Ultracentrifuge, 80-Ti-Rotor, 26,3 ml

Polycarbonate Centrifuge Bottles

Tischzentrifuge (Centrifuge 5415),

Heizinkubator (Thermostat 5320)

Page Ruler Prestained Protein Ladder

Typhoon-Imager

Sterilbank TC72

Objektträger unbeschichtet, Deckgläser
rund

Gewebe- und Suspensionskulturflaschen
250ml (75cm²), 50 ml (25cm²); Zellkultur-

Multiwell-Platten 6, 12, 24, 96 Well-

Platten; Zellkulturschalen Ø 3,5 cm, 6 cm;

Cryo-s Kryoröhrchen

Bactifuge

Pipetboy acu

GIBCO DMEM + GlutaMAX; OPTI-MEM I +
GlutaMAX; PBS pH 7,2; Countess
(automated cell counter)

Magnetrührer Combimag RCT

Wasserbäder

Dewargefäße

Can-1000 Evaporator

Immobilion-P-Transfermembranen
(Porengröße 0,45µm)

Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-S; NIS-
Elements-Software

HiPerFect Transfection Reagent

RPMI 1640 Ready Mix, Ham's F12 + L-
Glutamin

Fusion SL ADVANCE, FusionCapt

Pump P-1

3. Material und Methoden

PIERCE, Rockford, IL, USA:	Disposable Polystyrene Columns, Porous Polyethylene Discs, Top Caps, Bottom Caps
Roche, Mannheim:	FuGENE HD Transfection Reagent, xCELLigence Real Time Cell Analyzer
Sarstedt, Nümbrecht:	Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (1,5 ml), Zentrifugierröhrchen (15 ml, 50ml)
Sartorius, Göttingen:	Feinwaagen BP 61, BP 4100, LA 420
Schleicher und Schüll, Dassel:	Filterpapier DE81
Schütt. Göttingen:	Autoklav
Scientific Industries, Bohemie N.Y., USA:	Vortex-Mixer (Genie 2™)
Sigma Aldrich, Steinheim:	Glass beads, L-Glutamin
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA:	Brutschrank HeraCell 150i
Waters-Millipore, Milford, PA, USA:	Milliporewasseranlage Milli-Q
WTW, Wertheim:	pH-Meter pH537
Zeiss, Jena:	Binokulares Mikroskop Axilab 40

Elektrophoresekammern (Eigenbau der Werkstatt Biochemie 1, Göttingen)

3.1.2 Chemikalien

Acrylamid 4x solution, 40% (w/v)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Bisacrylamid 20% (w/v)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Bromphenolblau, Na-Salz	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
CHAPS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI	Sigma, Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 99%, vergällt mit 1% MEK	Zentrales Chemikalienlager, UKS
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
G418 (Geneticin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin kristallin	Merck, Darmstadt
Glycerin, p.a.	Merck, Darmstadt
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lipofectamine® LTX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Magermilchpulver Sucofin, leicht löslich	TSI, Zeven
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

3. Material und Methoden

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nonidet-P40	USBio Salem, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PMSF	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Poly-L-Lysin 0,1% (w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti® Mount Fluor Care DAPI	Carl Roth, Mannheim
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TEMED	Millipore, Bedford, USA
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X100	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Trypan Blau 0,4%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-tremeGENE™ HP	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 RNA-Oligonukleotide

Tab 3.1: Zur Proteindepletion (siehe Kapitel 3.2.4) verwendete siRNAs (short interfering Ribonucleic Acid).

NAME	ZIELGEN	SEQUENZ (sense-Strang)	VERWENDETE KONZENTRATION
ERJ3#1 (human)	<i>ERJ3</i>	CGAAUGCCCUAAUGUCAAAAtt	20 nM
ERJ3#2 (human)	<i>ERJ3</i>	GGAGAACCUAGGAAAGCUAtt	20 nM
ERJ3#3 (human)	<i>ERJ3</i>	CCUGAGUUUCAAGAAUUAAtt	20 nM
ERJ6#1 (human)	<i>ERJ6</i>	GGAGAACCUAGGAAAGCUAtt	20 nM
ERJ6#2 (human)	<i>ERJ6</i>	GAAACGAGAUUAUUUAAAAtt	20 nM
SEC62#1 (human)	<i>SEC62</i>	GGCUGUGGCCAAGUAUCUUt	20 nM
SEC62UTR (human)	<i>SEC62</i>	CGUAAAGUGUAUUCUGUActt	20 nM
SEC62#1 (murin)	<i>SEC62</i>	GGCUGUGGCCAAGUAUCUUt	20 nM
Kontroll siRNA	-	Nicht bekannt	10 – 35 nM

3. Material und Methoden

3.1.4 Plasmide zur Transfektion von Zelllinien

Tab 3.2: Zur Transfektion von Zelllinien verwendete Plasmide. Uds = Universität des Saarlandes

NAME	CODIERTE PROTEINE	RESISTENZ	HERKUNFT
pcDNA3-IRES-GFP-LV MEGA 3113 AZ	GFP	G418	PD Dr rer nat Ulrich Wissenbach, Uds
pcDNA3-IRES-GFP Sec62 HS VL	GFP, humanes Sec62	G418	Julia Benedix, Uds
pcDA3-IRES-GFP EF I.1 Sec62 MutC	GFP, humanes Sec62 D308A	G418	Stefan Schorr, Uds

3.1.5 Primärantikörper

Tab 3.3: Verwendete Primärantikörper. IF = Immunfluoreszenz, WB = Western Blot. Die Herstellung aller an der Uds gewonnen Primärantikörper erfolgte durch Dr. Martin Jung (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes)

ANTIKÖRPER	HERSTELLUNG, SPEZIES	VERDÜNNUNG IF	VERDÜNNUNG WB	HERKUNFT
α - β -Aktin	Monoklonal, Maus	-	1 : 5000	Sigma
α -Sec62	Polyklonal, Kaninchen	-	1 : 500	Uds
α -Sec62, affinitätsgereinigt	Polyklonal, Kaninchen	1 : 100	-	Uds
α -ERj3	Polyklonal, Kaninchen	-	1 : 250	Uds
α -ERj6	Monoklonal, Kaninchen	-	1 : 1000	Cell Signaling
α -GRP170	Polyklonal, Kaninchen	-	1 : 1000	Uds
α -ERC1	Monoklonal, Kaninchen	-	1 : 1000	bethyl
α -DIS	Polyklonal, Kaninchen	-	1 : 1000	abcam
α -HSP70	Monoklonal, Ratte	-	1 : 1000	StressGen
α -EP58	Monoklonal, Maus	-	1 : 250	
α - β IG-H3 (murin)	Monoklonal, Ratte	-	1 : 500	R&D Systems
α -Vimentin-Cy3	Monoklonal, Maus	-	1 : 1000	Sigma Aldrich
α -Striatin 3	Monoklonal, Maus	-	1 : 1000	Thermo Scientific
α -Prohibitin	Polyklonal, Kaninchen	-	1 : 1000	abcam

3.1.6 Sekundärantikörper

Tab 3.4: Verwendete Sekundärantikörper.

ANTIKÖRPER	SPEZIES	MARKIERUNG	VERDÜNNUNG WB	HERKUNFT
α -Kaninchen	Ziege	ECL™ Plex Cy5	1 : 1000	Sigma
α -Maus	Ziege	ECL™ Plex Cy3	1 : 2500	Sigma
α -Ratte	Ziege	ECL™ Plex Cy5	1 : 1000	Sigma
α -Kaninchen	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1 : 1000	Sigma
α -Maus	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	1 : 20000	Sigma
α -Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor® 594	1 : 1000	Invitrogen

3.1.7 Raue Mikrosomen

Raue Mikrosomen (RM) sind aus Hundepankreas hergestellte Vesikel des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER). Diese beinhalten für gewöhnlich alle Bestandteile des Ausgangsorganells und können so hervorragend als Positivkontrolle bei der immunologischen Detektion von ER-Komponenten in Zelllysaten bei der Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 3.3.3) verwendet werden. Die Präparation der RMs erfolgte nach etablierten Protokollen. [Walter und Blobel 1983]

3.2 Methoden der Zellkultur

3.2.1 Kultivieren von Säugerzellen

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit HeLa-, LNCaP-, LLC1- und HEK293-Zellen durchgeführt. Des Weiteren kamen Fibroblastenkulturen zweier Familien mit und ohne symptomatische Mutation im *DNAJC3*-Gen zum Einsatz. Die Kulturbedingungen jeder einzelnen Zelllinie sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

3. Material und Methoden

Erreichte die Dichte adhärent wachsender Zellen 80 bis 90%, wurden sie in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gesplittet. Hierzu musste das Medium abgesaugt werden. Es folgte eine Waschung der Zellen mit PBS-Puffer zur Entfernung von FCS-Resten. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung für zehn Minuten bei 37°C behandelt. Durch Zugabe von Medium wurden das Trypsin inaktiviert und die Zellen mechanisch vom Boden der Kulturgefäße abgelöst. Nach Überführung in ein 15 ml Falcon-Röhrchen bzw. 1,5 ml Eppendorfgefäß folgte eine Zentrifugation der geernteten Zellen (5 min, 600 rpm, Heraeus Bactifuge bzw. 3 min, 3000 rpm, Eppendorf Tischzentrifuge), deren Resuspendierung und neuerliche Aussaat im gewünschten Verdünnungsverhältnis mit frischem Medium.

Tab 3.5: Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien. DMEM = *Dulbecco's modified Eagle medium*, FCS = fetales Kälberserum, Lk = Lymphknoten, Ca = Karzinom, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute medium*, L-Gln = L-Glutamin, G418 = Geneticin, P / S = Penicillin / Streptomycin

ZELLINIE	BESCHREIBUNG	MEDIUM	TEMPERATUR	CO ₂ -ATMOSPHERE
HeLa	humanes Zervixkarzinom	DMEM + GlutaMAX, 10% FCS, 1% P/ S	37°C	5%
LNCaP (ohne Plasmid)	humane Lk-Metastase, Prostata-Ca	RPMI, 10% FCS, 1% P/ S, 1% L-Gln	37°C	5%
LNCaP (stabil transfiziert)	humane Lk-Metastase, Prostata-Ca	RPMI, 10% FCS, 1% P/ S, 1% L-Gln, 1% G418	37°C	5%
HEK293 (stabil transfiziert)	humane embryonale Nierenzellen	DMEM + GlutaMAX, 10% FCS, 1% P/ S, 1% G418	37°C	5%
LLC1	murines Lungenkarzinom	DMEM/ Ham's F-12, 10% FCS, 1% P/ S	37°C	5%
Fibroblasten	humane Gewebeproben	DMEM + GlutaMAX, 10% FCS, 1% P/ S	37°C	5%

3.2.2 Ernten von Säugerzellen

Das Ablösen der Zellen erfolgte wie beim oben beschriebenen „*splitting*“. Die so in ein 15 ml Falcon-Röhrchen bzw. 1,5 ml Eppendorfgefäß überführten Zellen wurden unter Zuhilfenahme der Invitrogen Countess™ mit simultaner Vitalitätsbestimmung gezählt. Es

folgte eine Zentrifugation der Zellen wie in 3.2.1 beschrieben. Nach Absaugen des Überstandes wurden die entstandenen Zellpellets in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und abermals vom Überstand befreit. Die so aufbereiteten Pellets wurden bei -20°C gelagert.

3.2.3 Zählung mittels „Countess automated cell counter“

Fast jedes der nachfolgend beschriebenen Experimente erforderte die Zählung der untersuchten Zellen. Für diese wurden nach der Ernte (siehe Kapitel 3.2.2) der Zellen 12 µl der Zellsuspension entnommen und mit 12 µl Trypan-Blau-Lösung vermischt. Circa 10 µl der Mischung wurden auf einen speziellen Objektträger des Herstellers pipettiert und in das Countess-System eingeführt. Hier erfolgte eine Bestimmung der Gesamtzellzahl, der Anzahl lebender beziehungsweise toter Zellen sowie der Zellvitalität.

3.2.4 Posttranskriptionelles Gen-„silencing“ auf Basis von RNA-Interferenz

Dieses Verfahren dient der gezielten Herabregulation (sog. „*knock down*“) einer mRNA, die für ein bestimmtes Protein codiert. Hierzu wird die untersuchte Zellpopulation mehrfach mit einer entsprechenden „*short interfering RNA*“ (im Folgenden „siRNA“) transfiziert. Auf diese Weise kann man meist, bezogen auf untransfizierte beziehungsweise mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen, eine Restproteinmenge von <20% erreichen. In Abbildung 3.1 soll das Prinzip dieser Methode veranschaulicht werden.

Die zu untersuchenden Zellen wurden am Vortag der ersten siRNA-Transfektion in einem Verhältnis von 1:2 in 75cm² Zellkulturflaschen gesplittet. Nach 24 Stunden weiterer Kultivierung erfolgte eine Aussaat von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Transfektionsansatz in ein Well einer 6-Well-Platte. Für jeden Ansatz wurden nun 1,2 µl siRNA (entsprechen einer siRNA-Endkonzentration von 10nM) in 86,8µl OptiMEM verdünnt. Hierzu wurden je 12µl HiPerfect Transfektionsreagenz zugegeben und die Lösung anschließend zehn Sekunden lang gevortext.

3. Material und Methoden

Vor der tropfenweisen Verteilung über den Zellen, inkubierte das Gemisch zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nach weiteren 24 Stunden erfolgten ein Mediumwechsel sowie eine Nachtransfektion, identisch zu dem am Vortag durchgeführten Protokoll. Die Zellen wurden weitere 48 Stunden kultiviert und nach der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Art und Weise geerntet. Es erfolgte stets eine Überprüfung der Effizienz des „silencings“, sprich des Restgehaltes des zu depletierenden Proteins, per Western Blot. Der minimale Restproteingehalt konnte in der Regel 48 Stunden nach der zweiten Transfektion erreicht werden.

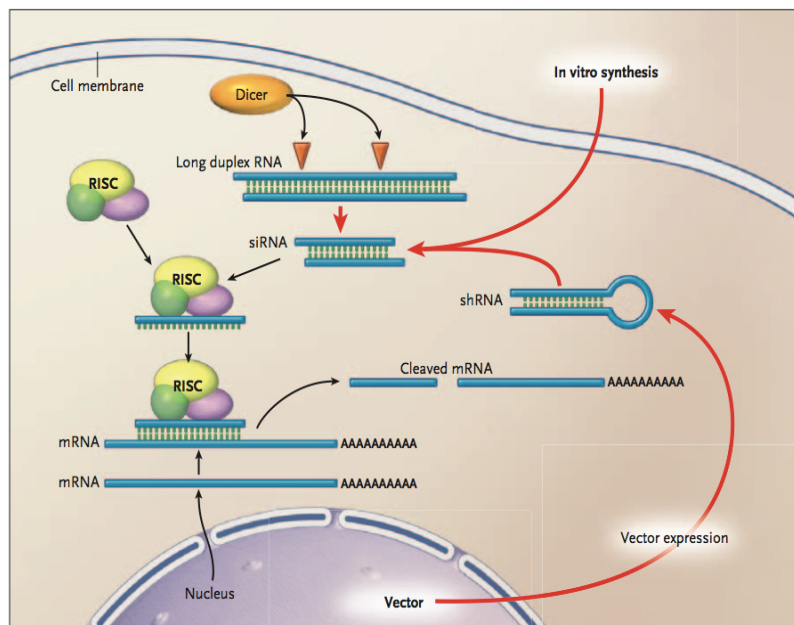


Abb. 3.1: Funktionsprinzip des RNA-Interferenz basierten Gen-„silencing“ [nach Bernards 2006]. Das Enzym „Dicer“ mit Ribonukleaseaktivität schneidet zunächst die aktive siRNA – eine doppelsträngige RNA mit jeweils zwei endständig überstehenden Nukleotiden, die insgesamt zwischen 19 und 23 Basen besitzt – aus einer Vorläufer-RNA (dsRNA oder shRNA) heraus. Diese schließt sich nun mit mehreren Proteinen zum sog. RISC zusammen. Die hier einzelsträngig vorliegende RNA bindet nun an eine komplementäre mRNA, was schlussendlich zu deren selektiver Degradation führt. dsRNA = double-stranded RNA, shRNA = short hairpin RNA, RISC = RNA-induced silencing complex, mRNA = messenger RNA

3.2.5 Plasmidtransfektion

Am Vortag der Plasmidtransfektion wurden die Zellen in dem Verhältnis von 1:2 in 75 cm² Zellkulturflaschen gesplittet. Nach 24 Stunden weiterer Kultivierung erfolgten Ernte (siehe Kapitel 3.2.2) und anschließende Aussaat von pro Transfektionsansatz $2,4 \times 10^5$ Zellen in 6-Well Zellkulturplatten beziehungsweise $5,4 \times 10^5$ Zellen in 6 cm durchmessende Zellkulturschalen. Da eine Plasmidtransfektion nur mit fest am Kulturgefäß angewachsenen Zellen durchführbar ist, musste nach Aussaat mindestens fünf Stunden weiterkultiviert werden.

Die Herstellung der Transfektionsansätze geschah je nach verwendeter Zelllinie und Bestimmung der transfizierten Zellen mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien und entsprechend voneinander verschiedenen Protokollen. Verwendet worden sind FuGENE® HD, X-tremeGENE™ HP und Lipofectamine® LTX. Für letzteres siehe Kapitel 3.2.6.

FuGENE® HD und X-tremeGENE™ HP wurden gleich verwendet. Hier wurden 2 µg beziehungsweise 4 µg des gewünschten Plasmids sowieso 8 µl bzw. 16 µl ad 100 µl OptiMEM-Medium gegeben und mindestens 10 Sekunden gevortext. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde der Ansatz schließlich tropfenweise auf die Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der entsprechenden Platte gleichmäßig verteilt. Nach mindestens 24 Stunden der weiteren Kultivierung wurden die Zellen nach Kapitel 3.2.2 geerntet und für weitere Versuche verwendet. Stets wurde per Western Blot die Expression des plasmidkodierten Gens verifiziert und quantifiziert.

3.2.6 Herstellung einer stabil *SEC62*-überexprimierenden Zelllinie

Hierfür wurden LNCaP-Zellen und das Lipofectamine® LTX Transfektionsreagenz mit PLUS Reagent verwendet. Zunächst erfolgte die Aussaat von jeweils $5,4 \times 10^5$ Zellen in 6 cm durchmessende Zellkulturplatten. Pro verwendeten Plasmids wurden vier Ansätze

hergestellt. Nach 24 Stunden der weiteren Kultivierung wurden für jeden Ansatz 4 µg Plasmid in 500 µl OptiMEM verdünnt. Hierzu wurden jeweils 4 µl PLUS Reagent gegeben und zehn Sekunden gevortext. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von je 18 µl Lipofectamine LTX Transfektionsreagenz. Nachdem abermals für zehn Sekunden gevortext worden ist, inkubierte der Ansatz zehn Minuten bei Raumtemperatur bevor er tropfenweise auf die Zellen pipettiert und mit leichtem Schwenken gleichmäßig verteilt worden ist.

Die so behandelten Zellen wurden 48 Stunden weiter kultiviert. Hiernach erfolgte eine Ernte nach Kapitel 3.2.2 und Vereinigung der jeweils vier Ansätze pro Plasmid in je eine 75 cm² Zellkulturflasche. Selbstverständlich wurden Zellen für die anschließende Western Blot Kontrolle der gewünschten Überexpression entnommen. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit 500 µg/ml G418 (Geneticin) enthaltendem RPMI-Medium. Dieser wurde alle 48 Stunden wiederholt, um eine vollständige Selektion plasmidexprimierender Zellen zu erreichen. Sobald die Zelldichte ihr Minimum erreicht hatte, wurden die Mediumwechsel alle 24 Stunden durchgeführt. Hatte die Population sich erholt, wurde diese sogenannte Präselektion geerntet und nach Kapitel 3.2.7 kryokonserviert. Ebenfalls wurden einige Zellen zur Western Blot-Kontrolle der bestehenden Plasmidexpression benutzt. Ein Teil der Präselektion wurde zur Herstellung einer monoklonalen Zelllinie verwendet. Hierzu erfolgte die Aussaat jeweils einer einzelnen Zelle in jeweils ein Well einer 96-Well Zellkulturplatte. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig überwacht, bei hoher Konfluenz erfolgte die Umsaat in ein größeres Kulturgefäß.

3.2.7 Kryokonservierung humaner Zellen

Zunächst erfolgte eine Ernte der Zellen nach Kapitel 3.2.2 und Zählung nach Kapitel 3.2.4. Des Weiteren wurden zwei Konservierungslösungen hergestellt. Lösung I enthielt 40% (v/v) FCS in dem jeweils verwendeten Medium, Lösung II 20% (v/v) DMSO in dem jeweils verwendeten Medium. Nach Ernte und Zählung wurden je 3×10^6 Zellen in 750 µl Lösung I resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen gegeben. Unter ständigem Schütteln wurden nun tropfenweise 750 µl Lösung II hinzugegeben und die Zellsuspension anschließend auf

-80°C abgekühlt. Nach mindestens 90 Minuten wurden die Zellen in -196°C kalten, flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung kultivierter Zellen

Am ersten Tag des Versuchs wurden die zu untersuchenden Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 gesplittet. Am selben Tag erfolgte eine Inkubation von 22 mm durchmessenden Deckgläsern in einer Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Deckgläser zweimal jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen, in eine 6-Well Zellkulturplatte überführt und mit jeweils 2x10⁵ Zellen beschichtet. Die Deckgläser dienten einer besseren Haftung während des Färbevorgangs.

Nach weiteren 24 Stunden der Kultivierung wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und einem dreiminütigen Waschschrift unter Lichtausschluss bei 4°C mit Paraformaldehyd fixiert. Nach 20 Minuten erfolgten vier je fünfminütige Waschschriften mit einer Stopplösung (PBS 1fach Lösung, Glycin 0,1 M, MgCl₂ 4 mM).

Es folgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation der fixierten Zellen in PSS-Lösung (PBS 1fach Lösung, FCS 10%, Saponin 0,1% (w/v)). Diese hat mehrere der Färbung positiv zukommende Effekte: Zum einen kommt es zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, zum anderen werden unspezifische Proteinbindungsstellen durch die Bestandteile des fetalen Kälberserums blockiert. Des Weiteren kommt es durch die Zugabe von RNase u.a. zur Degradation ribosomaler RNA, was insbesondere der Detektierbarkeit von ER-Membranproteinen und hier vorallem Bestandteilen des Translokasekomplexes (z.B. Sec62) zugutekommt [Müller et al. 2010].

Nach Absaugen der PSS-Lösung erfolgte unter ständiger sanfter Durchmischung eine einstündige Inkubation der Zellen mit dem gewünschten, entsprechend den Angaben in Tabelle 3.3 in PSS verdünnten Primärantikörper. Nach zwei jeweils fünfzehnminütigen Waschschriften in PSS wurde das Prozedere mit einem entsprechenden Sekundärantikörper wiederholt.

3. Material und Methoden

Die vom Sekundärantikörper befreiten und zweifach für 15 Minuten in PSS gewaschenen Deckgläser wurden schließlich mit einem Tropfen des DAPI-enthaltenden (blau fluoreszierender Kernfarbstoff) Roti-Mount® Eindeckmediums auf Objektträger überführt. Nach ca. 24 Stunden war das Eindeckmittel ausgehärtet und es konnte die Begutachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

Tab 3.6: Stopplösung.

PBS	1 -fach
Glycin	0,1 mM
MgCl ₂	4 mM

Tab 3.7: PSS.

PBS	1 -fach
FCS	10% (v/v)
Saponin	0,1% (w/v)

3.2.9 Analyse der Aktinmorphologie mithilfe der Phalloidin-FITC Färbung

In diesem Verfahren macht man sich das zyklische Alkaloid Phalloidin des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) zu Nutze. Dieses weist eine hohe Affinität zu filamentösem Aktin (F-Aktin) auf und hemmt im lebenden Organismus bei Intoxikation die Aktindepolymerisation und somit auch alle mit einer Assoziation beziehungsweise Dissoziation von Aktin einhergehenden Bewegungsvorgänge.

Mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertes Phalloidin kann ähnlich einem Antikörper verwendet werden, um die Morphologie des Aktin-Zytoskeletts kultivierter Zellen zu beurteilen. Die Färbung wurde analog zu Kapitel 3.2.8 durchgeführt. Anstatt des Primärantikörpers fand jedoch 1:25 in PSS verdünntes FITC-Phalloidin Verwendung. Alle Inkubationsbedingungen und restlichen Schritte des Färbeprotokolls wurden unverändert beibehalten.

3.2.10 Migrationsassay mit dem FluoroBlok-Insert-System

Mithilfe des FluoroBlok-Insert-System von BD Falcon wurde das Migrationsverhalten von Tumorzellen untersucht. Hauptbestandteil der Versuchsanordnung sind spezielle Einsätze für 24-Well Zellkulturplatten.

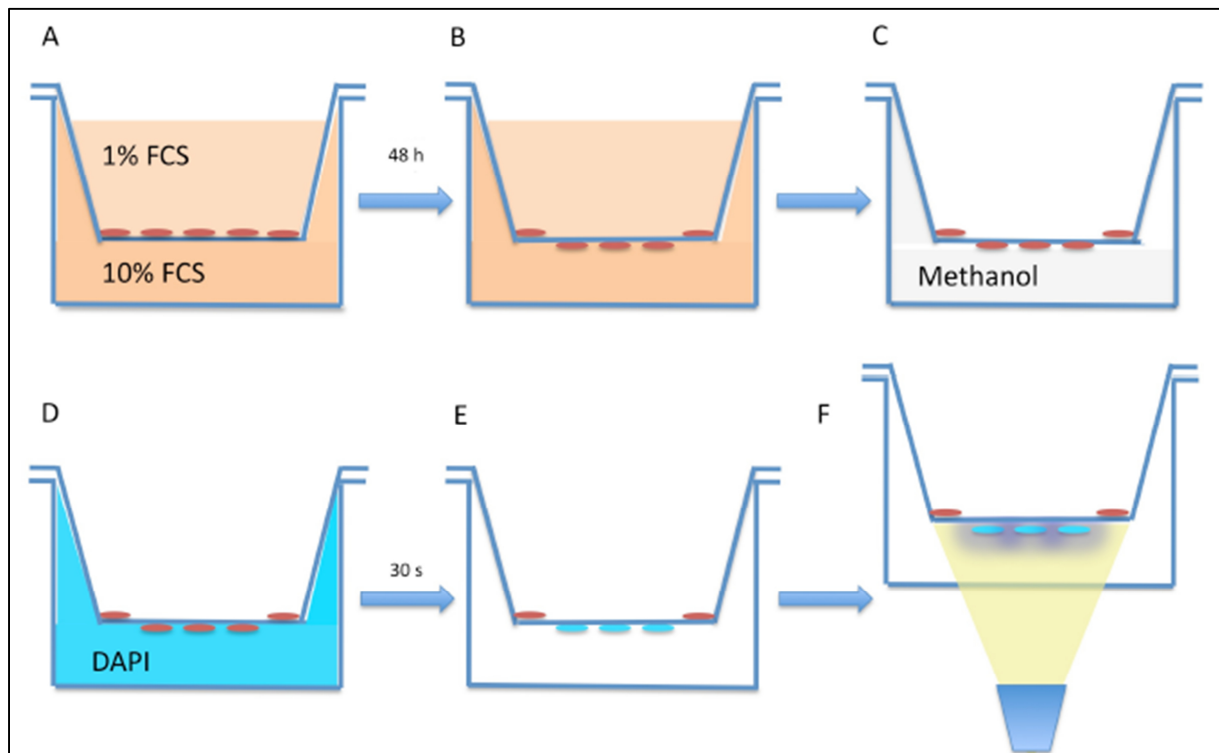


Abb. 3.2: Funktionsprinzip eines Migrationsassays mit dem FluoroBlok-Insert-System [nach Linxweiler 2011]. Zunächst wurden die Wells einer 24-Well-Platte mit je 1400 µl Zellkulturmedium (10% (v/v) FCS) aufgefüllt, anschließend wurden die eingesetzten FluoroBlok-Inserts mit $2,5 \times 10^4$ Zellen in 500 µl Medium (1% (v/v) FCS) versehen (A). Der so erzeugte FCS-Gradient dient den Zellen als Anreiz zur Migration. In diesem Zustand werden die Zellen für 48 Stunden kultiviert (B). Hiernach wurde das Medium aus Wells und Einsätzen abgesaugt, die Zellen je eine Minute in PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 4°C kaltem Methanol fixiert (C). Es folgten drei weitere Waschschrte für je drei Minuten in PBS und eine siebenminütige Inkubation bei Raumtemperatur und unter lichtgeschützten Bedingungen in PBS mit 0,1% (v/v) DAPI. (D). Schließlich wurde erneut drei Mal drei Minuten lang mit PBS gewaschen (E). Nun konnten die migrierten Zellen bei 450 nm durch ein Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (F).

Der aus einer Polyethylenterephthalat-Membran bestehende Boden dieser Einsätze misst $0,3 \text{ cm}^2$ und ist mit 8 µm durchmessenden Poren in einer Dichte von $8 \times 10^5 \text{ Poren/cm}^2$

durchsetzt. Die Membran blockiert effizient Licht aller Wellenlängen zwischen 490 und 700nm, wodurch sogenannte „*bottom-reading*“ Systeme an Fluoreszenzmikroskopen aus dem oberen Teil des Einsatzes ausgehende Signale nicht detektieren können. Zellen, die jedoch durch die Poren hindurch auf die Unterseite der Membran gewandert, sprich migriert sind, können nach Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol = DAPI) dargestellt werden. Dieses ist DNA-interkalierend und färbt so den Zellkern selektiv an. Demnach kann das beschriebene System genutzt werden, um Zellen nach unterschiedlicher Behandlung auf ihre Migrationsfähigkeit hin zu untersuchen und anschließend zu quantifizieren.

Hierfür wurden zunächst die Wells einer 24-Well Zellkulturplatte mit jeweils 1,4 ml des entsprechenden Zellkulturmediums (10% (v/v) FCS) aufgefüllt. Nachfolgend wurde jedes Well mit einem FluoroBlok-Einsatz bestückt. Diese wurden mit 500 µl des gleichen Zellkulturmediums (1% (v/v) FCS) befüllt und anschließend mit je $2,5 \times 10^4$ Zellen der zu untersuchenden Kultur beladen.

Der erhebliche FCS-Gradient dient den Zellen als Migrationsanreiz in Richtung der höher konzentrierten Lösung. Nach 48 Stunden der Migration wurde ein Endpunkt festgelegt und die bis dahin migrierten Zellen detektiert und quantifiziert. Hierfür wurden die Zellen zunächst für eine Minute in PBS gewaschen. Es folgte eine zehnminütige Fixierung in 4°C kaltem Methanol. Nach drei dreiminütigen Waschschritten in PBS wurden die Zellen für sieben Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt in PBS mit 0,1% (v/v) DAPI überführt und anschließend abermals drei Mal für je drei Minuten in PBS gewaschen.

Schließlich folgte die Detektion der migrierten Zellen bei 450 nm Detektionswellenlänge mit einem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.11 Echtzeit-Analyse der Proliferation (xCELLigence)

Um die Proliferation humaner Zellen in Echtzeit zu messen wurde das xCELLigence-System von Roche verwendet. Hauptbestandteil sind hier 96-Well-Zellkulturplatten (E-Plate-96), deren Bodenflächen mit vielen kleinen Goldelektroden beschichtet sind. Während des

3. Material und Methoden

Messvorgangs fließt zwischen den Elektroden eines Wells permanent Strom. Ein zentraler Sensor erfasst die elektrischen Parameter dieses Stromkreises und leitet diese an einen Computer mit entsprechender Software weiter.

Zur Darstellung des Zellwachstums wird die Impedanz verwendet. Stärkeres Zellwachstum bedingt eine größere Bedeckung des Well-Bodens und somit auch eine zunehmende Überwachung der Elektroden. Diese behindert den Stromfluss, so dass die Impedanz proportional zur überwachsenen Fläche steigt. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass zu jedem beliebigen Zeitpunkt eine Aussage über das Zellwachstum getroffen werden kann, ohne im Sinne eines Endpunktmessverfahrens den Versuch abbrechen zu müssen.

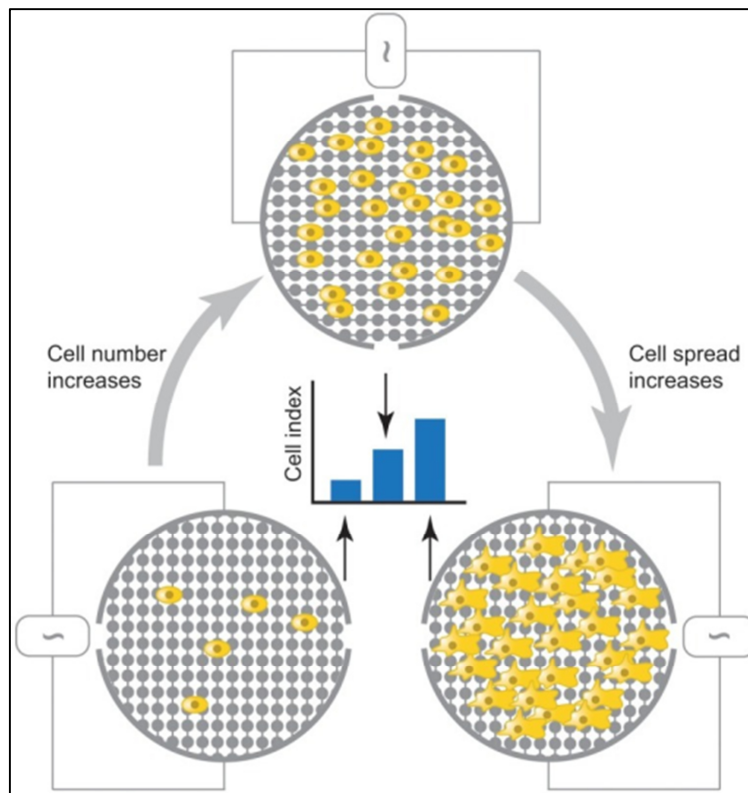


Abb. 3.3: Funktionsprinzip einer Echtzeit-Proliferationsanalyse mit dem xCelligence-System [nach Limame et al 2012]. Zunächst wurden 5000 beziehungsweise 2500 Zellen pro Well in der E-Plate-96 ausgesät. Nach Festwachsen am Plattenboden und somit den Goldelektroden wird zunächst eine geringe Erhöhung der Zellzahl und somit der Impedanz gemessen. Proliferieren die ausgesäten Zellen, so wird die überwachsene Fläche am Boden des Wells größer, der Zellindex steigt. Da sich Zellen durch Veränderungen ihres Zytoskeletts flächig ausbreiten können, ist dies ebenfalls ein Mechanismus, der zu einem steigenden Zellindex beitragen kann.

3. Material und Methoden

Die graphische Auswertung erfolgt in Form einer Zellindex-Zeit-Kurve. Der Zellindex ist hierbei eine einheitslose Größe, die direkt von der Impedanz abgeleitet wird.

Zur Durchführung eines Experiments wurde jedes Well einer E-Plate-96 zunächst mit 50 µl Zellkulturmedium versehen. Nach Vorbereitung der Software erfolgte eine 30sekündige Hintergrundmessung, um die Hintergrundimpedanz des Mediums als Nullabgleich heranziehen zu können. Anschließend wurden pro Well 5×10^3 der zu untersuchenden Zellen ausgesät und das Volumen auf 100 µl pro Well mit Zellkulturmedium aufgefüllt.

Für diese Dissertation wurde das Proliferationsverhalten von Zellen unter Thapsigargin-induziertem ER-Stress untersucht. Hierfür wurden die Wells auf 150 µl mit Zellkulturmedium aufgefüllt und im Sinne einer Verdünnungslinie mit 0,1% (v/v) DMSO, 2,5 nM, 5 nM und 10nM Thapsigargin in DMSO (1 M) versehen.

Die Proliferation wurde anschließend für einen Zeitraum von 120 Stunden gemessen.

3.3 Methoden der Proteinbiochemie

3.3.1 Herstellung von Zelllysat

Tab 3.8: 1x Lämmli-Lösung.

Tris/HCl pH 6,8 60mM	3 ml
87% Glycerin	5,75 ml
10% SDS	10 ml
H ₂ O	28,75 ml
Bromphenolblau	1 Spatelspitze
β-Mercaptoethanol	5% (v/v)

Zellen, die für eine Western-Blot-Analyse bestimmt waren, wurden zunächst wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben mit Trypsin-EDTA geerntet und anschließend nach Kapitel 3.2.3 gezählt. Die in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführten Zellen wurden nun drei Minuten lang bei

3. Material und Methoden

3000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde vom Mediumüberstand befreit und bei Bedarf bei -20°C zur Lagerung eingefroren.

Für die Lyse wurde 1x Lämmli-Lösung verwendet. Hierfür wurden je 10^5 Zellen in je $10\ \mu\text{l}$ 1x Lämmli aufgenommen und mit einer Spatelspitze Glasperlen versetzt. Nach zehninütigem Erhitzen bei 56°C wurden die Proben für 30 Minuten auf dem Vortex gemischt, um einen optimalen Zellaufschluss zu erreichen.

3.3.2 SDS-PAGE

Als eine der nach wie vor am häufigsten verwendeten Methoden der Proteinbiochemie wurde auch für diese Arbeit die Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Bei dieser Methode werden durch Hitze und Zugabe von SDS denaturierte Proteingemische in einem Polyacrylamid-Gel mit Hilfe eines elektrischen Feldes nach ihrem sogenannten hydrodynamischen Radius (Stokes-Radius) aufgetrennt. Dieser ist abhängig vom Molekulargewicht des jeweiligen Proteins.

Tab 3.9: Zusammensetzung der SDS-Gele. Für die Herstellung der Gele wurden die Lösungen nach der hier beschriebenen Rezeptur nach Lämmli [Lämmli 1970] angefertigt. Die so gewonnenen Gele konnten für höchstens eine Woche bei 4°C gelagert werden. Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, AMPS = Ammoniumperoxodisulfat (Polymerisationsinitiator), TEMED = Tetramethylethyldiamin (Polymerisationskatalysator)

LÖSUNGEN	TRENNGEL 12,5%	SAMMELGEL 5%
40% Acrylamid	4,7 ml	0,9 ml
2% Bisacrylamid	1,25 ml	0,2 ml
H ₂ O	2,9 ml	5 ml
1,875 M Tris pH 8,8	6 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	0,9 ml
10% SDS	150 μl	72 μl
10% AMPS	45 μl	67,5 μl
TEMED	5 μl	10,5 μl
Gesamtvolumen	15,05 μl	7,15 μl

In der Literatur sind mannigfaltige Gel-Elektrophoresesysteme beschrieben, die sich hauptsächlich in den eingesetzten Puffern beziehungsweise Puffersystemen unterscheiden. Die SDS-PAGEs dieser Arbeit wurden mit den häufig verwendeten 1970 von Ulrich Lämmli eingeführten Tris-Glycin-Puffern [Lämmli 1970] durchgeführt.

Das anionische Detergenz SDS wurde hier benutzt, um negativ geladene SDS-Proteinkomplexe herzustellen. In diesen waren Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen aufgehoben und die Komplexe wiesen ein konstantes Ladungs-Massen-Verhältnis auf. Bei der anschließenden PAGE wurde der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix ausgenutzt, um die Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen.

Hierfür wurden diese zunächst in einem fünfprozentigen Sammelgel zu einer schmalen Laufbande fokussiert. Die eigentliche Auftrennung erfolgte in einem direkt angeschlossenen, 12,5%igen Trenngel. Für die Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle 3.2. Die verwendeten Gele hatten eine Größe von 11 cm x 14 cm x 1 mm, waren mit 14 Einfülltaschen bestückt und waren am unteren Ende mit zweiprozentiger Agarose abgedichtet. In die Taschen wurden jeweils 20 bis 30 µl Zelllysate in 1x Lämmli-Lösung gegeben, „leere“ Taschen wurden mit 20 µl 1x Lämmli-Lösung bestückt. Um die Möglichkeit der Größenbestimmung einzelner Proteine zu gewährleisten, wurden 5 µl des Markers Fermentas Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder aufgetragen.

Nach Überschichtung mit Elektrophoresepuffer (Tris 10 mM, Glycin 76,8 mM, SDS 0,1% (v/v)) wurde die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 45 mA über ungefähr drei Stunden oder bei einer Stromstärke von 5 mA über Nacht durchgeführt. Das Gel mit den nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteinen wurde anschließend für eine Western Blot-Analyse weiterverwendet.

3.3.3 Western Blot und immunologische Proteindetektion auf PVDF-Membranen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western Blot für eine immunologische Detektion zugänglich gemacht.

3. Material und Methoden

Die verwendete „Nass-Blot-Methode“ erforderte ein Einspannen des zu untersuchenden Gels in eine Kassette (Kathode – Schwamm – Filterpapier – Gel – PVDF-Membran – Filterpapier – Schwamm – Anode). Diese wurde anschließend in eine mit Blotpuffer (Tris 12,4 mM, Glycin 96 mM) gefüllte Blot-Kammer gestellt, an die für mindestens drei Stunden eine Stromstärke von 400 mA angelegt wurde. Die durch SDS-Anlagerung immernoch negativ geladenen Proteine wandern bei diesem sogenannten Elektrotransfer von der Kathode zur Anode der Blotkammer und können so vom Gel auf die Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran übertragen werden. Vor dem Transfer musste die Membran zunächst in 100% Methanol gequollen („aktiviert“) und anschließend ungefähr zehn Minuten gemeinsam mit den Schwämmen und dem Gel in Blotpuffer äquilibriert werden.

Nach abgeschlossener Proteinübertragung folgte die Inkubation der PVDF-Membran mit einem Primärantikörper. Dieser wurde in einer Blockierungslösung (5% Milchpulver in PBS, Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen) verdünnt und bei 4°C über Nacht aufgetragen. Einzelheiten über die Verdünnung, Art und Herkunft der verwendeten Antikörper sind Kapitel 3.1.6 zu entnehmen. Vor dem Aufbringen des Sekundärantikörpers wurde der Blot gewaschen. Hierzu wurde er zunächst fünf Minuten lang in PBS geschwenkt. Es folgten zwei je fünfminütige Waschschriffe in PBS-T und ein abschließender fünfminütiger Waschschriff in PBS.

Zwei verschiedene Typen sekundärer Antikörper kamen zum Einsatz (siehe Kapitel 3.1.7). Fluoreszenzgekoppelte Antikörper wurden für 90 Minuten in einem lichtgeschützten Raum bei Raumtemperatur aufgetragen. Anschließend wurde der Blot, wie für den Primärantikörper beschrieben, gewaschen. Nachdem die Membran lichtgeschützt getrocknet war, wurden die Fluoreszenzsignale unter Verwendung des Typhoon Trio™ Scanners detektiert. Im Falle Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper erfolgte die Inkubation ebenfalls für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Die Waschung des Blots erfolgte fünf Minuten lang mit PBS, zweimal zehn Minuten lang mit PBS-T und abschließend fünf Minuten lang mit PBS. Um eine Chemilumineszenzreaktion zu starten, wurde die Membran mit einer frisch angemischten Lösung aus SuperSignal® West Pico *Stable Peroxide Solution* und SuperSignal® West Pico *Luminol Enhancer Solution* (1:1) überschichtet und zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Die durch die Chemilumineszenz freigesetzten Protonen wurden

anschließen mit der CCD-Kamera des Lumi F1-Imagers beziehungsweise dem Fusion SL ADVANCE detektiert.

3.3.4 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Die Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen bezeichnet man als Immunpräzipitation. Diese Technik diente hier der Bestätigung von bereits mittels Massenspektrometrie identifizierten [Linxweiler 2014] Bindungspartnern von Sec62.

3.3.4.1 Herstellung geeigneter Säulen

Die Durchführung der Co-IP erforderte das Vorhandensein von Plastiksäulen, die mit einer Sepharosematrix bestückt worden sind. Um Antikörper an die Sepharose binden zu können, ist diese mit dem sogenannten Protein G bestückt. Dieses entstammt der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* und dient diesem durch die hochaffine Bindung des Fc-Teils von diversen Säuger-IgG-Antikörpern als Virulenzfaktor. Zur Herstellung der Säulen wurde 1ml Gamma Bind® G Sepharose® in ein 15 ml Zentrifugierröhrchen gegeben und dreimal mit PBS gewaschen. Zwischen jedem einzelnen Schritt erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation mit 3000 rpm bei 4°C in der Bactifuge mit anschließendem Absaugen des PBS-Überstands. Die gereinigte Sepharose wurde nun in zwei gleichgroße Portionen aufgeteilt und jeweils einmal mit einem GST-Antikörper und einmal mit einem affinitätsgereinigten Sec62-Antikörper versehen (jeweils 0,5 mg ad 14 ml PBS). Das so entstandene Sepharose-Antikörper-Gemisch wurde über Nacht in je einem 50 ml Zentrifugierröhrchen bei 4°C gerollt.

Um ein unkontrolliertes Durchlaufen der benutzten Lösungen durch die Säule zu verhindern, wurde an ihr unteres Ende eine poröse Polyethylenscheibe (Porendurchmesser 30 µm) angebracht. Durch diese konnte die Antikörperlösung problemlos passieren, die Sepharose wurde auf der Scheibe zurückgehalten. Zweimal wurde die Sepharose nun mit je 5 ml PBS gewaschen, anschließend folgte ein Waschschrift mit 5 ml CCP150 (siehe Kapitel 3.3.4.2).

Die so behandelte Matrix wurde abschließend mit einer weiteren Polyethylenscheibe von oben abgedichtet. Alle Scheiben wurden vor Benutzung in PBS äquilibriert.

3.3.4.2 Herstellung von geeignetem Zelllysate

Um ausreichende Mengen Sec62 mit Interaktionspartnern binden zu können, wurde eine große Zahl Zellen benötigt. Pro Säule wurden circa 150×10^6 Zellen (HEK293, stabil *SEC62*-überexprimierend) lysiert. Nach Ernte (siehe Kapitel 3.2.2) und Zählung (siehe Kapitel 3.2.3) wurden die abzentrifugierten Zellpellets in CCP150 resuspendiert und jeweils hälftig in zwei 50 ml Zentrifugierröhrchen überführt. Hier wurden sie auf jeweils 32 ml CCP150 aufgefüllt. PLAC, PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Proteaseinhibitor) und CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat, Detergenz) wurden erst jetzt in den Puffer hineingegeben. Bei 4°C wurden die Zellen nun zum Aufspalten für etwa 90 Minuten gerollt. Anschließend erfolgte eine Aufteilung der entstanden Suspension in vier 26,3 ml Polycarbonat-Zentrifugierfläschchen. Nachdem diese fest verschlossen worden sind, wurde die Suspension bei 2°C für 20 Minuten mit 50.000 rpm (L-80 Ultracentrifuge mit 80-Ti-Rotor) zentrifugiert, um den beim Aufschluss entstandenen Zelldetritus vom proteinenthaltenden Überstand zu trennen.

Tab 3.10: CCP150. HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HEPES/KOH pH 7,55	20 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA/KOH pH 7	1 mM
KCl	150 mM
CHAPS	0,65 %
PLAC	1 : 1000
PMSF	1 : 500

3.3.4.3 Durchführung der Co-IP

Der gewonnene Überstand (Kapitel 3.3.4.2) wurde nun über Nacht mittels einer Pumpe (Pump P-1), deren Schlauchsystem zuvor mit 100% Ethanol und anschließend CCP150 durchgespült worden war, rezirkulierend über das zuvor hergestellte und mit Antikörpern beladene Säulenmaterial gegeben (siehe Kapitel 3.3.4.1).

Am nächsten Tag wurden die Säulen nach dem letzten Durchlaufen des Lysats zunächst in sechs Schritten gewaschen. Zunächst wurden dreimal 4,5 ml CCP150 (W1–3) durch die Säule gegeben, anschließend je dreimal 4,5 ml NET-Puffer (W4–6). Die Puffer wurden nach Verwendung einzeln aufgefangen und von jedem Waschschrift wurden zweimal 150 µl zur anschließenden Proteinfällung weggefroren. Der Rest der durchgelaufenen Puffer wurde bei -80°C eingefroren.

Tab 3.11: NET-Puffer. Nonidet P40 = Octylphenoxypolyethoxyethanol (Detergenz)

1 M Tris/HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
Nonidet P40	0,5% (v/v)
PMSF	0,2 mM
PLAC	0,1%
ad H ₂ O	

Zum Eluieren der gebunden Sec62-Interaktionspartner-Komplexe wurde eine Lösung von 10,5 mg Protein 1152 in 10,5 ml NET-Puffer hergestellt. Im ersten Schritt (E1) wurden 500 µl in die jeweilige Säule gegeben und nach Durchlauf sofort wieder aufgefangen. Für die Schritte E2-4 wurden abermals je 500µl der Lösung auf die Säule gegeben. Diese wurde zuvor jedoch von unten verschlossen, um eine zehnmünütige Inkubation mit dem Protein 1152 zu ermöglichen, bevor das Eluat aufgefangen wurde. E5-8 erfolgten wie E1. Je 150 µl jedes Schritts wurden zur weiteren Analyse entnommen.

Um die Säulen für die Lagerung tauglich zu machen, wurden sie je einmal mit 4,5 ml NET-Puffer durchgespült und anschließend mit 1 ml NET-Puffer überschichtet und an beiden Enden verschlossen.

3.3.4.4 Wessel-Flügge-Fällung

Um die präzipitierten Proteine einer Western-Blot-Analyse zugänglich zu machen wurde eine Proteinfällung nach Wessel-Flügge [Wessel und Flügge 1984] durchgeführt. Hierfür wurden 150 µl der zu untersuchenden Lösung mit 600 µl reinem Methanol und 150 µl Chloroform versehen. Nach anschließendem Durchmischen auf dem Vortexer entstand so eine einzelne Phase. Dieser wurden 450 µl destillierten Wassers hinzugefügt, eine erneute Durchmischung auf dem Vortexer folgte. Nach einmütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur und circa 13.000 rpm waren drei Phasen zu erkennen. Zwischen der oberen organischen und der unteren wässrigen Phase, lag die proteinenthaltende Interphase. Vorsichtig wurde die obere Phase abpipettiert. Anschließend abermals 450µL Methanol auf den Rest gegeben und durchmischt. Nach zweiminütiger Zentrifugation wie weiter oben beschrieben, war ein Proteinpellet am Grund des Reaktionsgefäßes zu erkennen. Um dieses nicht zu verlieren, wurde der Überstand nicht vollständig abpipettiert, sondern für circa zehn Minuten in dem CON-1000 Evaporator (Vakuum-Zentrifuge) getrocknet. Nach zehnminütigem Aufkochen bei 56°C in 20 µl 1x Lämmli-Lösung konnten die Proben für eine Western Blot-Analyse benutzt werden.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu Eigenschaften der Hsp40-Cochaperone ERj3 und ERj6

Von allen Hsp40-Cochaperonen wurden die beiden ER-luminalen Proteine ERj3 und ERj6 für diese Arbeit aus mehreren Gründen ausgewählt. Der entscheidende Faktor war deren Einfluss auf die Calciumhomöostase des endoplasmatischen Retikulums. So waren ERj3 und ERj6 die einzigen Hsp40-Cochaperone, die nach Depletion mit erhöhtem Ca^{2+} -Efflux aus dem ER einhergingen und so den Phänotyp einer BiP-Depletion imitierten. [Schorr 2015, Schäuble 2012] Dieser Phänotyp trat zudem ebenfalls nach Sec62-Depletion auf. Besonders interessant war dieser Umstand dadurch, dass man diesen Phänotyp durch Gabe von Calmodulinantagonisten und Thapsigargin imitieren konnte und sich so eine Tür zur „targeted therapy“ bestimmter Tumore öffnete. [Greiner 2013] Für nähere Details hierzu siehe Kapitel 2.2. Das Verständnis der Funktionen von ERj3 und ERj6 könnte daher neue Einblicke in die Tumorbilologie des ER geben.

Weiterhin zeigen Tiere und Menschen mit Mutationen in den Genen, die für ERj3 oder ERj6 kodieren diverse Krankheitsbilder. Genauere Informationen hierzu sind Kapitel 2.4 zu entnehmen. Besondere Beachtung findet in dieser Arbeit die ERj6-Defizienz-assoziierte multisystemische Neurodegeneration mit Diabetes mellitus.

4.1.1 UPR und Genexpression in Fibroblasten ERj6-defizienter Patienten

In den folgenden Versuchen wurden die Fibroblasten zweier konsanguiner türkischstämmiger Familien untersucht. Einzelne Mitglieder dieser Familien fielen mit juvenile-onset Diabetes mellitus und multisystemischer Neurodegeneration auf. Ein „whole-exome sequencing“ zweier Patienten zeigte eine „loss-of-function“ Mutation im *DNAJC3*-Gen. [Synofzik 2014] Dieses kodiert für das Hsp40-Cochaperone ERj6.

4. Ergebnisse

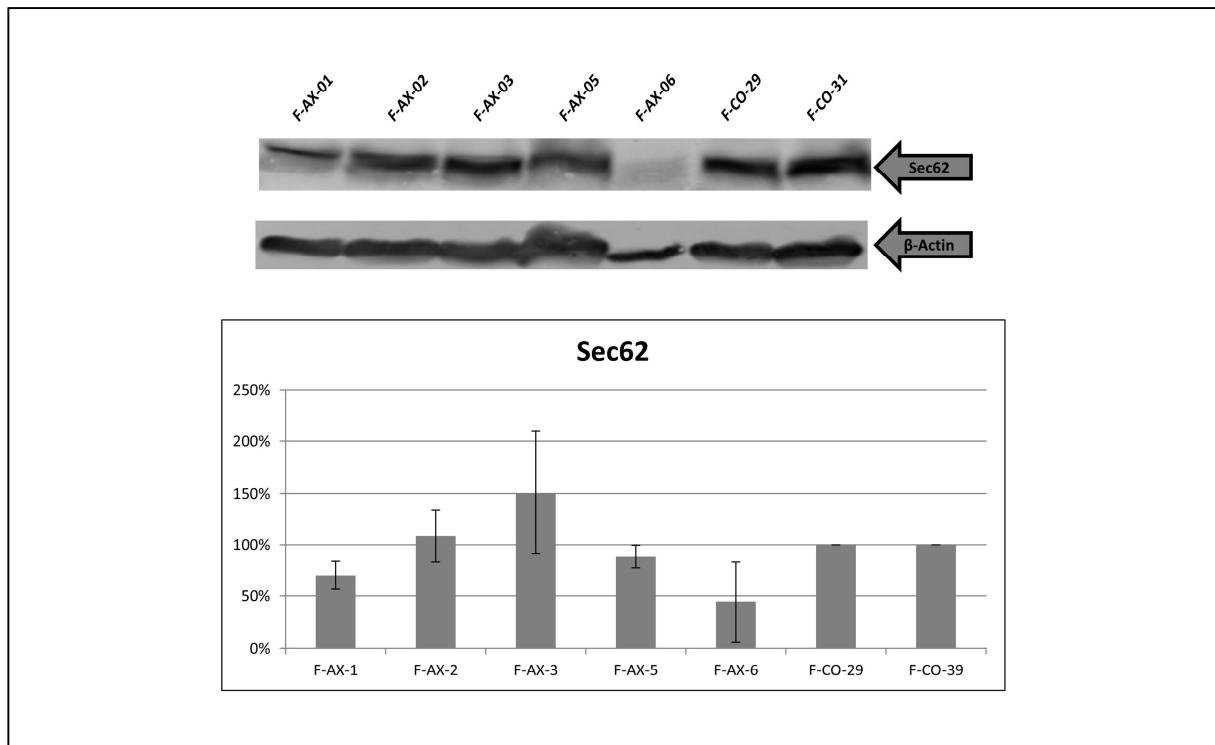


Abb. 4.1: Sec62-Gehalt von ERj6-defizienten Fibroblasten einer Familie mit „loss-of-function“-Mutation im *DNAJC3*-Gen. Zu sehen ist ein exemplarischer Western Blot mit Proben einer einzelnen Familie. ERj6-defiziente Proben sind mit Fibroblasten-Ataxie (F-AX), solche mit intaktem ERj6 mit Fibroblasten-Kontrolle (F-CO) bezeichnet. Die Ziffern identifizieren einzelne Patienten, beziehungsweise Familienmitglieder. Der obere Blot zeigt den Sec62-Gehalt der einzelnen Proben, der untere dient der Ladekontrolle mit β -Aktin. Zur statistischen Auswertung wurde der Sec62-Gehalt in den Proben derselben Familie dreimal bestimmt. Die Proteinmengen der erkrankten Familienmitglieder wurden anschließend mit den gemittelten Proteinmengen der gesunden Kontrollproben verglichen, letztere wurden als 100%-Sec62 enthaltend definiert. Aus den Verhältnissen jedes Patienten in den drei Einzelversuchen wurde abschließend ein Mittelwert gebildet, sowie die Standardabweichung berechnet und in einem Balkendiagramm aufgetragen. Dieses zeigt keine eindeutige Tendenz des Gehaltes an Sec62 in ERj6-defizienten Fibroblasten im Vergleich zu ERj6-enthaltenden Kontrollzellen der gleichen Familie.

Für diese Arbeit wurden Fibroblasten einzelner Familienmitglieder auf Zeichen konstitutionell erhöhten ER-Stresses, sowie auf ihre Sensibilität gegenüber künstlich erzeugtem ER-Stress hin untersucht. Fibroblasten ataktischer Familienmitglieder wurden mit F-AX bezeichnet, solche gesunder Kontroll-Familienmitglieder mit F-CO.

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Sec62-Gehalts der Fibroblasten einer der Familien. Hierfür wurden die in den Zellen enthaltenen Mengen Sec62 in drei verschiedenen Western Blot Analysen bestimmt und anschließend für jeden Patient und jede Kontrolle gemittelt. Der

4. Ergebnisse

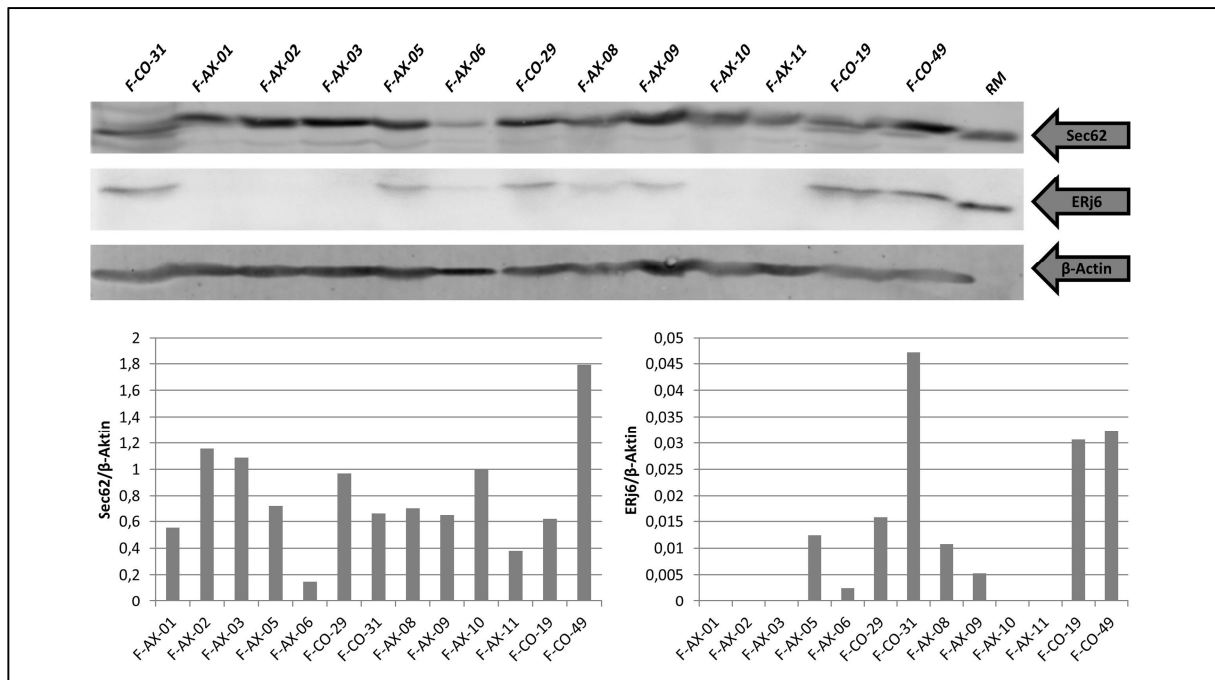


Abb. 4.2: ERj6- und Sec62-Gehalt in Fibroblasten zweier Familien mit „loss-of-function“-Mutation im *DNAJC3*-Gen. Die hier aufgeführten Western Blots zeigen von oben nach unten den Gehalt an Sec62, ERj6 und β-Aktin von Fibroblasten zweier Familien mit „loss of function“-Mutation im *DNAJC3*-Gen. Zellen von Patienten sind mit Fibroblasten-Ataxie (F-AX), die ihrer gesunden Familienmitglieder mit Fibroblasten-Kontrolle (F-CO) bezeichnet. Die Proben 01, 02, 03, 05, 06, 29 und 31 gehören einer Familie an, 08, 09, 10, 11, 19 und 49 einer anderen. Vergleicht man die Proben erkrankter mit denen nicht erkrankter Familienmitglieder, so zeigt sich, dass sich wie in Abbildung 3.1 bereits verdeutlicht keine eindeutige Tendenz im Sec62-Gehalt der ERj6-defizienten Zellen im Vergleich zu den gesunden Fibroblasten erkennen ließ. Im Gegenzug ist die ERj6-Defizienz der ataktischen Patienten auch im Western Blot verifizierbar, wie im rechten Diagramm zu sehen.

Sec62-Gehalt der Kontroll-Zellen wurde als 100% definiert. Schließlich wurde das Verhältnis des Sec62-Gehalts jedes einzelnen Patienten zu dem der Kontroll-Zellen gebildet. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abbildung 4.1 zu sehen. In dieser ist zu erkennen, dass der Sec62-Gehalt der Fibroblasten erkrankter Patienten sich nicht signifikant zu dem der gesunden Familienmitglieder unterscheidet und individuell starken Schwankungen unterliegt.

Dieser Umstand lässt sich bei der Betrachtung einzelner Untersuchungen verdeutlichen. So erscheint es in den Blots von Abbildung 4.2 der statistischen Auswertung entsprechend so, als habe die ERj6-Defizienz der F-AX-Zellen keinen Einfluss auf die *SEC62*-Expression. Dem widersprechend ist die Auswertung der Blots von Abbildung 4.3, die den Eindruck erwecken,

4. Ergebnisse

als würden die F-AX-Zellen eine geringere *SEC62*-Expression aufweisen als deren Kontroll-Familienmitglieder. In Abbildung 4.2 ist die ERj6-Defizienz der F-AX-Zellen in einem Western Blot dargestellt und deutlich erkennbar.

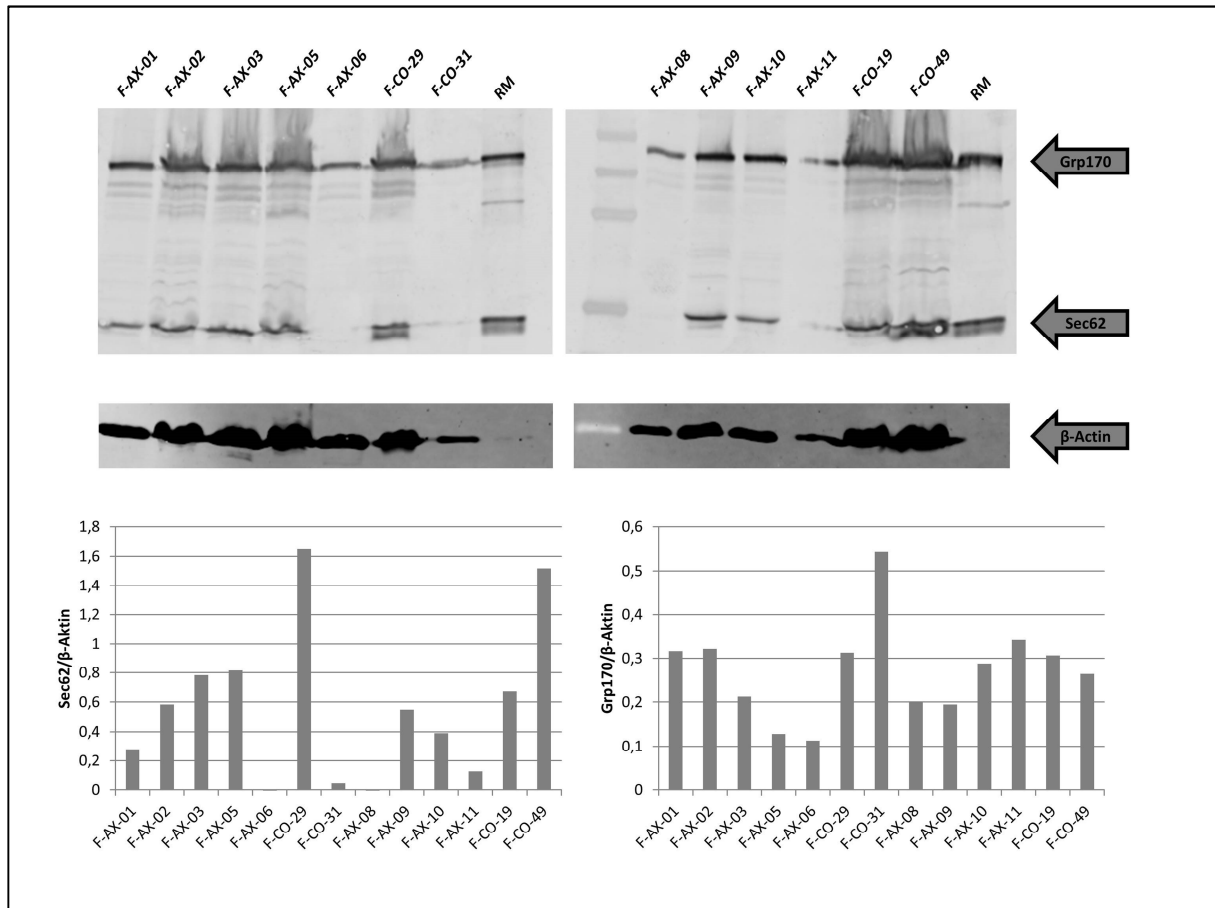


Abb. 4.3: GRP170- und Sec62-Gehalt in Fibroblasten zweier Familien mit „loss-of-function“-Mutation im *DNAJC3*-Gen. Die hier aufgeführten Western Blots zeigen von oben nach unten den Gehalt an GRP170, Sec62 und β -Aktin von Fibroblasten zweier Familien mit symptomatischer ERj6-Defizienz. F-AX bezeichnet Fibroblasten ataktischer Patienten, F-CO deren als Kontrolle verwendeten gesunden Verwandten. Die Testpersonen 01, 02, 03, 05, 06, 29 und 31 gehören zu einer Familie, 08, 09, 10, 11, 19 und 49 zu der anderen. In diesem Versuch entstand gegensätzlich zu Abb. 3.2 der Eindruck, dass die erkrankten eine geringere Menge Sec62 in ihren Fibroblasten produzierten als ihre gesunden Verwandten. Der GRP170-Gehalt, der als Marker für den von der Zelle zu bewältigenden ER-Stress bestimmt wurde, unterschied sich hingegen nicht signifikant zwischen Kranken und Gesunden.

Zur Abschätzung des ER-Stress, in dem die F-AX-Zellen leben, wurde die Menge an GRP170 in den einzelnen Proben bestimmt. GRP170 ist ein Protein, das bei der UPR („*unfolded protein*

4. Ergebnisse

response“) induziert wird. In Abbildung 4.3 ist der hierfür angefertigte Western Blot zu sehen. Hier ist zwischen dem GRP170-Gehalt von F-AX- und F-CO-Zellen tendenziell kein Unterschied zu erkennen.

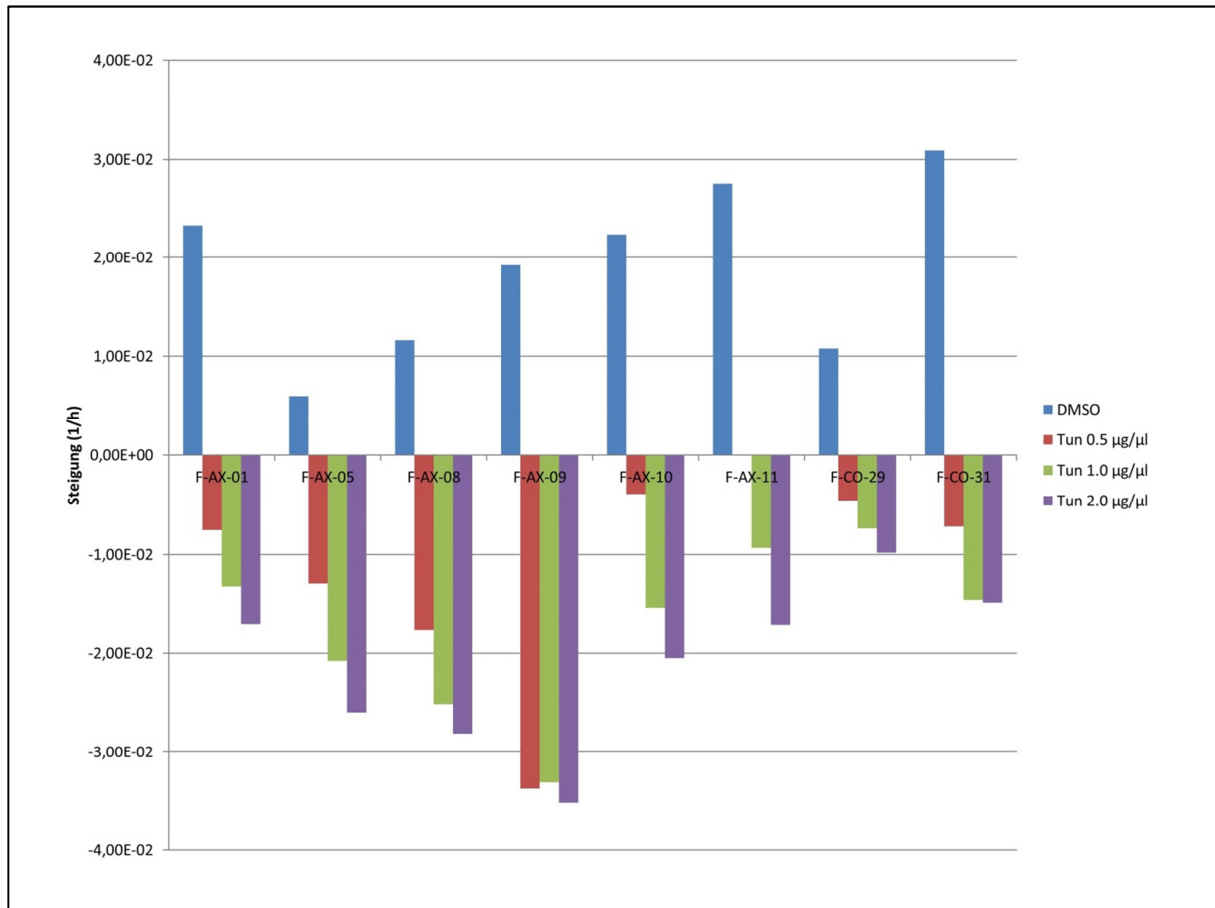


Abb. 4.4: Proliferation von ERj6-defizienten Fibroblasten unter steigendem Tunicamycin-induziertem ER-Stress. DMSO: Lösungsmittelkontrolle, Tun: Tunicamycinkonzentration

In dem aufgeführten Versuch wurden Fibroblasten einer Familie mit ERj6-Defizienz-assoziiierter Ataxie und Diabetes mellitus in dem xCelligence-System auf ihre Proliferationsfähigkeit unter steigendem ER-Stress untersucht. Für den exakten Versuchsaufbau, siehe Kapitel 3.2.11. Im vorliegenden Diagramm wurde die Steigung der Funktion von Zellindex gegen Zeit aus jeweils drei technischen Replikaten pro Probe zwischen vollständigem Anwachsen der Zellen an den Elektroden und Erreichen der Plateauphase des Zellwachstums gezeigt.

Die Fibroblasten wurden einer steigenden Konzentration Tunicamycin ausgesetzt, das die regelrechte posttranslationale Modifikation von Proteinen im ER verhindert und so die UPR auslöst. Verglichen werden sollte, wie stark die Proliferation der mit AX bezeichnet Zellen von kranken Familienmitgliedern im Gegensatz zu denen gesunder Familienmitglieder, bezeichnet mit CO, unter dem steigenden ER-Stress leiden. Tendenziell scheinen die ERj6-defizienten Fibroblasten nach Tunicamycinbehandlung vermehrt abzusterben, auch wenn die Zellen einzelner Patienten ähnlich gut proliferieren wie die der Kontrollzellen.

Da die Bestimmung von GRP170 in nativen Fibroblasten nur eine Aussage über den Zustand der UPR zum Zeitpunkt der Messung trifft, wurde eine dynamische Messung der Proliferation von Fibroblasten unter ER-Stress durchgeführt. Hierfür wurden die F-AX-Zellen und F-CO-Zellen einer Familie im xCelligence-System ausgesät. Für den detaillierten Ablauf der Untersuchung siehe Kapitel 3.2.11.

Ergebnis einer xCelligence-Untersuchung ist der Zellindex. Dieser wird durch eine Impedanzmessung an den Goldelektroden am Boden des Messsystems bestimmt und korreliert mit der von Zellen überwachsenen Elektrodenfläche. Entsprechend kann er bestimmt werden, um Proliferation einer Zellkultur über Zeit zu verfolgen.

Zur Berechnung der in Abbildung 4.4 gezeigten Diagramme wurden Fibroblasten von sechs Patienten und zwei Kontrollprobanden in dem x-Celligence-System ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie entweder mit reinem Lösungsmittel (DMSO) oder mit Tunicamycin in verschiedener Konzentration (0,5, 1 oder 2 mg/ml) behandelt. Tunicamycin verhindert die posttranslationale Modifikation von Proteinen im ER und führt so zu einer Induktion der UPR. Die Fibroblasten durften proliferieren bis der Zellindex eine Plateauphase erreichte.

Zwischen dem Anwachsen der Zellen auf den Goldelektroden und dem Erreichen der Plateauphase wurde die Steigung der Funktion von Zellindex gegen Zeit gebildet. Diese wurde in Abbildung 4.4 aufgetragen.

In diesem Diagramm ist zu sehen, dass die Zellen alle bis auf F-AX-09 auf steigenden ER-Stress mit zunehmend schlechterer Proliferation reagierten. Zudem zeigten die Fibroblasten der erkrankten Probanden im Schnitt unter Einfluss von Tunicamycin negativere Steigungen als die Fibroblasten gesunder Familienmitglieder. Dies spricht für eine erhöhte Sensibilität gegenüber ER-Stress.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Fibroblasten von Patienten mit erblicher ERj6-Defizienz keine Änderung der Sec62-Niveaus im Vergleich zur Normalbevölkerung zeigen und sie nicht unter konstitutionell erhöhtem ER-Stress stehen. Jedoch reagieren sie stärker auf eine von außen induzierte UPR.

4.1.2 Migrationspotential von HeLa-Zellen nach ERj3- bzw. ERj6-Depletion

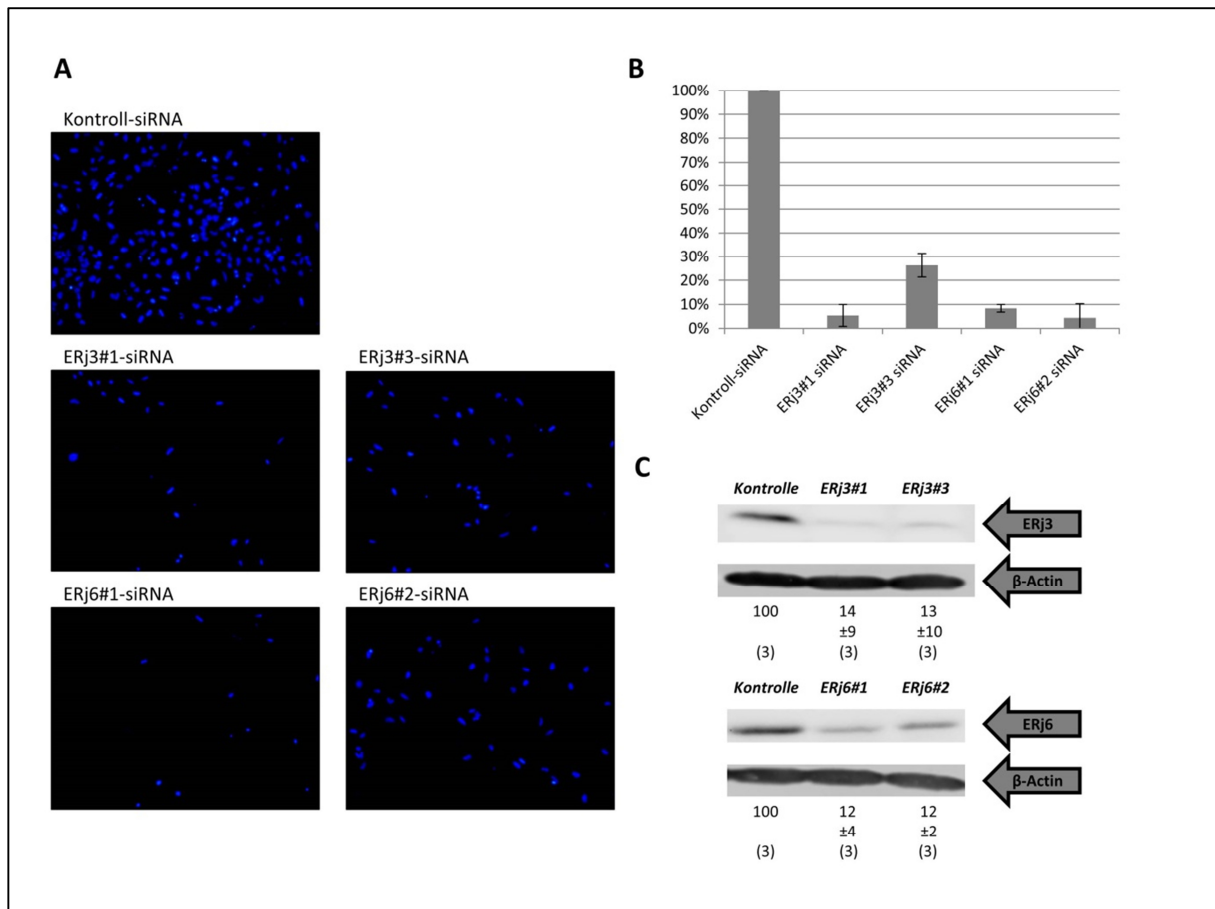


Abb. 4.5: Migrationspotential von HeLa-Zellen nach RNA-Interferenz-basierter Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6. In dieser Abbildung wurden drei Einzelversuche verarbeitet, in denen mithilfe von RNA-Interferenz-basierter „silencing“ entweder das Hsp40-Cochaperon ERj3 oder ERj6 depletiert worden sind. Anschließend wurden die Zellen in einem Migrationsassay untersucht. Für das detaillierte Vorgehen siehe Kapitel 3.2.10.

A Es sind exemplarisch DAPI-markierte Zellkerne gezeigt, wie sie nach abschließender Fixierung und Färbung der Migrationsassays ausgezählt worden sind. Zum „silencing“ wurden jeweils zwei verschiedene siRNAs verwendet, um auszuschließen, dass beobachtete Effekte auf eine spezifische Wirkung einer bestimmten siRNA zurückzuführen waren. Mit allen vier siRNAs sah man eine deutliche Reduktion der nach 48 Stunden migrierten Zellen. **B** Die statistische Auswertung dreier Migrationsexperimente. Verrechnet worden sind die Zellen, die nach Depletion von entweder ERj3 oder ERj6 im Verhältnis zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, migriert sind. Die Signifikanzniveaus sind im t-Test für unverbundene Stichproben für ERj3#1 <0,001, für die drei anderen siRNAs <0,01. **C** Restgehalt an depletiertem Protein in den untersuchten HeLa-Zellen. Die Zahlenwerte beschreiben von oben nach unten den Restproteingehalt bezogen auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, die Standardabweichung der drei verrechneten Proben und die Anzahl der biologischen Replikate. Die Proteindepletion verlief zufriedenstellend.

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, führte die RNA-Interferenz-basierte Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6 zu einem erhöhten Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER, genauer aus dem Sec61-Komplex. [Schorr 2015] Dieser Phänotyp ist nicht nur durch Depletion von BiP zu erzeugen [Schäuble 2012], sondern auch nach Depletion von Sec62 zu beobachten [Linxweiler 2013]. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob auch weitere Phänotypen der Sec62-Defizienz durch Depletion von ERj3 oder ERj6 zu imitieren sind.

Zunächst wurde der Einfluss der beiden Cochaperone auf das Migrationspotential von HeLa-Zellen beurteilt.

Hierfür wurden diese zunächst entweder mit Kontroll-siRNA, ERj3#1-, ERj3#3-, ERj6#1- oder ERj6#2-siRNA behandelt. Nach Vollendung des „*silencing*“-Protokolls – für dieses siehe Kapitel 3.2.4 – wurden die HeLa-Zellen in einem Migrationsassay einem 10-fachen FCS-Gradienten ausgesetzt. Der Aufbau des Migrationsassays ist Kapitel 3.2.10 zu entnehmen. Dem FCS-Gradienten folgend durchwanderten noch migrationsfähige Zellen die Membran des Inlays, in dem sie ausgesät worden sind. Nach 48 Stunden wurde die Zellwanderung gestoppt, die Zellen wurden fixiert, gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop elektronisch gezählt.

Wie in Abbildung 4.5 zu sehen, zeigten alle Hsp40-Cochaperon-depletierten HeLa-Zellen eine signifikant verringerte Migrationsneigung. Mit ERj3#3-siRNA konnte die Menge migrierter Zellen unter 30% im Vergleich zu den Kontrollzellen gesenkt werden, mit den anderen siRNAs auf unter 10%. Im t-Test für unverbundene Stichproben zeigten alle siRNAs p-Werte unter 0,01, ERj3#1 sogar unter 0,001.

Es ist somit äußerst wahrscheinlich, dass ein Mangel an ERj3 oder ERj6 die Migrationsfähigkeit von HeLa-Zellen deutlich beeinträchtigt.

4.1.3 Proliferation von HeLa-Zellen nach ERj3- bzw. ERj6-Depletion

Als nächstes wurde untersucht inwieweit ERj3- oder ERj6-Defizienz in HeLa-Zellen deren Proliferation mit und ohne Thapsigargin-induzierten ER-Stress beeinflusst. Hierfür wurde

4. Ergebnisse

abermals das xCelligence-System verwendet, dessen exakte Funktionsweise Kapitel 3.2.11 zu entnehmen ist.

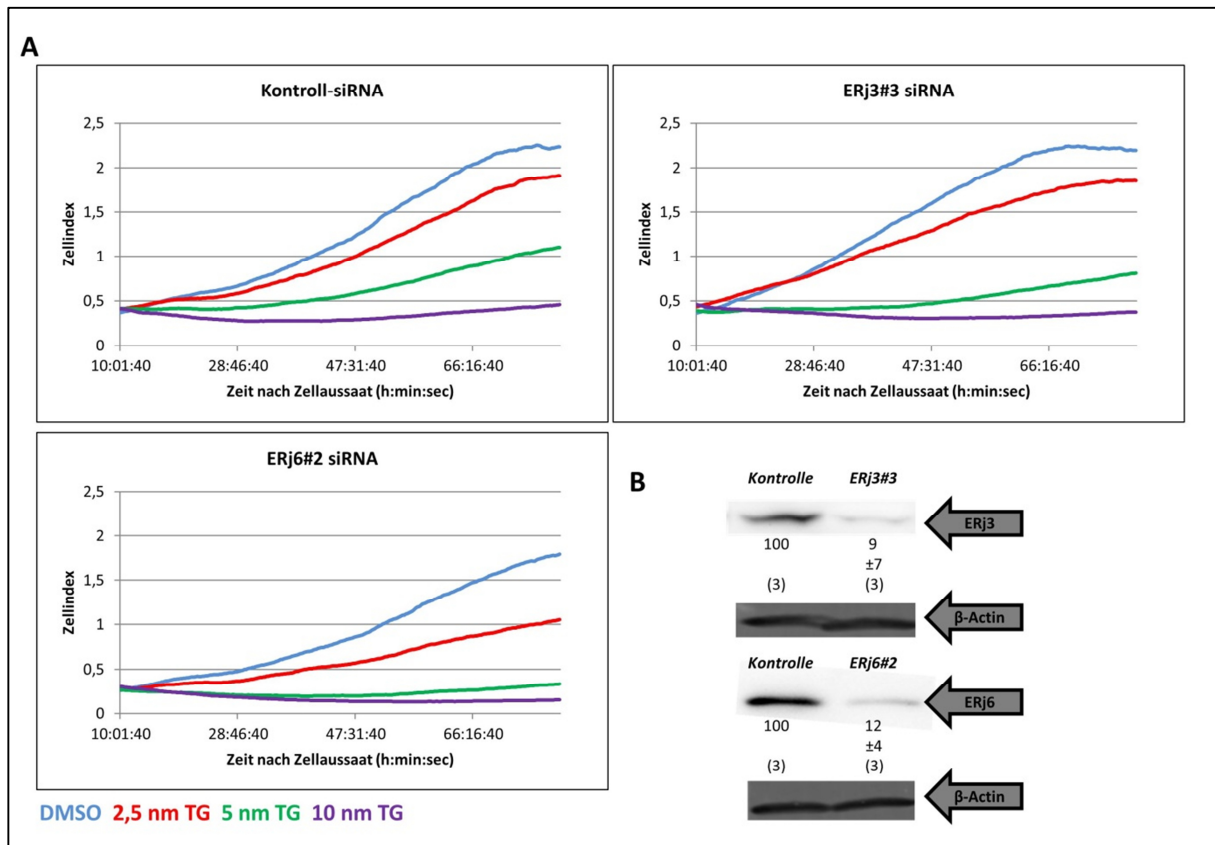


Abb. 4.6: Exemplarische Darstellung der Proliferation von HeLa-Zellen nach RNA-Interferenz-basierter Depletion von ERJ3 beziehungsweise ERJ6 unter Thapsigargin-induziertem ER-Stress.

A In drei einzelnen Diagrammen wird exemplarisch an einem Experiment gezeigt, wie RNA-Interferenz-basiertes Gensilencing von ERJ3 beziehungsweise ERJ6 die Proliferation von HeLa-Zellen unter steigendem Thapsigargin- (TG) induziertem ER-Stress beeinflusste. Das Diagramm oben links zeigt hierbei das Verhalten mit Kontroll-siRNA behandelter HeLa-Zellen. Das obere, beziehungsweise das rechte Diagramm zeigen das Verhalten von HeLa-Zellen nach Behandlung mit der der Diagrammüberschrift entsprechenden siRNA. Unten links ist die Farbkodierung der einzelnen Graphen beschrieben, DMSO bezeichnet hierbei die TG-frei Lösungsmittelkontrolle. Jede Kombination von siRNA und und TG-Konzentration wurde in drei technischen Replikaten untersucht. In den Diagrammen ist der dimensionslose Zellindex gegen die Zeit aufgetragen. Für die exakte Ermittlung des Zellindex im xCelligence-System siehe Kapitel 3.2.11. Nach Festwachsen der Zellen (in diesem Fall nach ca. 10 Stunden) konnten diese bis zum Erreichen einer Plateauphase (in diesem Fall nach ca. 80 Stunden) proliferieren. Auf den ersten Blick ist kein Effekt des ERJ3- oder ERJ6-„silencings“ auf die Proliferationen in den Diagrammen zu erkennen. **B** Gezeigt ist die Western Blot-Kontrolle des Restproteingehalts der drei in Abbildung 4.7 verarbeiteten Versuche. Die Zahlenwerte bezeichnen von oben nach unten jeweils den Mittelwert an Restprotein bezogen auf die jeweilige Kontrolle, die Standardabweichung der drei Mittelwerte untereinander und in Klammern die Anzahl der durchgeführten Experimente. Es ist zu sehen, dass die Proteindepletion zufriedenstellend verlaufen war.

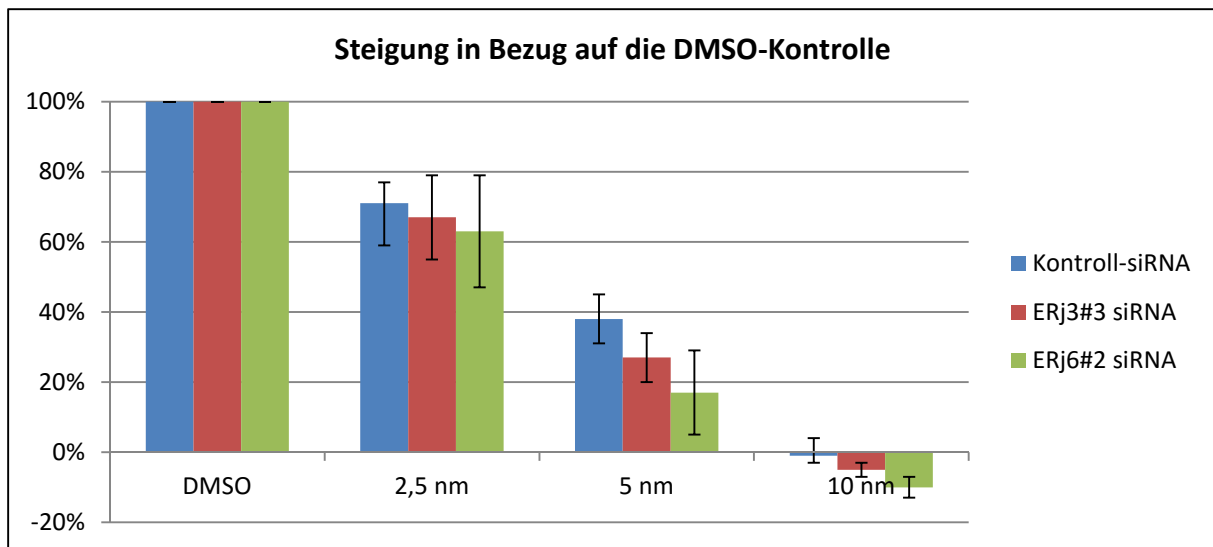


Abb. 4.7: Statistische Auswertung des Proliferationsverhaltens von HeLa-Zellen nach RNA-Interferenz-basierter Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6 unter Thapsigargin-induziertem ER-Stress. Die im vorliegenden Diagramm erhobenen Daten entstammen drei biologischen Replikaten einer Proliferationsmessung von mit Kontroll-siRNA behandelten, sowie mithilfe von RNA-Interferenz ERj3- beziehungsweise ERj6-depletierten HeLa-Zellen. Für den exakten Versuchsaufbau siehe Kapitel 3.2.11. In dem Versuch wurde ein mit der Zellproliferation korrelierender, dimensionsloser Zellindex bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Aus den entstehenden Graphen wurden jeweils die Steigungen zwischen dem Anwachsen der Zellen auf den Messelektroden und dem Erreichen eines Plateaus berechnet. Die Steigung der thapsigarginfreien Lösungsmittelkontrollen wurde als 100%iges Wachstum definiert. Anschließend wurde der Quotient der jeweiligen Steigungen der mit Thapsigargin behandelten Proben und der Steigung der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle gebildet. Die Mittelwerte dieser Quotienten sind mit der jeweiligen Standardabweichung in diesem Diagramm aufgetragen. Die Abszisse ist mit der jeweils verwendeten Thapsigarginkonzentration beschriftet, wobei DMSO die Lösungsmittelkontrolle beschreibt. Nach Durchführung des t-tests für unverbundene Stichproben zeigt sich, dass weder ERj3-, noch ERj6-depletierte HeLa-Zellen im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten sensibler auf Thapsigargin-induzierten ER-Stress reagieren.

In Abbildung 4.6 wurde ein einzelnes xCelligence-Experiment dargestellt. Dieses wurde mit HeLa-Zellen durchgeführt, die entweder mit Kontroll-siRNA, ERj3#3- oder ERj6#2-siRNA behandelt worden sind. Die gezeigten Kurven entstanden durch Auftragen des Zellindex gegen die Zeit. Der Zellindex korreliert mit der Fläche, die die HeLa-Zellen am Boden des entsprechenden Wells überwachen und zeigt so in Abhängigkeit zur Zeit die Proliferation der untersuchten Zellen an. Die Werte wurden aus jeweils drei technischen Replikaten gemittelt.

Alle Kurven wurden mit gleichskalierten Ordinaten dargestellt. Betrachtet man diese, erscheint es auf den ersten Blick so, als würden ERj6-defiziente HeLa-Zellen generell weniger stark proliferieren als die Kontrollzellen und solche nach ERj3-Depletion. Bei allen Proben zeigte sich ein progredientes Proliferationsdefizit bei steigender Thapsigarginkonzentration. Thapsigargin (TG) ist ein Inhibitor der SERCA und verhindert den Ausgleich des stets prävalenten Ca^{2+} -Lecks aus dem ER, wodurch es zu Funktionsstörungen der Proteinfaltung kommt, was wiederum die UPR auslöst.

Ziel des Versuchs war es zu untersuchen, inwieweit ERj3- oder ERj6-Depletion die Sensitivität gegenüber thapsigargininduziertem ER-Stress beeinflusst.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde der Versuch aus Abbildung 4.6 dreimal durchgeführt. Die Steigungen der entsprechenden thapsigarginkompromittierten Wachstumskurven wurden ins Verhältnis zu der passenden Lösungsmittelkontrolle gesetzt, die ihrerseits als 100%iges Wachstum definiert wurde. Wertet man diese Verhältnisse mit dem t-test für unverbundene Stichproben aus, so zeigt sich, dass weder ERj3- noch ERj6-„*silencing*“ die Sensitivität gegenüber TG-induziertem ER-Stress erhöhen. Die dazugehörigen Daten sind Abbildung 4.7 zu entnehmen.

4.1.4 Das Aktinzytoskelett bei HeLa-Zellen nach ERj3-Depletion

In dem folgenden Versuch wurde untersucht, ob die Depletion von ERj3 das Aktinzytoskelett von HeLa-Zellen beeinflusst. Hierfür wurden die Zellen auf einem dünnen Objektträger ausgesäht, mit ERj3#1-siRNA behandelt und anschließend fixiert und gefärbt. Für den detaillierten Versuchsablauf siehe Kapitel 3.2.8 und 3.2.9. Als Negativkontrolle wurden Kontroll-siRNA behandelte Zellen verwendet, als Positivkontrolle Sec62-depletierte HeLas. Grund hierfür war die Tatsache, dass bei SCC1-Zellen beobachtet werden konnte, dass die RNA-Interferenz-basierte Depletion von Sec62 zu einer Vergrößerung der Fläche der einzelnen Zellen und einer Umverteilung des intrazellulären Aktins führte [Bochen, Masterarbeit].

4. Ergebnisse

Zur Detektion von Aktin wurde das Gift des grünen Knollenblätterpilzes Phalloidin verwendet. Dieses hat eine sehr hohe Affinität zu Aktin und ist an einen grünen Fluoreszenzfarbstoff gebunden ein hervorragendes Instrument zur Sichtbarmachung des Aktinzytoskeletts.

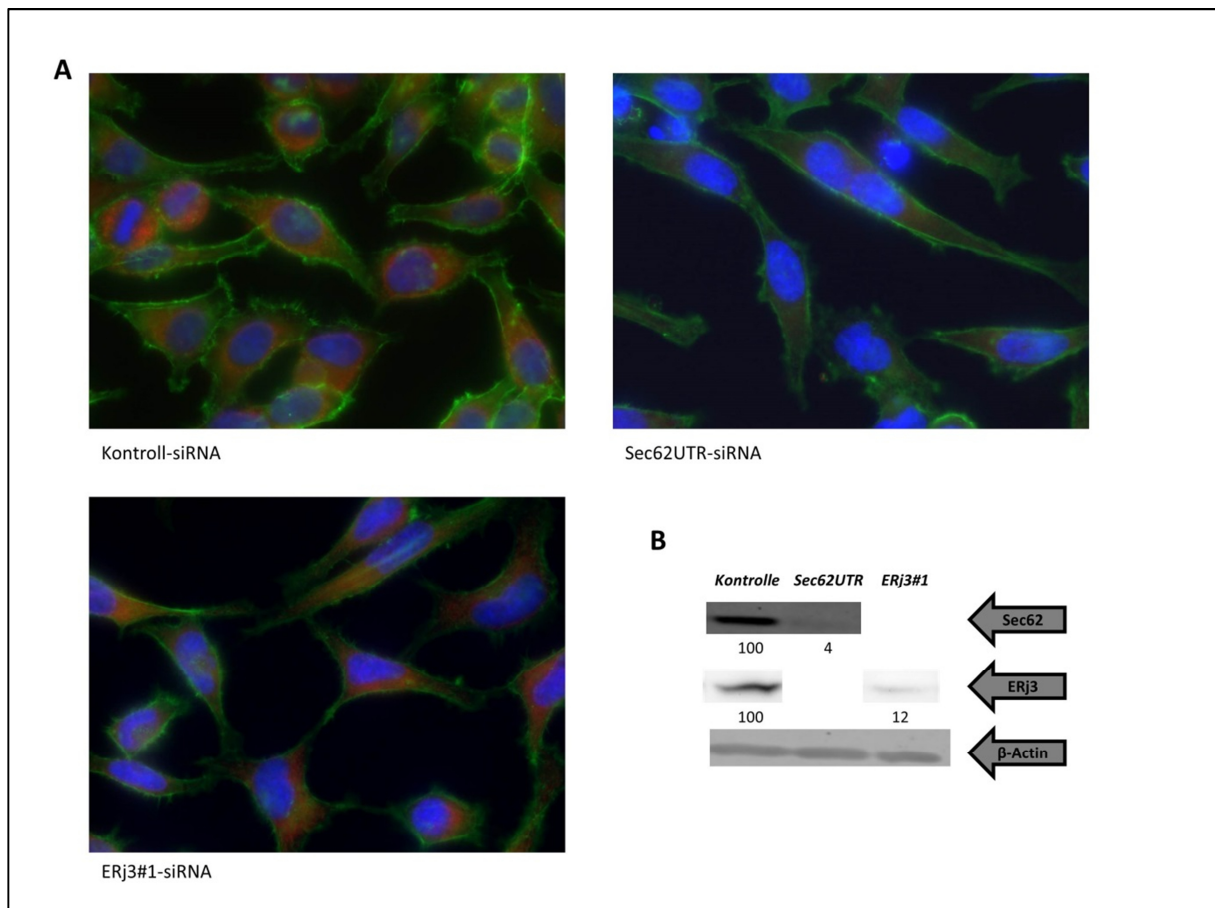


Abb. 4.7: Morphologie des Aktinzytoskeletts von HeLa-Zellen nach Depletion von ERj3 beziehungsweise Sec62. Nach RNA-Interferenz-basierendem silencing von ERj3 beziehungsweise Sec62 wurden die zu untersuchenden HeLa-Zellen fixiert und mit drei Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Für die exakte Durchführung der Färbung siehe Kapitel 3.2.8 und 3.2.9. **A** Mit DAPI gefärbte Zellkerne leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop blau, Sec62 wurde mit einem rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper markiert und das Aktinzytoskelett wurde mittels fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Phalloidins sichtbar gemacht. In den mit Sec62UTR-siRNA behandelten Zellen sieht man eine deutlich abgeschwächte rote Fluoreszenz, was für ein erfolgreiches silencing spricht. Das Zytoskelett hingegen gleicht sich in allen drei untersuchten Proben. **B** Western Blot-Kontrolle des Gen-silencings. Die Depletion von ERj3 beziehungsweise Sec62 verlief zufriedenstellend.

Betrachtet man nun die in Abbildung 4.7 dargestellten immunfluoreszenzmikroskopischen Bilder, so sind mehrere Beobachtungen anzustellen.

Zunächst schien die Proteindepletion wie in Abbildung 4.7 B zu sehen zufriedenstellend verlaufen zu sein. Vergleicht man die Kontroll-siRNA behandelten HeLas mit den Sec62-depletierten so sah man weder in der Flächenausdehnung noch in der Form der Zellen Unterschiede. Beide Kulturen präsentierten sich spindelförmig mit etwa gleichgroßen Kernen – diese stellten sich blau dar – und schmalem Zytoplasmasaum. Einzig das rot angefärbte Sec62 war in den depletierten Zellen naturgemäß nur in Spuren zu erkennen. Selbiges gilt für die ERj3-depletierten Zellen. In diesen ließ sich weiterhin beobachten, dass auch das endoplasmatische Retikulum sich nicht sichtbar in seiner Struktur veränderte. Dieses wurde durch die Sec62-Färbung rot markiert.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die RNA-Interferenz-basierte Depletion von ERj3 oder Sec62 keine Veränderung der Struktur des Aktinzytoskeletts von HeLa-Zellen bewirkte.

4.1.5 *SEC62*-„cross-rescue“ bei ERj3- bzw. ERj6-depletierten HeLas

Aufbauend auf den Versuchen in Kapitel 3.1.2 sollte untersucht werden, ob die Verminderung des Migrationspotentials von ERj3- oder ERj6-depletierten HeLa-Zellen durch die Überexpression von *SEC62* aufgehoben werden kann. Dies geschah durch Transfektion mit einem Vektorplasmid, das Gene für die Resistenz gegen G418, GFP und Wildtyp Sec62 trug (pcDNA3-IRES-GFP Sec62 HS VL). In der Durchführung ergab sich hierbei das Problem, dass mit FuGENE® HD Transfection Reagent behandelte HeLa-Zellen nicht mehr zum Migrieren in der Lage waren. Um dieses Problem zu lösen wurde zunächst ein Transfektionsreagenz ausgesucht, das diese Fähigkeit in den HeLa-Zellen möglichst wenig beeinträchtigte.

Getestet worden sind X-treme Gene™ HP und Lipofectamine® 2000 mit einem Leervektor. Die HeLa-Zellen wurden jeweils nach Herstellerprotokoll mit dem Leervektor transfiziert und anschließend in einem Migrationsassay untersucht. Wie in Abbildung 4.8 zu sehen

4. Ergebnisse

beeinträchtigt weder das eine noch das andere Reagenz die Migrationsfähigkeit der HeLas. Da X-treme Gene™ HP in den beiden biologischen Replikaten eine deutlich geringere Schwankung in der Anzahl der migrierten Zellen aufwies, wurde dieses Reagenz für die weiteren Experimente ausgewählt.

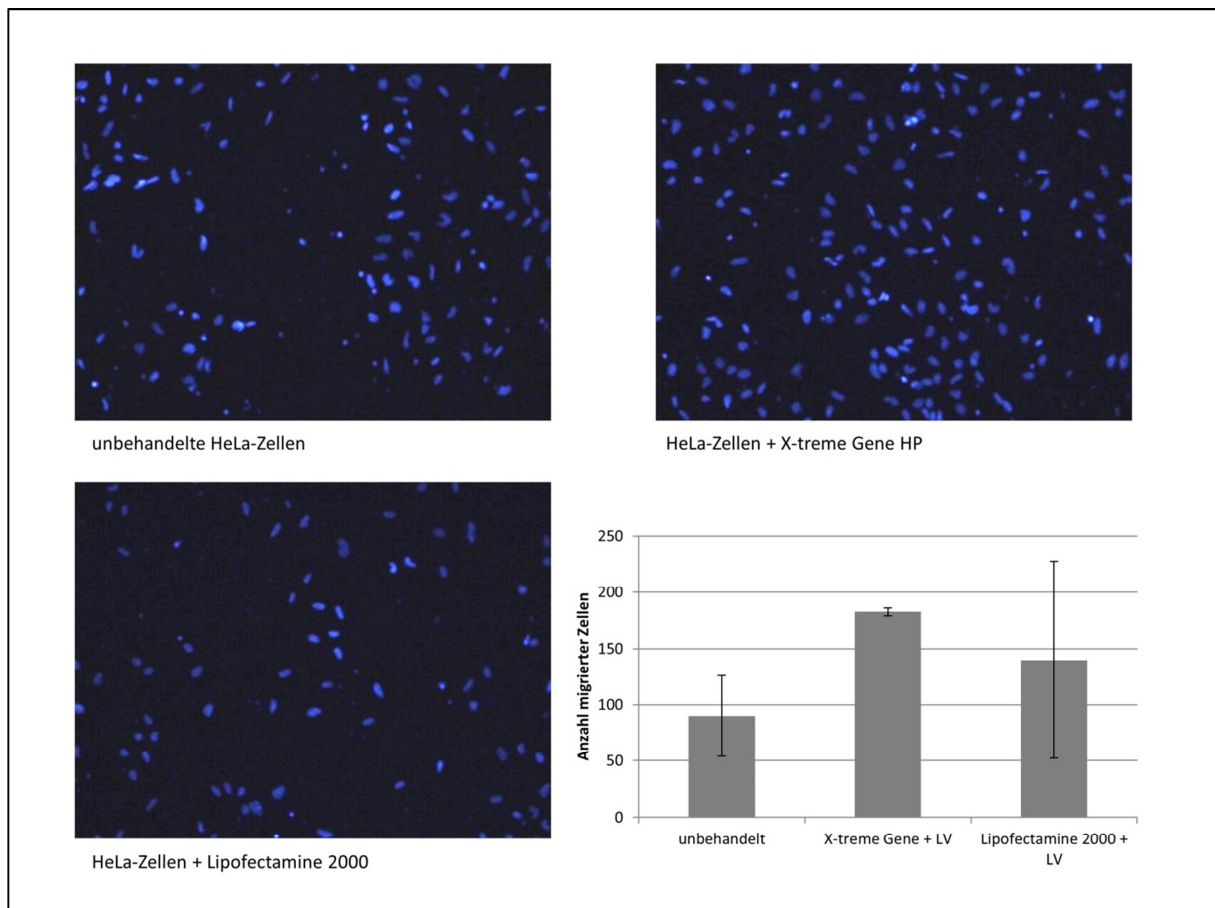


Abb. 4.8: Migrationsfähigkeit von HeLa-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien. Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen entweder mit X-treme Gene™ HP oder Lipofectamine® 2000 nach Verwendungsanleitung des jeweiligen Herstellers behandelt. Anschließend wurden die Zellen, einschließlich einer Kontrolle mit unbehandelten HeLa-Zellen, in einem Migrationsassay untersucht. Für die exakte Anwendung der Reagenzien siehe Kapitel 3.2.5, für die Durchführung des Migrationsassays siehe Kapitel 3.2.10. Es wurden je zwei technische Replikate angefertigt. Die fluoreszierenden Zellkerne der migrierten Zellen wurden ausgezählt, aus den technischen Replikaten gemittelt und mit der Standardabweichung in dem zu sehenden Diagramm aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Migrationsfähigkeit unter Einfluss beider Reagenzien erhalten bleibt. X-treme Gene™ HP zeigte allerdings eine deutlich weniger ausgeprägte Schwankung der Anzahl migrierter Zellen.

Um zu überprüfen, ob ein „*cross-rescue*“ der Migrationsfähigkeit möglich war, wurden die zu untersuchenden HeLa-Zellen zunächst ERj3- beziehungsweise ERj6-depletiert. Dies geschah wie auch zuvor mithilfe von RNA-Interferenz. Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Xtreme Gene™ HP mit Leervektor oder Sec62-Wildtyp-Plasmiden transfiziert. Durch die doppelte Behandlung trat nun wiederum ein neues Problem auf. So starb ein Großteil der behandelten HeLas ab, noch bevor ein Migrationsassay angelegt werden konnte. Aus diesem Grunde war eine Überprüfung der Migrationsfähigkeit nicht möglich. In Abbildung 4.9 wurden unbehandelte HeLa-Zellen fluoreszenzmikroskopisch mit solchen verglichen, die zunächst mit Kontroll-siRNA und anschließend mit einem Leervektor transfiziert worden sind. Auffallend ist hierbei die massive Schrumpfung der Zellen nach Transfektion einhergehend mit einem Verlust der natürlichen Form. Weiterhin sieht man deutlich die geringere Zelldichte der transfizierten HeLas.

Nichtsdestotrotz fand die Auswahl des Transfektionsreagenzes erfolgreiche Anwendung in der weiteren Forschung.

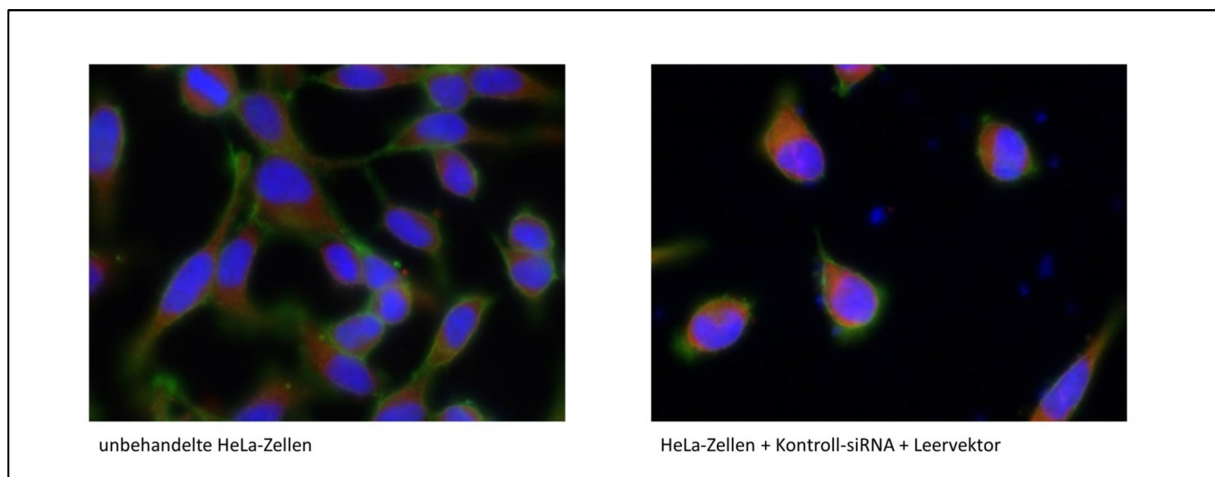


Abb. 4.9: Fluoreszenzmikroskopische Struktur von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA und Leervektor-Plasmiden. Zu sehen ist die Struktur von unbehandelten HeLa-Zellen und solchen, die innerhalb von 72 Stunden zweimal mit HiPerFect und Kontroll-siRNA, sowie einmal mit Xtreme Gene™ HP transfiziert worden sind. Für die detaillierten Transfektionsprotokolle siehe die Kapitel 3.2.4 und 3.2.5. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Für das entsprechende Protokoll siehe die Kapitel 3.2.8 und 3.2.9. Im Fluoreszenzmikroskop imponierten die Zellkerne blau, Sec62 rot und das Aktinzytoskelett grün. Im Vergleich mit den unbehandelten HeLa-Zellen war die Struktur der dreifach transfizierten deutlich runder und es lagen weniger Zellen im Blickfeld. Die morphologischen Veränderungen korrelierten gut mit der Beobachtung, dass ein Großteil der behandelten Zellen bei Ernte bereits tot war.

4.2 Herstellung SEC62-überexprimierender LNCaP-Zellen

Neben den in Kapitel 3.1 behandelten Hsp40-Cochaperonen wurde in dieser Arbeit auch Sec62 untersucht. Ein Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Herstellung einer Zelllinie für weiterführende Experimente am Tiermodell. In diesen sollte die Wirkung von Calmodulinantagonisten wie Ophiobolin A oder Trifluoperazin (TFP) in Kombination mit Thapsigargin (TG) auf SEC62-überexprimierende Tumore überprüft werden. Für eine detaillierte Beschreibung dieser Kombinationstherapie siehe Kapitel 2.2.2. Genauer sollten Beeinflussung von Wachstum und Metastasierungspotential dieser Tumore durch die Therapie betrachtet werden.

Eine mit dem Tierschutz gut verträgliche Zelllinie ist beispielsweise LNCaP. Diese entstammt der Lymphknotenmetastase eines androgensensitiven Prostatakarzinoms und bildet nach Injektion gut messbare subkutane Tumore. Leider gibt es keine LNCaP-Zellen mit im Vergleich zum Gesunden erhöhten Sec62-Niveaus. So sollten für die weiteren Tierversuche stabil SEC62-überexprimierende LNCaP-Zelllinien hergestellt werden.

4.2.1 Methodische Vorversuche

Zunächst war es notwendig ein Transfektionsreagenz zu finden, mit dem LNCaP-Zellen sich gut plasmidtransfizieren ließen. Hierfür wurden die Zellen ausgesät und entsprechend den Herstellerangaben entweder mit Lipofectamine® LTX oder Effectene® behandelt. Eingeführt wurde in die Zellen entweder ein Leervektor (pcDNA3-IRES-GFP-LV MEGA 3113 AZ) oder ein Sec62-Wildtyp-Plasmid (pcDNA3-IRES-GFP Sec62 HS VL). Die Plasmide trugen eine Resistenz gegen G418 (Geneticin) und das Gen für GFP („*green fluorescent protein*“).

Die beiden Transfektionsreagenzien wurden in jeweils aufsteigender Dosierung verwendet, um die optimale Menge für eine maximale Ausbeute zu eruieren. Die Mikroliterangabe in der Abbildung 4.10 A bezieht sich auf $2,5 \times 10^5$ Zellen.

4. Ergebnisse

Betrachtet man nun Abbildung 4.10 A so sieht man, dass eine Transfektion mit Effectene® die Sec62-Niveaus in den LNCaP-Zellen höchstens um 61% anheb. Lipofectamine® LTX hingegen zeigte sich deutlich effektiver mit einer beinahe Versechsfachung der Sec62-Menge nach 48 Stunden. Die beste Ausbeute lieferte hierbei die Verwendung von 18 µl Lipofectamine® LTX auf $2,5 \times 10^5$ Zellen.

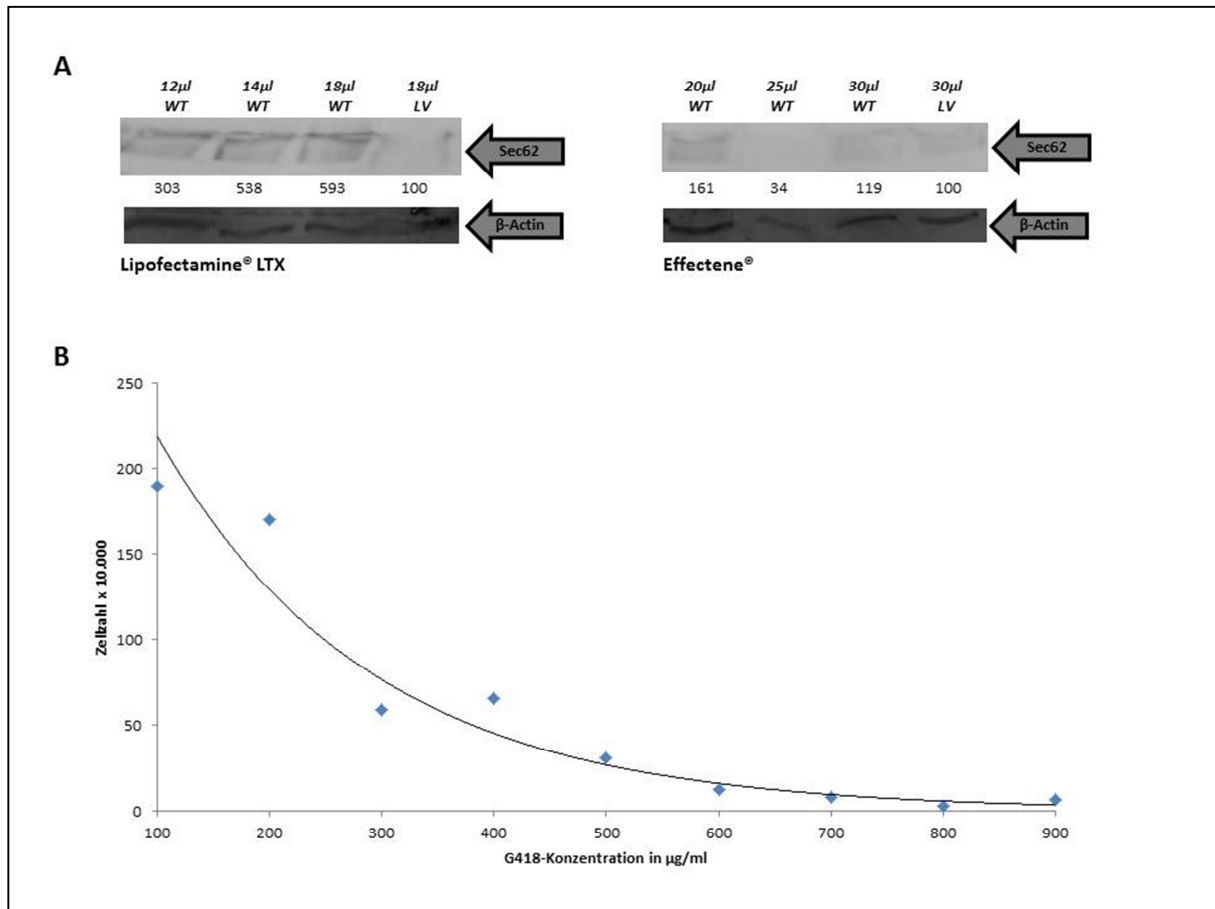


Abb. 4.10: Methodische Vorversuche zur Herstellung stabil SEC62-überexprimierender LNCaP-Zellen. **A** Zunächst erfolgte die Auswahl eines potenten Transfektionsreagenzes. Hierfür wurden LNCaP-Zellen entweder mit Lipofectamine® LTX oder Effectene® nach Herstelleranweisung transfiziert. Für die exakten Protokolle siehe Kapitel 3.2.6. In den aufgeführten Blots sieht man, wie gut die primäre SEC62-Überexpression nach Transfektion mit IRES-GFP-Sec62-Wildtyp-Plasmid (WT) im Vergleich zu mit IRES-GFP-Leervektor (LV) behandelten Zellen war. Es wurden verschiedene Mengen Transfektionsreagenz verwendet, die Menge für $2,5 \times 10^5$ Zellen ist in Mikrolitern über der jeweiligen Bande angegeben. Die Behandlung mit 18 µl Lipofectamine® LTX brachte hier das beste Transfektionsergebnis. **B** Zur Selektion plasmidenthaltender Zellen wurde Geneticin (G418) verwendet. Um die effizienteste Konzentration zu ermitteln, wurden $2,5 \times 10^5$ unbehandelte Zellen mit steigenden Mengen G418 konfrontiert und nach 24 Stunden gezählt. Die Konzentration von 500 µg/ml zeigte bereits bei HEK-Zellen gute Ergebnisse und wurde auch in den folgenden Versuchen verwendet.

Zur Herstellung der stabilen Zelllinien war es notwendig, die plasmidtragenden Zellen von denen zu trennen, bei denen die Transfektion fehlgeschlagen war. Hierfür wurde die auf den verwendeten Plasmiden vorhandene G418-Konzentration herangezogen. Um eine für die Selektion optimale G418-Konzentration zu ermitteln, wurden je $2,5 \times 10^5$ unbehandelte LNCaP-Zellen ausgesät und mit steigenden G418-Konzentrationen konfrontiert. In Abbildung 4.10 B ist dargestellt, wie viele Zellen nach 24 Stunden unter der Geneticinwirkung noch am Leben waren. Da bei $500 \mu\text{g/ml}$ G418 mehr als 80% der Zellen abstarben und diese Konzentration bereits bei stabil transfizierten HEK-Zellen exzellente Ergebnisse zeigte, wurde sie für die weiteren Versuche verwendet.

4.2.2 Darstellung der Abnahme der *SEC62*-Überexpression über Zeit

Um die plasmidenthaltenden Zellen von den nativen zu trennen, wurde das Kulturmedium mit $500 \mu\text{g/ml}$ G418 versehen und regelmäßig gewechselt. Die 48 Stunden nach Transfektion gemessenen Sec62-Niveaus sind Abbildung 4.11 A zu entnehmen. Es sollten drei Zelllinien hergestellt werden. Hiervon sollte eine das Leervektor (pcDNA3-IRES-GFP-LV MEGA 3113 AZ), eine das Sec62-Wildtyp-Plasmid (pcDNA3-IRES-GFP Sec62 HS VL) und eine ein Plasmid mit der Sec62-Mutante D308A (pcDNA3-IRES-GFP EF I.1 Sec62 MutC) tragen. Die Expression der Sec62-D308A-Mutante zeigt den selben Phänotyp wie die RNA-Interferenz-basierte Depletion von Sec62.

Die Zellen wurden über etwa vier Wochen selektiert und anschließend erneut per Western Blot auf ihren Sec62-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 B zu sehen. In dem gezeigten Fall fiel die Expression des Wildtyp-Plasmid auf weniger als ein Drittel, die der Mutante auf weniger als ein Viertel der ursprünglichen Menge direkt nach Transfektion. Dennoch lag eine Überexpression im Vergleich zu den Leervektor-Zellen vor, so dass weiterhin selektiert wurde. In Abbildung 4.11 D wurden die Sec62-Wildtyp-Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es war eine deutliche grüne Fluoreszenz zu erkennen, was für die Expression des plasmidkodierten GFP-Gens spricht.

4. Ergebnisse

Nach vier weiteren Wochen wurde eine neuerliche Western Blot-Kontrolle durchgeführt. Zu erkennen ist in Abbildung 4.11 C, dass nach dieser Zeit keinerlei Überexpression mehr nachgewiesen werden konnte.

Drei Versuche wurden zur Herstellung solcher Zelllinien unternommen und bei jedem zeigte sich das gleiche Phänomen der zeitabhängigen Abnahme einer zunächst deutlichen Überexpression bei persistenter Fluoreszenz und G418-Resistenz.

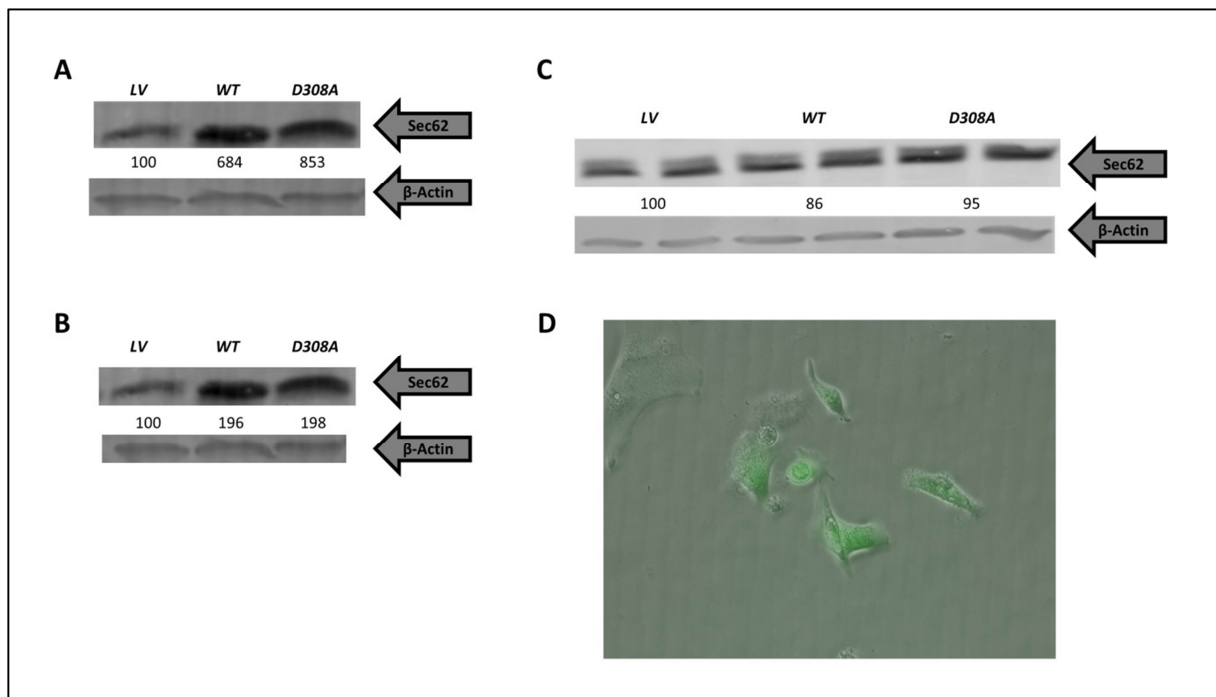


Abb. 4.11: Abnahme der SEC62-Überexpression in plasmidtransfizierten LNCaP-Zellen. In dieser Abbildung ist exemplarisch an einer Selektion stabil transfizierter Zellen zu sehen, wie die SEC62-Expression über den Kurs mehrerer Wochen zurückging. **A** Direkt nach Transfektion sieht man, dass die LNCaP-Zellen, die mit IRES-GFP-Sec62-Wildtyp-Plasmid (WT) oder IRES-GFP-Sec62-D308A-Plasmid behandelt worden sind, eine deutliche Überexpression gegenüber den mit Leervektor (LV) transfizierten Zellen zeigen. **B** Nach circa 4 Wochen wurde die unter G418-Einfluss gewonnene Präselektion untersucht. Diese zeigte nur noch etwa die doppelte Menge an Sec62 gegenüber den mit Leervektor behandelten Zellen. **C** Nach etwa vier weiteren Wochen ist die Überexpression komplett erloschen. Zu jeder Probe wurden zwei Banden angefertigt, deren Mittelwert und Name jeweils zwischen den Banden steht. Die untersuchten Zellen zeigten weiterhin Resistenz gegenüber G418. **D** Fluoreszenzmikroskopie der bei **B** untersuchten IRES-GFP-Sec62-WT-Plasmid Zellen. Man erkennt eine deutliche grüne Fluoreszenz, die für die Expression des GFP-Gens auf dem Sec62-WT-Plasmid spricht.

4.2.3 Migrationspotential *SEC62*-überexprimierender LNCaP-Zellen

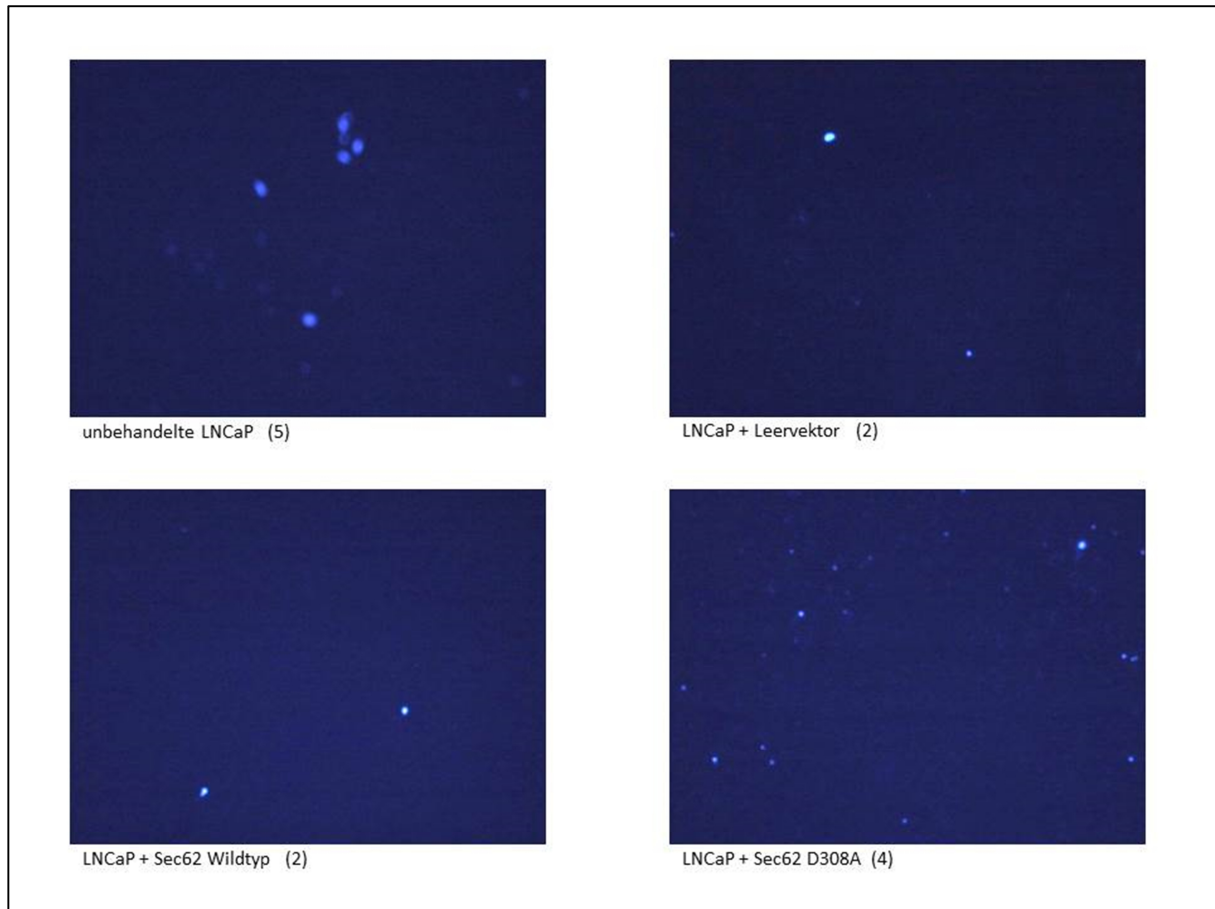


Abb. 4.12: Migrationsfähigkeit von plasmidtransfizierten LNCaP-Zellen nach vierwöchiger Selektion. Zu sehen sind Migrationsassays von Zellen, die vor dieser Untersuchung entweder mit IRES-GFP-Sec62-Wildtyp-, IRES-GFP-Sec62-D308A- oder Leervektor-Plasmid transfiziert und vier Wochen lang unter Einfluss von G418 selektiert worden sind. Zur Anfertigung eines Migrationsassays siehe Kapitel 3.2.10. Die hier untersuchten Zellen entsprechen den Western Blots aus Abbildung 4.11B. In Klammern ist die elektronisch normiert bestimmte Anzahl migrierter Zellen aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass die schlechte Migrationsfähigkeit unbehandelter LNCaP-Zellen sich auch unter doppelter SEC62-Expression in keiner Weise verändert.

Ein wichtiges Ziel in der Therapie *SEC62*-überexprimierender Tumore mit einer Kombination aus Thapsigargin und Calmodulin-Antagonisten ist die Reduktion des erhöhten Metastasierungspotentials der behandelten Zellen. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit eine *SEC62*-Überexpression in LNCaP-Zellen deren Migrationsfähigkeit beeinflusst.

Für die in Abbildung 4.12 gezeigten Migrationsassays sind die in Abbildung 4.11 B und D aufgeführten Zellen verwendet worden. Für eine detaillierte Beschreibung zur Herstellung eines Migrationsassays siehe Kapitel 3.2.10.

Es ist zu erkennen, dass bereits völlig unbehandelte LNCaP-Zellen zum Beispiel im Vergleich zu HeLa-Zellen (siehe Abbildung 4.5) überaus schlecht migrierten. Auch der auf das etwa doppelte elevierte Sec62-Gehalt der mit Sec62-Wildtyp-Plasmid transfizierten Zellen änderte an diesem Umstand nichts.

Eine Erhöhung des Sec62-Niveaus zeigte entsprechend keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von LNCaP-Zellen. Ebenso wenig wurde diese durch die Einführung der D308A-Mutante weiter kompromittiert.

4.3 Untersuchungen zum Interaktom von Sec62

Um ein tiefergehendes Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge in *SEC62*-überexprimierenden Tumoren zu erlangen wurden Studien zum Interaktom von Sec62 durchgeführt. Als Interaktom bezeichnet man die Gesamtheit des molekularen Netzwerks von Wechselwirkungen und Bindungen einer Zelle, meist verwendet in Bezug auf die Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) und Western Blot-Analysen durchgeführt, um Funde aus vorangehenden massenspektrometrischen Experimenten zu bestätigen.

Unabhängig davon wurde weiterhin untersucht, inwieweit eine RNA-Interferenz basierte Depletion von Sec62 die Expression von EP58 in HeLa-Zellen beziehungsweise β IGH3 in murinen LLC-Zellen beeinflusst.

4.3.1 Co-Immunopräzipitation SEC62-überexprimierender HEK-Zellen

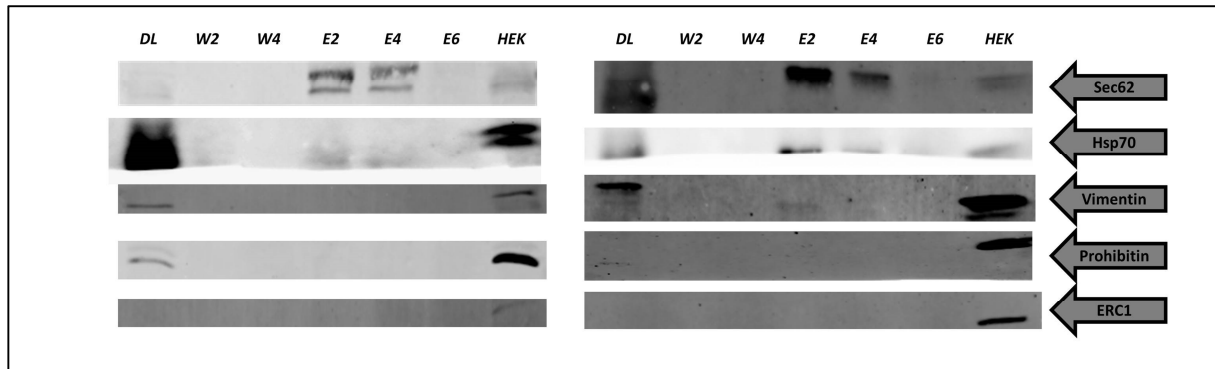


Abb. 4.13: Sec62-Co-Immunopräzipitation von stabil SEC62-überexprimierenden HEK-Zellen. DL = Durchlauf, W = Waschschrift, E = Eluat. Zu sehen sind aus zwei Co-Immunopräzipitationen gewonnene Western Blots. Zur Durchführung einer solchen siehe Kapitel 3.3.4. Es wurde untersucht, ob Sec62 mit Hsp70, Vimentin, Prohibitin oder ERC1 interagiert. Eine vorhandene Bande in einer oder mehreren Eluat-Fractionen spricht dafür, dass das entsprechende Protein an Sec62 binden konnte. Hsp70 zeigte sich hierbei in beiden Versuchen als eindeutig mit Sec62 interagierend. Vimentin zeigte nur im rechten Versuch eine Bande in der Eluat-Fraktion zwei, links ist kein Signal zu erkennen. Prohibitin und ERC1 zeigten im Western Blot keine Interaktion mit Sec62.

Die in diesen Versuchen zu bestätigenden Daten entstammten Co-Immunopräzipitaten, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt und massenspektrometrisch analysiert worden sind. Da diese Methode bereits geringe Spuren von Proteinen nachzuweisen vermag, sollte ein weniger empfindlicher Versuch durchgeführt werden, um die Aussagekraft der Massenspektrometrie zu erhöhen. Die detaillierte Durchführung der beschriebenen Experimente ist Kapitel 3.3.4 zu entnehmen.

Untersucht worden sind stabil SEC62-überexprimierende HEK-Zellen. Diese enthielten ein Sec62-Wildtyp-Plasmid (pcDNA3-IRES-GFP Sec62 HS VL). Für die Durchführung der Co-Immunopräzipitation war zunächst die Herstellung von mit Sepharosematrix befüllten Plastiksäulen notwendig. Diese Matrix trug Protein G, einen Zellwandbestandteil von *Streptococcus pneumoniae*, der die Fc-Teile diverser Säuger-IgG-Antikörper binden kann, in diesem Fall einen affinitätsgereinigten Sec62-Antikörper eines Kaninchens.

Diese Säulen wurden nun für mindestens 10 Stunden mit einem Lysat von 150×10^6 SEC62-überexprimierenden HEK-Zellen umspült. Hierbei kam es zu einer Bindung des Sec62 der

HEK-Zellen an den oben genannten Antikörper, wobei auch Interaktionspartner von Sec62 an der Säule haften blieben. Abschließend wurden die Säulen mit CCP150 und NET-Puffer gewaschen und die gebunden Proteine mithilfe eines Sec62-Peptids (Protein 1152) eluiert. Die Resultate der verschiedenen Wasch- und Eluatschritte wurden aufgefangen, die darin enthaltenen Proteine gefällt und in Western Blots untersucht.

In den Blots gesucht worden sind Vimentin, Hsp70, Prohibitin und ERC1. In Abbildung 4.13 sind die Western Blots zweier Co-IPs zu sehen. Auf beiden sind deutlich Sec62-Banden zu erkennen, was für eine gelungene Immunopräzipitation spricht. Prohibitin und ERC1 konnten in keinem der beiden Versuche detektiert werden. Anders Vimentin und Hsp70. Ersteres zeigte eine Bande in der zweiten Eluatfraktion des rechten Blots, konnte im linken jedoch nicht dargestellt werden. Das 70 kDa schwere Hitzeschockprotein (Hsp70) jedoch war links wie auch rechts in mindestens zwei Eluatfraktionen der Western Blot-Analyse zugänglich. Vimentin und Hsp70 wurden so also als Sec62-Interaktionspartner abermals bestätigt.

4.3.2 EP58- und β IGH3-Gehalt in Sec62-depletierten Zellen

Neben den Co-IPs aus Kapitel 3.3.1 wurden zu Sec62 weitere proteomische Untersuchungen angestellt. So wurde in bislang unveröffentlichten SILAC-Experimenten („*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*“) festgestellt, dass nach Sec62-Depletion unter anderem die Proteine EP58 und β IGH3 in geringerer Menge hergestellt worden sind [Markus Greiner, persönliche Mitteilung]. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zum Testen der entsprechenden Antikörper sollten Western Blot-Analysen Sec62-depletierter Zellen durchgeführt werden, um die exprimierten Mengen von EP58 und β IGH3 zu bestimmen.

Abbildung 4.14 A zeigt die Untersuchung von HeLa-Zellen, die als Reste zweier anderer Experimente in lysiertem Zustand kryokonserviert worden sind. Die Proben wurden erneut aufgekocht, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot untersucht. Die Sec62-depletierten Proben gehören stets zu der links davon stehenden Kontrolle und waren vor ihrer Konservierung nach Sec62-Depletion noch 48 Stunden lang vital.

4. Ergebnisse

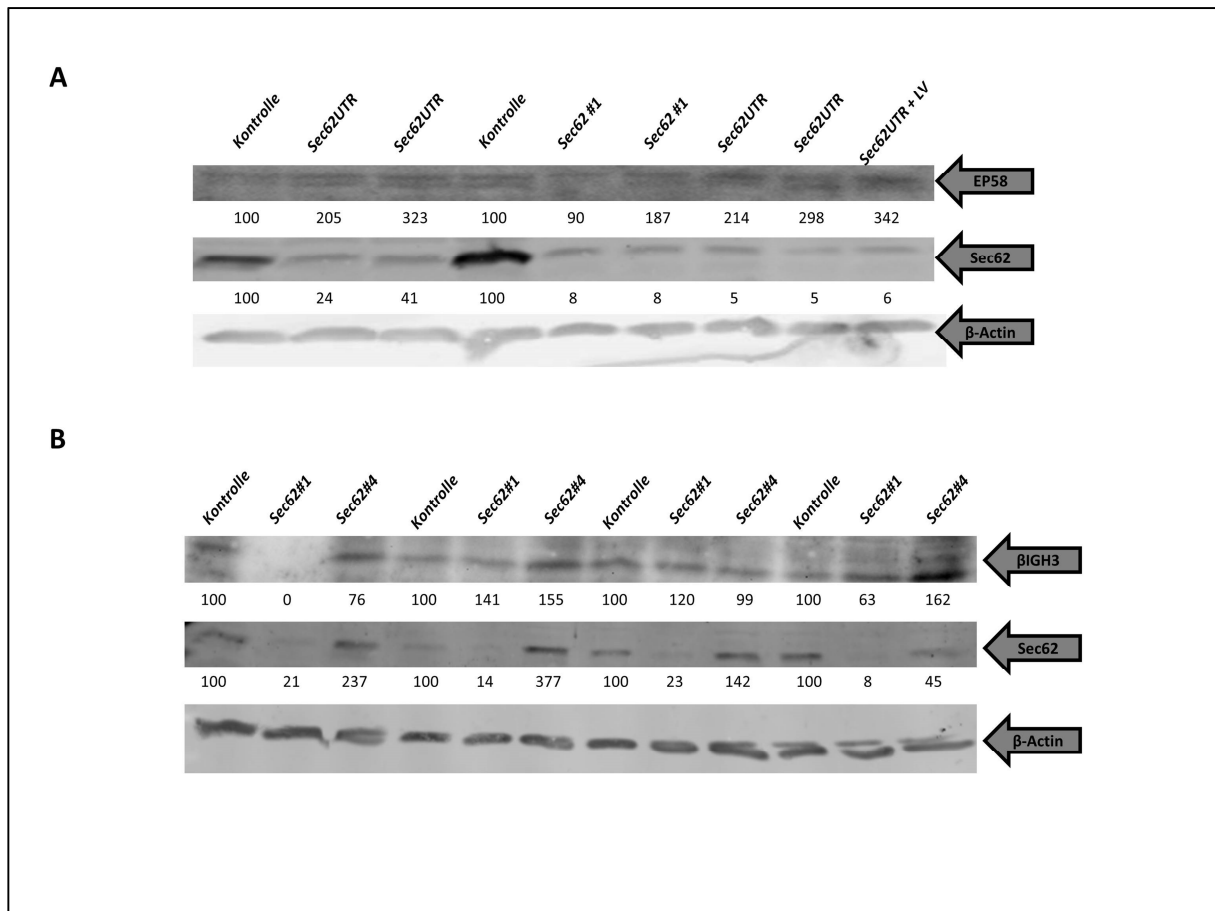


Abb. 4.14: EP58- und βIGH3-Gehalt in siRNA-basiert Sec62-depletierten Zellen. **A** Zu sehen sind Western Blots hergestellt aus gefrorenen Lysaten Sec62-depletierter HeLa-Zellen mit den entsprechend vorangestellten mit Kontroll-siRNA behandelten Proben. Im Schnitt zeigen die Sec62-depletiereten HeLas einen etwa zwei- bis dreifach erhöhten Gehalt an EP58. Im t-test für unverbundene Stichproben ist $p < 0,01$. **B** Untersucht wurden Sec62-depletierte murine LLC-Zellen. Jede Gruppe von Kontroll-, Sec62#1- und Sec62#4-siRNA behandelter Zellen bildet eine Einheit. Erfolgreiche Sec62-Depletion führt bei diesen Zellen zu keiner signifikanten Verringerung oder Erhöhung des βIGH3-Gehalts.

Zur statistischen Analyse herangezogen wurden nur solche Proben, die nie mit einem Plasmid in Kontakt kamen und die eine zufriedenstellende Sec62-Depletion (Restprotein <30%) aufwiesen. Unter diesen Voraussetzungen zeigten die Sec62-depletiereten HeLa-Zellen im Widerspruch zu den älteren SILAC-Experimenten eine zwei- bis dreifache Überexpression von EP58 ($p < 0,01$).

Abbildung 4.14 B beschäftigt sich mit der Expression von βIGH3. Da der zu testende Antikörper vor allem zur Detektion murinen βIGH3s bestimmt war, wurden murine LLC-

Zellen („*Lewis lung carcinoma*“) für die Western Blot-Analyse verwendet. Hierfür wurde in vier biologischen Replikaten eine RNA-Interferenz-basierte Depletion von Sec62 mit den mausspezifischen siRNAs Sec62#1 und Sec62#4 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen nach 48 Stunden von ihren Kulturschalen gelöst, gewaschen und lysiert. Der daraufhin durchgeführte Western Blot zeigte mehrere Ergebnisse. Zum einen war eine suffiziente Depletion (Restprotein <30%) von Sec62 mit der Sec62#4-siRNA nicht möglich. Für die Auswertung der β IGH3-Mengen wurden entsprechend nur die mit Sec62#1-siRNA behandelten Proben genutzt. Diese wiesen jedoch keine klare Abweichung zu den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen auf.

Es erscheint, als hätte die Depletion von Sec62 zumindest in murinen Zellen keinen Einfluss auf die Expression von β IGH3.

5. Diskussion

5.1 Die Hsp40-Cochaperone und deren Einfluss auf verschiedene Zellfunktionen

5.1.1 Konstitutiver ERj6-Mangel und seine Folgen

Für diese Dissertation wurden die Zellen einer Familie untersucht, deren *DNAJC3*, welches für ERj6 kodiert eine homozygote Deletion aufweist. Träger dieser Mutation entwickelten einen Diabetes mellitus und eine multisystemische Neurodegeneration [Synofzik 2014]. Um Zeichen konstitutiv erhöhten ER-Stresses oder einer verringerten Proliferationsfähigkeit suchen zu können, wurden diesen Patienten Fibroblasten entnommen und kultiviert.

Wie in Kapitel 4.1.1 ausführlich beschrieben wurden die Fibroblasten verschiedentlich analysiert. So wurden die Zellen mittels Western Blot zunächst auf deren Sec62- und ERj6-Gehalt hin geprüft. Wenig überraschend war hierbei deutlich zu erkennen, dass die Fibroblasten der Erkrankten nur geringste bis nicht nachweisbare Mengen von ERj6 in sich trugen. Dies ist vereinbar mit einer wie in diesem Fall vorliegenden homozygoten Exondeletion. Der Sec62-Gehalt jedoch blieb bei den homozygoten Mutationsträgern unverändert, sprich es kommt nicht zu einer kompensatorischen Verstärkung der Expression von Sec62 bei chronischer ERj6-Defizienz.

ERj6 ist nicht nur ein Hsp40-Cochaperon, das ER-intralumenal missgefaltete Proteine an BiP weiterleitet [Petrova 2008] und so die Belastung des ER senkt, sondern es wird am Ende der UPR induziert und inhibiert die eIF2 α -Kinasen PKR [Lee 1994] und PERK [Yan 2002, van Huizen 2003]. Durch Phosphorylierung des Elongationsfaktor eIF2 α drosseln diese die gesamte Translationsmaschinerie der Zelle. Die Beendigung dieses Prozesses durch ERj6 fehlt entsprechend bei oben genannten Patienten.

Um zu überprüfen, ob das Fehlen dieser beiden Mechanismen zu konstitutiv erhöhtem ER-Stress führte, wurde in den Fibroblasten der GRP170-Gehalt gemessen. Dieses ist sowohl ein Hsp70-Chaperon wie BiP als auch ein NEF („*nucleotide exchange factor*“) und wird während der UPR induziert [Behnke 2015]. Daher eignet sich die Bestimmung der GRP170-Menge zur Abschätzung der chronischen ER-Belastung. Allerdings lag keine GRP170-

Überexpression in den Fibroblasten der erkrankten Probanden vor. Dies lässt darauf schließen, dass zumindest diese Fibroblasten nicht unter ständig erhöhtem ER-Stress stehen. Nun ist es wichtig zu betrachten, dass Fibroblasten nicht sonderlich stark exkretorisch aktiv sind, vor allem im Vergleich zu beispielsweise β -Zellen des Pankreas.

Um zu untersuchen, wie die Fibroblasten auf neu induzierten ER-Stress reagierten, wurden sie mit Tunicamycin behandelt und anschließend deren Proliferation im xCelligence-System gemessen. Tunicamycin hemmt die erfolgreiche posttranslationale Glykosylierung von Proteinen im ER und führt so zur Aktivierung der UPR. Hier war festzustellen, dass die ERj6-defizienten Zellen und die gesunden Kontrollzellen ohne Tunicamycin-Behandlung etwa gleich gut proliferierten. Dies ist kongruent mit den Erkenntnissen zum GRP170-Gehalt. Unter steigender ER-Belastung wurde die Proliferation der ERj6-defizienten Zellen jedoch immer schlechter im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Es lässt sich also feststellen, dass die ERj6-Defizienz Zellen erst beeinträchtigt, sobald es zu einer Überlastung des ER mit un- beziehungsweise missgefalteten Peptidketten kommt. Dies erklärt, wieso bei den untersuchten Patienten vor allem Neurone und pankreatische β -Zellen absterben. Gerade diese produzieren besonders viele Proteine, die im ER verarbeitet werden und sind so, entsprechend den Tunicamycin-behandelten Fibroblasten, besonders anfällig für den Verlust von ERj6. In sano tragen gerade diese Zellen, aber auch Hepatozyten, besonders hohe Mengen von ERj6 in ihrem ER [Korth 1996]. Für eine repräsentativere Untersuchung zum konstitutiv erhöhten ER-Stress wären dementsprechend Zellkulturen aus Leber-, Pankreas- oder Nervenbiopsaten erforderlich. Diese sind jedoch ob ihrer Invasivität keineswegs perfekte Alternativen zu einer Fibroblastenkultur.

5.1.2 Neurodegeneration, Diabetes mellitus und die UPR

DNAJC3 stellt nicht das einzige Gen dar, das Mutationen tragen kann, die bei ihren Trägern Diabetes mellitus und eine Neurodegeneration bewirken. Beispielsweise wird die Friedreich Ataxie in 98% der Fälle ausgelöst von einer Expansion von GAA-TTC-„triplet-repeat“-Sequenzen im *FXN*-Gen, das für das Protein Frataxin kodiert [Campuzano 1996]. Sie stellt mit

einer Prävalenz von zwei bis vier pro 100.000 in kaukasischen Populationen die häufigste autosomal-rezessive Ataxie dar [Vankan 2013]. Frataxin ist ein Protein, das eine wichtige Rolle an der inneren Mitochondrienmembran spielt [Campuzano 1997]. Seine Funktionen umfassen unter anderem die Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern [Gerber 2003], die Reifung Häm-enthaltender Proteine [Yoon und Cowan 2004] und die Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung [Ristow 2000]. Fehlt Fraxatin kommt es zu mitochondrialen Dysfunktionen [González-Cabo 2013], die nicht nur zu einer schlechteren Energiebereitstellung in den betroffenen Zellen führen, sondern auch die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase und die Tätigkeit von Chaperonen beeinträchtigen [Kwong 2006, Tatsuta und Langer 2008].

Für diese Arbeit bedeutsam ist der Zusammenhang von Frataxin-Depletion, ER-Stress und den daraus resultierend Phänotypen. So zeigten Frataxin-depletierte humane Neuroblastomzellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TG-induziertem ER-Stress mit daraus resultierender erhöhter Apoptoseneigung [Bolinches-Amorós 2014]. Ähnlich den ERj6-defizienten Patienten zeigen an Friedreich Ataxie erkrankte eine gestörte Glukosetoleranz bis hin zu Diabetes mellitus [Campuzano 1996]. Längerfristig Frataxin-defiziente Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich geringere Mengen vitaler pankreatischer β -Zellen [Mollá 2016]. Wie weiter oben beschrieben sind die β -Zellen des Pankreas stark sekretorisch aktiv und reagieren entsprechend empfindlich auf eine gestörte Faltung ER-luminaler Peptidketten, was schlussendlich zur Induktion der Apoptose führt. Möglicherweise führt der Weg vom mutierten *FXN* zum manifesten Diabetes mellitus zunächst über eine mitochondrial bedingte Störung der Calciumhomöostase mit folgender Dysfunktion des Chaperonapparates und der Aktivierung der UPR, was schlussendlich zu Phänotypen führt, die denen eines ERj6-Mangels deutlich ähneln.

Die neurodegenerative Komponente der Friedreich Ataxie betrifft sowohl periphere Nerven (z. B. die propriozeptiven Neurone der dorsalen Wurzelganglione [Koeppen 2011]) als auch das zentrale Nervensystem. In letzterem ist vor allem der Nucleus dentatus des Kleinhirns von Atrophie betroffen [Koeppen 2011]. Als ursächlich für diese Phänotypen wurde eine Myelinisierungsstörung der betroffenen Axone beschrieben [Morral 2010]. Demyelinisierung und ER-Stress wurden bereits unter anderem bei der multiplen Sklerose, der Pelizaeus-

Merzbacher-Erkrankung, der „*vanishing white matter disease*“ und dem Charcot-Marie-Tooth-Syndrom miteinander in Verbindung gebracht [Clayton und Popko 2016]. Myelinproduzierende Glia ist aus zwei Gründen besonders sensibel gegenüber ER-Stress. Erstens besteht das Myelin aus einer überaus großen Menge Lipide. Schätzungen aus morphometrischen Messungen nach nehmen diese bis zum mehr als tausendfachen der Oberfläche anderer Zellen ein [Pfeiffer 1993]. Zweitens ist das Myelin mit einer Vielzahl von Proteinen bestückt, die dem sekretorischen „*pathway*“ folgend im ER gefaltet und zur Sekretion vorbereitet werden [D’Antonio 2009]. Beides führt zu einer überdurchschnittlichen Belastung des ER, was die myelinisierende Glia für zusätzlichen Stress beispielsweise im Rahmen eines ERj6- oder Frataxin-Mangels sensibilisiert und eine erhöhte Apoptoseneigung bewirkt. Als näher zu betrachtendes Beispiel soll das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMT) dienen, da dieses mit einer Prävalenz von 1:2500 die häufigste erbliche neuromuskuläre Störung darstellt [Skre 1974]. Diese ist auf eine Demyelinisierung sowohl motorischer als auch sensorischer peripherer Neurone zurückzuführen [Russo 2011]. Die häufigste Form von CMT ist CMT1A, das auf Defekte (meist eine Duplikation des Gens) im *PMP22* zurückzuführen ist [Hoyle 2015]. Trotz Aggregation des fehlerhaften PMP22-Proteins („*peripheral myelin protein-22*“) im ER zeigen diese Patienten keine Aktivierung der UPR [Dickson 2002]. Bei Patientin mit CMTA1B liegt eine Mutation im für Gen, das für MPZ kodiert („*myelin protein zero*“) vor. MPZ ist das im Myelin peripherer Nerven am meisten vorhandene Protein dar. Seine Missfaltung und Akkumulation im ER aktiviert die UPR [Theocharopoulou und Vlamos 2014]. Die Depletion von CHOP, das im Rahmen der UPR eine pro-apoptotische Wirkung zeigt [Walter und Ron 2006], konnte in Mäusen mit einer „*missense*“ Mutation im *Mpz*-Gen, die Demyelinisierung signifikant reduzieren [Pennuto 2008]. Die hier beschriebenen Befunde weisen der UPR und dem reibungslosen Ablauf der Proteinfaltung und –sekretion eine entscheidende Rolle in der Funktion von Neuronen und pankreatischen β -Zellen zu. Sind diese Funktionen beeinträchtigt, kommt es zum Untergang der betroffenen Zellen. Diese Beeinträchtigung kann verschiedene Ursachen haben. Störungen der Calciumhomöostase im Rahmen z.B. mitochondrialer Dysfunktion, Mutationen von explizit an der Proteinfaltung im ER beteiligten Chaperonen wie ERj6 oder

Aggregation fehlerhafter Proteine im ER und Überlastung seiner Kapazitäten führen allesamt zu einer weniger effektiven Verarbeitung un- und missgefalteter Proteine durch den Chaperonapparat des ER. Die Befunde dieser Dissertation zum ER-Stress in ERj6-defizienten Zellen reihen sich nahtlos in die vorangehend zitierte Literatur ein und zeigen erneut auf, dass das ER eine entscheidende Rolle in erblichen neurodegenerativen Erkrankungen spielt.

5.1.3 Auswirkungen RNA-Interferenz-basierter Depletion von ERj3 bzw. ERj6

Von den sieben bekannten Hsp40-Cochaperonen des endoplasmatischen Retikulums wurden ERj3 und ERj6 in dieser Dissertation aufgrund von Erkenntnissen mehrerer vorangegangener Studien weitergehend untersucht. Am Anfang stand die Beobachtung, dass eine Depletion des Hsp70-Chaperons BiP zu einem erhöhten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER führte [Schäuble 2012]. Dies liegt in dem Umstand begründet, dass BiP als Verschluss für die Pore des Sec61-Komplexes dient [Hamman 1998, Wagner 2003, Alder 2005].

Interessanterweise zeigte sich der identische Phänotyp nach Einführung der BiPR197E-Mutante, die BiPs natürliche Fähigkeit mit Hsp40-Cochaperonen zu interagieren verloren hat [Schäuble 2012]. Folglich war eine maßgebliche Beteiligung von Hsp40-Cochaperonen an der Regulation der ER-Calciumhomöostase sehr wahrscheinlich. ERj3 und ERj6 waren hierbei besonders attraktive Kandidaten, da sie zuvor eine Assoziation mit Sec61 zeigten [Oyadomari 2006, Dejgaard 2010]. In der Tat bewirkte die Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6 im Gegensatz zu allen anderen Hsp40-Cochaperonen einen erhöhten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER [Schorr 2015]. Unabhängig von BiP und den Hsp40-Cochaperonen zeigte die Depletion eines weiteren mit Sec61-assoziierten Proteins – Sec62 – diesen Phänotyp [Greiner 2011].

Ein weiterer Effekt der Sec62-Depletion war eine schlechtere Migrationsfähigkeit der behandelten Zellen [Linxweiler 2012]. Hinweise auf eine Verbindung von Störungen der Calciumhomöostase und einer Verringerung des Migrationspotentials finden sich in der Literatur in Form einer maßgeblichen Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen an entscheidenden

Schritten der Zellmigration zuhauf [Sjaastad und Nelson 1997, Lee 1999, Ridley 2003, Huang 2004]. Calciumabhängige Schritte der Migration stellen zum Beispiel die Lösung fokaler Adhärenzen durch Calpain-Proteasen [Carragher 2006, Chan 2010] oder der Aufbau eines Calciumgradienten in Richtung der Bewegung [Schwab 1997] dar. Des Weiteren bewirken erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen die Kontraktion der Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase und steuern so auch die aktive Fortbewegung der Zelle [Shen 2010]. Die 2012 von Linxweiler et al erhobenen Daten zeigten die oben genannte These bekräftigend einen deutlichen von der Vitalität der Zellen unabhängigen Migrationsdefekt nach Sec62-Depletion.

Weiter bestärkt wird dies durch die Befunde dieser Dissertation. So zeigten HeLa-Zellen nach RNA-Interferenz-basierter Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6 eine signifikante Kompromittierung der Migrationsfähigkeit. Die entsprechenden Daten sind Kapitel 4.1.2 und Abbildung 4.5 zu entnehmen. Dass die verringerte Migrationsfähigkeit nichts mit einem allgemeinen Verlust an Vitalität zu tun hat, zeigen Kapitel 4.1.3 und Abbildung 4.6, in denen keine negative Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit ERj3- beziehungsweise ERj6-depletierter HeLas mithilfe des xCelligence-Systems nachgewiesen werden konnte. Da der gemeinsame Nenner des Sec62-, ERj3- und ERj6-Mangels ein erhöhter Ca^{2+} -Efflux aus dem ER ist, liegt die Vermutung nahe, dass dieser spezifisch für das beobachtete Migrationsdefizit verantwortlich ist.

Die Ursache für die erhaltene Vitalität der Zellen liegt darin begründet, dass nach dem Vier-Phasen-Modell der Apoptoseinduktion [Tombal 2002] eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bis zu einem gewissen Punkt nur eine erhöhte Bereitschaft zur Apoptose bedingt, nicht deren Beginn. Deren weitere Steigerung sollte nun jedoch in einem Proliferationsdefizit aufgrund stattfindender Apoptose münden. Genau dies konnte für Sec62-depletierte Zellen nach Behandlung mit Thapsigargin (TG) gezeigt werden [Linxweiler 2012]. TG ist ein Inhibitor der SERCA („*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase*“). Diese pumpt normalerweise unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol ins ER-Lumen. Deren Inhibition führt entsprechend zu einer steigenden zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Die Untersuchungen zur Kombination von ERj3- beziehungsweise ERj6-Depletion und TG sind Abbildung 4.7 zu entnehmen. Bei Betrachtung des dort dargestellten Balkendiagramms

erscheint es zunächst so, als würde man den Effekt der Sec62-Depletion auch hier beobachten können. Dieser augenscheinliche Trend hielt einer statistischen Analyse jedoch nicht stand. Eine Ursache hierfür kann darin liegen, dass im vorliegenden Fall $n=3$ ist. Die Proliferationsanalyse im xCelligence-System ist natürlich nicht gänzlich frei von Störungen. So kann es sein, dass messungsbedingt Schwankungen bei den durchgeführten Versuchen so hoch waren, dass zwar makroskopisch bereits die erwarteten Tendenzen zu erkennen waren, deren statistische Signifikanz sich jedoch erst durch die häufigere Wiederholung des Versuchs offenbart hätte. Ein Hinweis hierauf ist, dass sich bei höheren TG-Konzentrationen die Standardabweichungen der Daten verringern und gerade nach ERj6-Depletion die in den Diagrammen dargestellten Mittelwerte deutlich verschieden zu denen der Kontroll-siRNA-behandelten Zellen sind. Gewissheit hierüber könnte eine neuerliche Wiederholung der Versuche oder eine anderweitige Prüfung der Zellvitalität oder -proliferation liefern. Beispielsweise wäre es möglich zu untersuchen, ob Zellen nach ERj3- oder ERj6-Depletion unter TG-Einfluss häufiger Apoptose erleiden als solche, die bloß mit einer Kontroll-siRNA behandelt worden sind. Zur Beantwortung solcher Fragen stehen verschiedentliche Apoptoseassays zur Verfügung. Als Beispiel sei hier die Messung der Caspaseaktivität genannt, die auf unterschiedliche Weise erfolgen kann. Zum Einen können von aktiven Caspasen geschnittene Substrate mithilfe von Western Blots quantitativ untersucht werden. Hierfür eignet sich unter anderem das schon in frühen Phasen der Apoptose geschnittene Cytokeratin 18. Zum Anderen kann die Caspaseaktivität gemessen werden, indem man die zu untersuchenden Zellen lysiert und dem Lysat ein synthetisches Substrat zuführt, das nach Umwandlung durch aktive Caspasen Fluoreszenz zeigt.

Eine weitere Ursache für die fehlende statistische Signifikanz könnte sein, dass zwischen ERj3 und ERj6 gewisse Redundanzen bestehen, die die Effekte einer Depletion eines der beiden Proteine auffangen. Ein Hinweis hierauf ist die bloße Lebensfähigkeit der in Kapitel 5.1 diskutierten ERj6-defizienten Patienten, deren nicht unter hohem ER-Stress lebende Fibroblasten keinerlei Vitalitätsdefizit aufwiesen. Eine Überprüfung dieser These wäre im Rahmen eines xCelligence-Experiments nach ERj3-ERj6-co-„*silencing*“ sinnvoll durchführbar. Würden die beiden Proteine die Defizienz des jeweils anderen auffangen, sollte das Fehlen beider in einer deutlichen Apoptoseneigung resultieren. Zumindest auf den Ca^{2+} -Efflux aus

dem ER hat die simultane Depletion der beiden Hsp40-Cochaperone einen höheren Effekt als die Depletion jedes einzelnen [Schorr 2015].

Neben dem Migrationspotential und der Proliferation wurde auch das Aktinzytoskelett von HeLa-Zellen unter Depletion von ERj3 und ERj6 untersucht. Dies geschah immunfluoreszenzmikroskopisch und wurde wegen zuvor in Florian Bochens Masterarbeit „Zellbiologische Voruntersuchungen zum klinischen Einsatz von Calmodulin-Antagonisten bei der Therapie SEC62-überexprimierender Tumore“ (2013) angestellten Beobachtungen durchgeführt. In dieser konnte gezeigt werden, dass Sec62-depletierte SCC1-Zellen deutliche Veränderungen der Struktur ihres Aktinzytoskeletts erlitten. Erstaunlicherweise konnte ein solcher Effekt in HeLa-Zellen weder durch „*silencing*“ von Sec62 noch durch das „*silencing*“ von ERj3 oder ERj6 erreicht werden. Die Organisation des Zytoskeletts hängt maßgeblich von der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ab [Janmey 1994, Li 2016], da deren Erhöhung unter anderem die Depolymerisation von F-Aktin und dessen Rearrangement fördert [Maus 2013]. Des Weiteren zeigten Linxweiler et al 2013, dass Sec62 mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts interagiert, so z.B. mit Vimentin, Plastin 3 und CLIMP-63. Die ausbleibende Veränderung bei HeLa-Zellen trotz suffizienter Depletion könnte ihre Begründung darin finden, dass ähnlich der Apoptoseneigung nach ERj3- und ERj6-Depletion noch zu wenig zytosolisches Calcium vorliegt, um die entsprechende Reaktion auszulösen. Generell zeigten Li et al (2016), dass HeLa- genau wie PC3-Zellen unter Einfluss von H_2O_2 unter einem daraus resultierenden Ca^{2+} -Influx ins Zytosol über den TRPM2-Kanal vergleichbare Veränderungen des Aktinzytoskeletts zeigten wie die oben erwähnten SCC1-Zellen nach Sec62-Depletion, sprich es kam zu einer Flächenausdehnung der Zellen und einer Umverteilung des Aktins vom äußeren Rand der Zellen hinein ins Zytosol. Interessanterweise fanden Li et al eine Korrelation von „*remodeling*“ des Aktinzytoskeletts und der von H_2O_2 beeinflussten zytosolischen Zn^{2+} -Konzentration und zeigten die Unabhängigkeit dieser Prozesse von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Da das endoplasmatische Retikulum als intrazellulärer Zinkspeicher dient [Lu 2016] und Zinkspeicher Thapsigargin- beziehungsweise IP_3 -sensibel entleert werden [Stork 2010], besteht die Möglichkeit, dass die Depletion von ERj3, ERj6 oder Sec62 das Aktinzytoskelett zinkabhängig beeinflusst und SCC1-Zellen auf diesen Einfluss stärker reagieren als die für die Dissertation untersuchten HeLa-Zellen. Zur Beleuchtung

dieser Vermutung wäre es notwendig die zytosolische Zinkkonzentration von HeLa- und SCC1-Zellen nach Depletion von ERj3, ERj6 oder Sec62 zu messen. Dies ist ähnlich der Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen fluoreszenzmikroskopisch möglich [Walkup 2000].

Unabhängig hiervon könnte eine Behandlung mit TG nach „*silencing*“ von Sec62, ERj3 oder ERj6 von HeLa-Zellen hilfreich sein, um zu zeigen, dass eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration Veränderungen des Aktinzytoskeletts verursacht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Depletion von ERj3 und ERj6 in HeLa-Zellen die Phänotypen einer erhöhten zytosolischen Calciumkonzentration ausgelöst durch ein Ca^{2+} -Leck im Sec61-Kanal zeigt. Kongruent zum Stand der Forschung zu Apoptose, Zellwanderung und Zytoskelett ist vor allem das Migrationspotential auf diese Weise behandelte HeLas beeinträchtigt. Weitere Experimente, zum Beispiel unter ERj3-ERj6-co-„*silencing*“ oder Depletion eines der Proteine und Hinzugabe von Thapsigargin könnten diese Befunde jedoch noch weiter erhärten.

5.1.4 *SEC62*-„*cross-rescue*“ nach ERj3- bzw. ERj6-Depletion

Um die Frage zu beantworten, ob die Depletion von ERj3 beziehungsweise ERj6 ihre Effekte durch eine Beeinflussung von Sec62 auslöst, wurde die Überlegung angestellt, zuerst ERj3 oder ERj6 in HeLa-Zellen zu depletieren und anschließend plasmidkodiertes Sec62 exprimieren zu lassen. Wäre der Calciumausstrom aus dem ER durch die Beeinträchtigung einer solchen Interaktion zu erklären, sollte die Überexpression von *SEC62* die oben beschriebenen Effekte zumindest teilweise rückgängig machen.

Bei dem Versuch diese Frage zu beantworten zeigten sich mehrere Probleme. Zunächst war es nach dem etablierten Plasmidtransfektionsprotokoll nicht möglich aussagekräftige Migrationsassays herzustellen. Nach Kontakt mit dem üblicherweise gebrauchten Reagenz FuGENE® HD verloren selbst Zellen mit normalerweise sehr gutem Migrationspotential ihre Fähigkeit zu wandern. Um diesen Umstand zu umgehen, war es notwendig ein Reagenz zu finden, das die Migrationsfähigkeit von HeLa-Zellen bei gutem Transfektionsergebnis nicht

beeinflusst. Dieses fand sich nach den in Abbildung 4.8 dargestellten Versuchen in XtremeGENE™ HP.

Die nachfolgend durchgeführten Experimente zeigten jedoch neue Schwierigkeiten. So waren die zweifache Behandlung mit siRNA und anschließende Plasmidtransfektion eine zu starke Belastung für die zu untersuchenden HeLa-Zellen, deren Vitalität stark unter dem verwendeten Protokoll litt. In Abbildung 4.9 ist deutlich zu erkennen, wie die mit Kontroll-siRNA und Leervektor transfizierten HeLas abgekugelt und in ihrer Zelldichte stark dezimiert zurückblieben. Von den $2,5 \times 10^5$ ausgesäten Zellen blieben stets nur wenige tausend am Leben. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Transfektion und des bereits vorhandenen Modells der Interaktion von ERj3 und ERj6 mit BiP und des so gut zu erklärenden Calciumausstroms nach „*silencing*“ wurde der Versuch des „*cross-rescues*“ hier nicht weiter verfolgt.

Nebenbefundlich sei hinzugefügt, dass die ERj6-defizienten in Kapitel 5.1 diskutierten Fibroblasten keine Veränderungen in ihrem Sec62-Gehalt aufwiesen, was als weiteres Indiz für die Unabhängigkeit der Hsp40-Cochaperone von Sec62 herangezogen werden kann.

Nichtsdestotrotz gäbe es verschiedene Möglichkeiten einen solchen „*cross-rescue*“ anderweitig zu testen. Zunächst wäre es nicht undenkbar, dass bei einer größeren Zahl transfizierter HeLas eine ausreichende Menge vitaler Zellen übrig bliebe, um sowohl eine Western Blot Kontrolle der Proteinmengen als auch einen Migrationsassay durchzuführen. Wie aussagekräftig letzterer bei der stark beeinträchtigten Vitalität der umliegenden HeLas sein würde, ist fraglich. Weiterhin könnte man in konstitutiv SEC62-überexprimierenden Zellen ERj3 oder ERj6 „*silencen*“ und betrachten, inwieweit diese Zellen im Vergleich zu solchen mit normalen Sec62-Niveaus in ihrer Migrationsfähigkeit beeinträchtigt werden würden. Hierfür würden sich zum Beispiel die von Markus Greiner stabil mit einem Sec62-Wildtyp-Plasmid transfizierten HEK-Zellen eignen, insbesondere da es hier eine Kontroll-Zelllinie gibt, die stabil mit einem Leervektor transfiziert ist.

Unabhängig vom „*cross-rescue*“ wurde eine Methode etabliert Migrationsassays nach alleiniger Behandlung mit XtremeGENE™ HP anzufertigen, ohne die Migrationsfähigkeit der zu untersuchenden Zellen zu beeinträchtigen. Diese Methode findet weiterhin Anwendung.

5.1.5 ERj3 als Therapieansatz bei lysosomalen Speicherkrankheiten

Im ER lokalisierte Chaperone sind nicht nur an Erkrankungen beteiligt, deren gemeinsame Endstrecke die Überlastung des ER mit un- beziehungsweise missgefalteten Proteinen und folgender Apoptose ist. Dieser Umstand ist Ausdruck der verschiedenen Funktionen, die diese Proteinfamilie unabhängig von ihren Hsp70-assoziierten Aufgaben erfüllt [Ajiit Tamadaddi und Sahi 2016]. Das in dieser Arbeit untersuchte ERj3 ist beispielsweise daran beteiligt eine Aggregation seiner Substrate im ER zu verhindern [Shen und Hendershot 2005] und dient weiterhin als Adapter der ERAD („*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*“) [Yu und Haslam 2005]. Letztere Funktion zeigte eine interessante Rolle bei der häufigsten lysosomalen Speicherkrankheit, dem Morbus Gaucher [Tan 2014]. Bei dieser Erkrankung kommt er aufgrund verschiedener Mutationen der β -Glukocerebrosidase (GCCase) zu einer Akkumulation von Glukosylceramid und Glukosylsphingosin [Hruska 2008], die vor allem in Neuronen des zentralen Nervensystems stattfindet und hier je nach Mutation zu einer verschieden stark ausgeprägten Neurodegeneration führt [Futerman und van Meer 2004]. Tan et al., (2014), gingen der Frage auf den Grund, wieso Patienten mit Mutationen der GCCase, die nicht zu einem vollständigen Verlust der Enzymfunktion führten, ebenfalls Symptome der Neurodegeneration entwickelten. Es zeigte sich, dass die besagten Mutationen zu einer Akkumulation des defekten Enzyms im ER führten. Das akkumulierte Protein wurde trotz seiner erhaltenen Funktionalität jedoch durch ERj3 der ERAD zugeführt. Interessanterweise konnten Tan et al. durch ERj3-Depletion die korrekte Faltung der mutierten GCCase durch Calnexin ermöglichen und ihre lysosomale Aktivität erhöhen. Weiter verbessert wurde dieser Effekt durch die Kombination aus ERj3-Depletion und der Gabe von Dilatiazem. Diltiazem blockiert den ER-Ryanodin-Rezeptor- Ca^{2+} -Efflux-Kanal und verbessert dadurch die Chaperonaktivität des Calnexin-A Ca^{2+} -abhängigen Chaperons [Ong 2010]. Die Akkumulation von Glukosylceramiden in den Lysosomen eines Neurons führt zu einem starken Ca^{2+} -Ausstrom über genau diesen Kanal, was ein wichtiger Faktor in der Induktion der Apoptose der degenerierenden ZNS-Neurone darstellt [Pelled 2005]. Entsprechend führt Diltiazem die Ca^{2+} -Homöostase des ER hier wieder in eine physiologische Richtung.

Die Depletion von ERj3 mit zusätzlicher Gabe von Diltiazem würde demnach eine gute Therapieoption bei Patienten mit Morbus Gaucher darstellen, die nicht von einer Enzymsubstitution profitieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die bloße Depletion von ERj3 zunächst kein Defizit in der Vitalität der behandelten Zellen bewirkt. Weiterhin wurde die Vermutung angestellt, dass ERj6 gewisse Funktionen, insbesondere die mit Bezug zu BiP von ERj3 übernehmen kann. Diese Erkenntnisse können als positiv für die Suche nach einer Möglichkeit der systemischen Ablation von ERj3 *in vivo* und der vermuteten Verträglichkeit dieser Therapiemethode betrachtet werden.

Die ERAD wurde mit verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel der SBMA (spinale und bulbäre Muskelatrophie) [Rusmini 2016] in Verbindung gebracht. Die Untersuchung monogenetischer Erkrankungen auf eine Interaktion der mutierten Genprodukte auf deren Interaktion mit ERj3, zum Beispiel mithilfe von Co-Immunopräzipitation, könnte neue Hinweise auf deren pathogenetische Mechanismen liefern und in Zukunft einen vielversprechenden Therapieansatz aufzeigen.

5.2 LNCaP und Möglichkeiten der stabilen Transfektion

In Kapitel 2.2.2 wurde ausführlich die Möglichkeit einer Kombinationstherapie SEC62-überexprimierender Tumore mit einem Calmodulinantagonist wie Trifluoperazin (TFP) oder Ophiobolin A und Thapsigargin (TG) beschrieben [Linxweiler 2013].

Um die Durchführbarkeit einer solchen Therapie überprüfen zu können, wurden Versuche mit „*athymic nude*“-Mäusen geplant. Diese sind immuninkompetent, was notwendig ist, da es sonst zu einer Abstoßung implantierter heterologer Tumorzellen käme. Verwendung fanden Zellen der Linien SCC1 und LLC. SCC1 entstammen einem humanen Mundboden-Plattenepithelkarzinom und sollten nach subkutaner Injektion in die Flanken der Mäuse lokale Tumore bilden. LLC-Zellen sind kultivierte Zellen eines primären „Lewis“-Lungenkarzinoms, die zuvor aus der Lunge einer Maus gewonnen worden sind. Diese sollten den Mäusen in ihre Schwanzvenen injiziert werden und anschließend zur Bildung von

Fernmetastasen in der Lunge führen. Da es sich hierbei um murine Zellen handelte, hätten diese auch Verwendung in nicht immuninkompetenten Mäusen finden können.

Hierbei zeigte sich jedoch das Problem, dass kein geeignetes „*Imaging*“-System zur Verfügung stand, um die Bildung von Lungenmetastasen in den Mäusen zu überwachen. Dies hätte eine unkontrollierte Metastasierung und möglicherweise einen qualvollen Erstickungstod für die Tiere zur Folge. Um dennoch den Einfluss von Sec62 auf die Proliferationstendenz von Tumoren untersuchen zu können, wurde eine Zelllinie ausgewählt, die keinen erhöhten Sec62-Gehalt ausweist – LNCaP („*lymph node carcinoma of the prostate*“). Bereits zuvor wurde gezeigt, dass diese Zelllinie keine Flankentumoren in den „*athymic nude*“-Mäusen erzeugte [Markus Greiner, persönliche Mitteilung]. Zur Beantwortung der Frage, ob eine Elevation des Sec62-Gehalts der Zellen dieses Umstand änderte und eine Bildung von Tumoren ermöglichte, sollten stabil *SEC62*-überexprimierende LNCaP-Zellen hergestellt werden. Des Weiteren sollte eine Zelllinie hergestellt werden, die stabil die Sec62-Mutante Sec62-D308A exprimiert, um genaueren Einblick darüber zu erhalten, welche Funktionalität von Sec62 die Tumorinduktion fördert. Diese Mutation macht ein Calcium-bindendes Motiv in Sec62 funktionslos und erzeugt so den gleichen Phänotyp wie eine Sec62-Depletion [Linxweiler 2013].

Das Ziel der stabilen Transfektion sollte per Plasmidtransfektion und anschließender Selektion plasmidtragender Zellen erreicht werden. Die verwendeten Plasmide trugen neben dem Gen für GFP („*green fluorescent protein*“) eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G418) und entweder Wildtyp-*SEC62* oder *SEC62*_{D308A}. Nach der Auswahl eines geeigneten Transfektionsreagenzes und der Bestimmung einer zur Selektion ausreichenden G418-Konzentration, wurden jeweils drei Transfektionsansätze hergestellt, einmal mit einem Leervektor, einmal mit einem *SEC62*-Wildtyp-Plasmid und einmal mit einem *SEC62*_{D308A}-Plasmid. Für eine Darstellung der Vorversuche siehe Abbildung 4.10.

Nach Transfektion mit dem zu Anfang ausgewählten Reagenz Lipofectamine® LTX zeigten sich zunächst hervorragende Ergebnisse mit einer bis zu siebenfach gesteigerten Menge an Sec62 in den LNCaPs. Im Verlauf mehrerer Wochen zeigte sich jedoch eine Abnahme der

Sec62-Mengen in den transfizierten Zellen bis auf das Normalmaß, sprich es lag keine erwünschte Überexpression mehr vor. Dieses Ergebnis ließ sich dreimal reproduzieren. Am wahrscheinlichsten lag dem eine Herabregulation der Herstellung plasmidkodierten Sec62 zugrunde und keine Abstoßung des Plasmids *per se*. Hinweisend für diese These ist die Tatsache, dass die LNCaPs unter sinkenden Sec62-Niveaus immer noch resistent gegen G418 waren und außerdem noch grüne Fluoreszenz zeigten. Dazu passende Daten sind Abbildung 4.11 zu entnehmen.

Es stellt sich die Frage, welche Möglichkeiten blieben, um eine wirklich stabile Überexpression von SEC62 in den LNCaP-Zellen zu erreichen. So haben beispielsweise Zhang et al nach Elektroporation der LNCaPs eine stabile Transfektion mit einem Plasmid erreicht, das für E6-assoziiertes Protein und die G418-Resistenz kodierte [Zhang 2015]. Dieser Erfolg ist jedoch wahrscheinlich eher auf das verwendete Plasmid zurückzuführen als auf die Transfektionstechnik, da das primäre Transfektionsergebnis mit Lipofectamine® LTX sehr gut war. Möglicherweise würde die Erzeugung einer stabilen Zelllinie mit dem von Zhang et al verwendeten pRevTRE2 besser gelingen als mit dem hier eingesetzten pcDNA3-IRES-Vektor. Einen anderen Ansatz wählten Yu et al, die die erfolgreiche stabile Transfektion von LNCaP-Zellen mit Lentiviren, die das Androgen-Rezeptor-Gen trugen, erreichten [Yu 2014]. Generell erscheint diese Methode überaus sinnvoll, da die Virus-RNA nach reverser Transkription in das Genom der Wirtszelle integriert wird [Kafri 2004]. Fände die Regulation der SEC62-Expression allerdings zum Beispiel auf Ebene der mRNA statt, würde die bloße Veränderung der Lokalisation des Vektors keinen Unterschied machen. Außerdem wäre für die längerwierige Herstellung und Verwendung eines retroviralen Transduktionsvektors ein Labor höherer Sicherheitsstufe notwendig.

Des Weiteren erschien das Migrationspotential der LNCaP-Zellen aufgrund spezifischer Charakteristika dieser Zellreihe als nicht geeignet für eine angemessene Beurteilung. Bereits unbehandelt zeigten die Zellen äußerst geringe Bereitschaft zur Migration. Dies äußerte sich beispielsweise darin, dass die LNCaPs sich nicht flächig in ihren Kulturflaschen ausbreiteten, sondern untereinander recht stark adhärent in dreidimensionalen Haufen wuchsen. Dazu passend zeigten Migrationsassays sowohl unbehandelter als auch SEC62-

überexprimierender Zellen überaus kleine, in den Bereich von Artefakten reichende Zahlen migrierter Zellen. Ein Beispiel ist Abbildung 4.12 zu entnehmen.

Schlussendlich sprachen die Befunde und Überlegungen in Zusammenschau für eine Einstellung der stabilen Transfektion von LNCaPs mit *SEC62*-tragenden Vektoren. Zudem ergab sich während der beschriebenen Versuche eine Möglichkeit zur nicht-invasiven Detektion von Lungenmetastasen in den zu untersuchenden Mäusen, was die Verwendung von LNCaP-Zellen hier weitestgehend obsolet machte.

5.3 Erkenntnisse zum Interaktom von Sec62

Die in Kapitel 4.3 beschriebenen Versuche zum Interaktom von Sec62 und die Untersuchungen zur Genexpression nach RNA-Interferenz-basiertem „*silencing*“ von Sec62 wurden durchgeführt, um zum Einen Funde aus vorangegangenen Studien zu verifizieren und zum Anderen die vielfältigen Funktionen von Sec62 in der menschlichen Zelle besser verstehen zu können.

5.3.1 Vimentin und Hsp70 als Interaktionspartner von Sec62

In einer früheren Arbeit wurden die Ergebnisse einer ausführlichen Suche nach Interaktionspartnern von Sec62 aufgezeigt [Linxweiler 2014]. Die Suche erfolgte mit Hilfe von Co-Immunopräzipitation und Massenspektrometrie.

Die in Kapitel 4.3.1 gezeigten Co-Immunopräzipitationen dienten der Verifikation der zuvor von Linxweiler et al massenspektrometrisch erhobenen Daten. Die Massenspektrometrie ist eine Methode, mit der geringste Proteinmengen detektiert werden können. So bestand die Möglichkeit, dass bereits geringe Mengen unspezifisch an Sec62 bindender Proteine als potentielle Interaktionspartner identifiziert worden sind. Um die Aussagekraft der Ergebnisse für bestimmte funktionell interessante Proteine zu erhöhen, wurde deren Sec62-Interaktion in einer weit weniger sensiblen Methode ebenfalls nachgewiesen. Hierfür

wurden eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) mit anschließender Western Blot-Kontrolle der gesuchten Proteine durchgeführt.

Zur Überprüfung vorgesehen waren Hsp70, Vimentin, Prohibitin und ERC1. Vor allem die ersten beiden sind im Rahmen dieser Arbeit interessant, da ihre Interaktion mit Sec62 dessen Bedeutung sowohl für die Proteinhomöostase des ER als auch für das Zytoskelett verdeutlicht. Im Western Blot nach Co-IP nachgewiesen wurden Hsp70 (zweimal) und Vimentin (einmal). Diese Befunde interpretierend spricht dies jedoch weniger gegen eine nicht vorhandene Interaktion von Prohibitin und ERC1 mit Sec62 als viel mehr für eine starke Interaktion von Hsp70 und Vimentin mit Sec62. Es ist wahrscheinlich, dass die interagierenden Mengen der hier negativ getesteten Moleküle schlicht zu gering für eine Detektion im Western Blot waren. Dass Hsp70 und Vimentin in so großer Menge gefunden worden sind, ist jedoch ein die Massenspektrometrie deutlich verifizierender Fund. Gerade die Sec62-Interaktion von Vimentin ist kongruent mit zuvor erhobenen Befunden zur Veränderung des Zytoskeletts von PC3-Zellen nach Sec62-Depletion [Florian Bochen, persönliche Mitteilung].

Interessanterweise ist Vimentin ein prognostischer Marker in NSCLC („*non-small-cell lung cancer*“) [Al-Saad 2008] und steht in Zusammenhang mit verschiedenen malignen Erkrankungen, in denen es bereits als potentiell Therapie-„*target*“ diskutiert wird [Satelli 2011]. Auch Hsp70 wurde bereits eine wichtige Rolle in bestimmten karzinomatösen Erkrankungen, namentlich dem Urothelkarzinom, zugeschrieben [Garg 2010].

Die diskutierten Befunde zementieren also sowohl die Befunde zur Interaktion dieser beiden Proteine mit Sec62 als auch deren Verwicklung in Entstehung und Beeinflussung maligner Erkrankungen, sowie deren Potential als Ziele einer „*targeted therapy*“.

5.3.2 EP58, β IGH3 und deren Abhängigkeit von der SEC62-Expression

Unabhängig der in Kapitel 5.3.1 diskutierten Veröffentlichung wurde für diese Dissertation untersucht, inwieweit die Depletion von Sec62 die Expression der Gene *KDELC1* und *TGFBI* beeinflusst. Grundlage für diese Versuche waren SILAC-Experimente („*stable isotope labeling*“

with amino acids in cell culture“), in denen auffiel, dass die Produkte der bezeichneten Gene, namentlich EP58 und β IGH3, nach Sec62-Depletion in geringerer Menge nachzuweisen waren als in nicht Sec62-depletierten Zellen [Markus Greiner, persönliche Mitteilung]. Die Überprüfung von mit SILAC erhobenen Daten durch Western Blots ist eine übliche Methode und sollte auch in diesem Falle durchgeführt werden.

Zur Erhebung der EP58-Daten wurden für vorangehende Versuche Sec62-depletierte und anschließend kryokonservierte HeLa-Zellen verwendet. Paradoxa Weise zeigten die angefertigten Western Blots mit einem $p < 0,01$, dass EP58 72 Stunden nach erfolgreicher Depletion von Sec62 in bis zu dreifacher Menge im Vergleich zu den ebenfalls betrachteten Kontrollzellen vorlag. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte sein, dass die Western Blots bereits nach einem 72stündigen „*silencing*“ durchgeführt worden sind, die SILAC-Experimente jedoch einige Zeit mehr in Anspruch nahmen, in der es erst zur Herabregulation der EP58-Produktion kam. Um dies zu kontrollieren wäre es möglicherweise sinnvoll, nach 120 Stunden der Sec62-Depletion Western Blots herzustellen.

Die Kontrolle der β IGH3-Mengen erfolgte in murinen LLC-Zellen, da der vorhandene anti- β IGH3-Antikörper gegen murines β IGH3 gerichtet war. Diese wurden Sec62-depletiert und anschließend nach 48 Stunden, 72 Stunden, 96 Stunden und 120 Stunden einer Western Blot-Analyse unterzogen. Zu keiner der Zeiten zeigte sich bei zufriedenstellender Sec62-Depletion eine signifikante Änderung der β IGH3-Mengen im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten Kontrollzellen. Diese Diskrepanz zu den SILAC-Versuchen könnte ihre Begründung eventuell in Unterschieden zwischen murinen und humanen Zellen in Bezug auf deren exakte β IGH3-Funktionen finden, die im Detail noch unbekannt sind. Für aussagekräftigere Daten wäre es daher wichtig menschliche Zellen auf ihren β IGH3-Gehalt nach „*silencing*“ von Sec62 zu untersuchen.

EP58 („*endoplasmic reticulum protein 58*“) ist ein Protein, das vermutlich eine Rolle bei der Polysaccharidsynthese im ER spielt [Kimata 2000]. Seine Überexpression bei durch Sec62-Depletion verursachten ER-Stress könnte auf eine Rolle bei der Reduktion der Proteinlast im ER durch posttranslationale Modifikation hindeuten.

β IGH3 wiederum übernimmt verschiedene Funktionen in Migration, Zelladhäsion, Apoptose und Tumorgenese [Bae 2002]. Eine Reduktion seiner Expression nach Sec62-Depletion

nachzuweisen und zu bestätigen wäre durchaus interessant, da beispielsweise gezeigt wurde, dass das β IGH3-Niveau in primären Lungenkarzinomen reduziert ist [Zhao 2006].

1. **Abell BM, Pool MR, Schlenker O, Sinning I, High S. (2004)** Signal recognition particle mediates post translational targeting in eukaryotes. *EMBO J* **23**:2755-2764
2. **Ajit Tamadaddi C, Sahi C. (2016)** J domain independent functions of J proteins. *Cell Stress Chaperones* **21**:563-570
3. **Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. (2008)** The prognostic impact of NF- κ B p105, Vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **99**:1476-1483
4. **Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. (2005)** The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **31**:389-399
5. **Andriole GL Jr. (2012)** PSA screening and prostate cancer risk reduction. *Urol Oncol* **30**(6):936-937
6. **Bae JS, Lee SH, Kim JE, Choi CY, Park RW, Yong PJ. (2002)** β IGH3 supports keratinocyte adhesion, migration, and proliferation through α 3 β 1-Integrin. *Biochem Biophys Res Commun* **294**:940-948
7. **Behnke J, Feige MJ, Hendershot LM. (2015)** BiP and its nucleotide exchange factor Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol* **427**(7):1589-1608
8. **Bies C, Guth S, Janoscsek K, Nastainczyk W, Volkmer J, Zimmermann R. (1999)** A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *Biol Chem* **380**:1175-1182
9. **Bies C, Blum R, Dudek J, Nastainczyk W, Oberhauser S, Jung M, Zimmermann R. (2004)** Characterization of pancreatic ERj3p, a homolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p. *Biol Chem* **385**:389-395
10. **Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. (2003)** Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:915-925
11. **Blau M, Mullapudi S, Becker T, Dudek J, Zimmermann R, Penczeck PA, Beckman R. (2005)** ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat Struct Mol Biol* **12**:1015-1016
12. **Blobel G, Dobberstein B. (1975)** Transfer of proteins across membranes. *J Cell Biol* **67**(3):852-862
13. **Bolinches-Amorós A, Mollá B, Pla-Martin D, Palau F, González-Cabo. (2014)** Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Front Cell Neurosci* **8**:124
14. **Bonetta L. (2009)** RNA-based therapeutics: ready for delivery? *Cell* **136**(4):581-584
15. **Brodsky JL, Schekman R. (1993)** A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* **123**:1355-1363
16. **Brodsky JL, Goeckeler J, Schekman R. (1995)** BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci* **92**:9643-9646

17. **Calfon M, Zheng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. (2002)** IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**:92-96
18. **Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A. (1996)** Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic triplet repeat expansion. *Science* **271**:1423-1427
19. **Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Dürr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M. (1997)** Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* **6**:1771-1780
20. **Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, Harris F, Sawyer TK, Brunton VG, Ozanne BW, Frame MC. (2006)** Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* **25**:5726-5740
21. **Cavallaro U, Christofori G. (2001)** Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of glue is not enough. *Biochem Biophys Acta* **1552**:39-45
22. **Chan KT, Bennin DA, Huttenlocher A. (2010)** Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem* **285**:11418-11426
23. **Cheetham ME, Jackson AP, Anderton BH. (1994)** Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSJ1a and HSJ1b. *Eur J Biochem* **226**:99-107
24. **Cheetham ME, Caplan AJ. (1998)** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* **3**:28-36
25. **Chung KT, Shen Y, Hendershot LM. (2002)** BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* **277**:47557-47563
26. **Clayton BL, Popko B. (2016)** Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia. *Brain Res* **S0006-8993**:30180-30189
27. **Cooperberg MR, Cowan J, Broering JM, Carroll PR. (2008)** High-risk prostate cancer in the United States, 1990-2007. *World J Urol* **26**:211-218
28. **Cooperberg MR, Vickers AJ, Broering JM, Carroll PR. (2010)** Comparative risk-adjusted mortality outcomes after primary surgery, radiotherapy, or androgen-deprivation therapy for localized prostate cancer. *Cancer* **116**:5226-5234
29. **Cox JS, Walter P. (1996)** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**:391-404
30. **Craig EA, Huang P, Aron R, Andrew A. (2006)** The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **156**:1-21
31. **Cross BC, Sinning I, Lührink J, High S. (2009)** Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:255-264
32. **Crawford ED, Petrylak D. (2010)** Castration-resistant prostate cancer: descriptive yet pejorative? *J Clin Oncol* **28**:e408

33. **Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. (2003)** Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol* **23**:7198-7209
34. **D'Antonio M, Feltri ML, Wrabetz L. (2009)** Myelin under stress. *J Neurosci Res* **87**:3241-3249
35. **Davila S, Furu L, Gharavi AG, Tian X, Onoe T, Qian Q, Li A, Cai Y, Kamath PS, King BF, Azuromendi PJ, Tahvanainen P, Kääriräinen H, Höckerstedt K, Devuyst O, Pirson Y, Martin RS, Lifton RP, Tavanainen E, Torres WE, Somlo S. (2004)** Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet* **36**:575-577
36. **Davis RL, Shrimpton AE, Holoham PD, Bradshaw D, Feiglin D, Collins GH, Sonderegger P, Kinter J, Becker LM, Lacbawan F, Krasnewich D, Muenke M, Lawrence DA, Yerby MS, Shaw CM, Gooptu B, Elliot PR, Finch JT, Carrell RW, Lomas DA. (1999)** Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nat Genet* **36**:575-577
37. **De Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, Chi KN, Jones RJ, Goodman OB Jr, Saad F, Staffurth JN, Mainwaring P, Harland S, Flaig TW, Hutson TE, Cheng T, Patterson H, Hainsworth JD, Ryan CJ, Sternberg CN, Ellard SL, Fléchon A, Saleh M, Scholz M, Efstathiou E, Zivi A, Bianchini D, Loriot Y, Chieffo N, Kheoh T, Hagg CM, Scher HI. (2011)** Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* **364**(21):1995-2005
38. **Dejgaard K, Theberge JF, Heath-Engel H, Chevet E, Tremblay ML, Thomas DY. (2010)** Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis. *J Proteome Res* **9**:1763-1771
39. **Deshaies RJ, Schekman R. (1989)** SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**:2653-2664
40. **Deshaies RJ, Schekman R. (1990)** Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum import machinery. *Mol Cell Biol* **10**:6024-6034
41. **Deshaies RJ, Sanders SS, Feldheim DA, Schekman R. (1991)** Assembly of the yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into the membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**:806-808
42. **Dickson KM, Bergeron JJ, Shames I, Colby J, Nguyen DT, Chevet E, Thomas DY, Snipes GJ. (2002)** Association of calnexin with mutant peripheral myelin protein-22 ex vivo: a basis for "gain-of-function" ER-diseases. *Proc Natl Acad Sci* **99**:9852-9857
43. **Dudek J, Greiner M, Müller A, Hendershot LM, Kopsch K, Nastainczyk W, Zimmer R. (2005)** ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* **12**:1008-1014
44. **Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, Zimmermann R. (2008)** Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* **66**:1556-1569
45. **Erdmann F, Schäuble N, Lang S, Jung M, Honigmann A, Ahmad M, Dudek J, Benedix J, Harsman A, Kopp A, Helms V, Cavalié A, Wagner R, Zimmer R. (2011)** Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **30**(1):17-31

46. **Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, Coppola D, Kruhoffer M, Aaltonen L, Orntoft TF, Quackenbush J, Yeatman TH. (2005)** Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **23**:71-83
47. **Futerman AH, van Meer G. (2004)** The cell biology of lysosomal storage disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:554-565
48. **Gao D, Bambang IF, Putti TC, Lee YK, Richardson DR, Zhang D. (2012)** ERp29 induces breast cancer cell growth arrest and survival through modulation of activation of p38 and upregulation of ER stress protein p58^{IPK}. *Lab Invest* **92**:200-213
49. **Garg M, Kanojia D, Seth A, Kumar R, Gupta A, Surolia A. (2010)** Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion. *Eur J Cancer* **46**:207-215
50. **Gerber J, Mühlhoff U, Lill R. (2003)** An interaction between frataxin and Isu1/Nsf1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. **4**:906-911
51. **Gilbert SJ, Meakin LB, Bonnet CS, Nowell MA, Ladiges WC, Morton J, Duance VC, Mason DJ. (2014)** Deletion of p58^{IPK}, the cellular inhibitor of the protein kinases PKR and PERK, causes bone changes and joint degeneration in mice. *Front Endocrinol* doi:10.3389
52. **González-Pabo P, Palau F. (2013)** Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *J Neurochem* **126**:53-64
53. **Green N, Fang H, Walter P. (1992)** Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **116**(3):597-604
54. **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. *Prostate* **71**:1074-1083
55. **Greiner M, Kreutzer B, Jung V, Grobholz R, Hasen A, Stohr R, Tornillo L, Dudek J, Stöckle M, Unteregger G, Kamradt J, Wullich B, Zimmermann R. (2011)** Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *Int J Cancer* **128**:2284-2295
56. **Guo F, Snapp EL. (2013)** ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells. *J Cell Sci* **126**:1429-1439
57. **Hageman J, Kampigna HH. (2009)** Computational analysis of the human *HSPH/HSPA/DNAJ* family and cloning of a human *HSPH/HSPA/DNAJ* expression library. *Cell Stress Chaperones* **14**:1-21
58. **Hamman BD, Hendershot LM, 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**:747-758
59. **Harding HP, Zhang Y, Ron D. (1999)** Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **379**:271-274
60. **Harsman A, Kopp A, Wagner R, Zimmermann R, Jung M. (2011)** Calmodulin regulation of the calcium-leak channel Sec61 is unique to vertebrates. *Channels* **5**(4):293-298

61. **He Q, Lee DI, Rong R, Yu M, Luo X, Klein M, El-Deiry WS, Huang Y, Hussain A, Sheikh MS. (2002)** Endoplasmatic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene* **21**:2623-2633
62. **Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S. (2008)** European Association of Urology Guidelines on Prostate Cancer. *Eur Urol* **53**:68-80
63. **Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME, Blatch GL. (2005)** Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* **14**:1697-1709
64. **High S, Laird V. (1997)** Membrane protein biosynthesis – All sewn up? *Trends Cell Biol* **7**:206-210
65. **Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L. (2009)** Six-years follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **23**:1054-1061
66. **Hoyle JC, Isfort MC, Roggenbuck J, Arnold WD. (2015)** The genetics of Charcot-Marie-Tooth disease: current trends and future implications for diagnosis and management. *Appl Clin Genet* **8**:235-243
67. **Huang JB, Kindzelskii AL, Clark AJ, Petty HR. (2004)** Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion. *Cancer Res* **64**:2482-2489
68. **Huggins C, Stephens RC, Hodges CV. (1941)** Studies on prostatic cancer: 2. The effects of castration on advanced carcinoma of prostate gland. *Arch Surg* **43**:209
69. **Janmey PA. (1994)** Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu Rev Physiol* **56**:169-191
70. **Jiang J, Maes EG, Taylor AB, Wang L, Hinck L, Hinck AP, Lafer EM, Sousa R. (2007)** Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol Cell* **28**:422-433
71. **Jin Y, Awad W, Petrova K, Hendershot LM. (2008)** Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP. *EMBO J* **27**:2873-2882
72. **Jin Y, Zhuang M, Hendershot LM. (2009)** ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues. *Biochemistry* **48**:41-49
73. **Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Stöckle M, Zimmermann R, Wullich B. (2006)** Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals *TLOC1/SEC62* as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **4**:169-176
74. **Kafri T. (2004)** Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol Biol* **246**:367-390
75. **Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M. (1999)** Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **11**:591-596
76. **Kalies K, Görlich D, Rapoport T. (1993)** Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum-mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* **126**:925-934

77. **Kampigna HH, Craig EA. (2010)** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:579-592
78. **Kimata Y, Ooboki K, Nomura-Furuwatari C, Hosoda A, Tsuru A, Kohno K. (2000)** Identification of a novel mammalian endoplasmic reticulum-resident KDEL protein using an EST database motif search. *Gene* **261**:321-327
79. **Knauer R, Lehle L. (1999)** The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochem Biophys Acta* **1426**(2):259-273
80. **Koeppen AH. (2011)** Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J Neurol Sci* **303**:1-12
81. **Koeppen AH. (2011)** The cerebellar component of Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol* **122**:323-330
82. **Korth MJ, Lyons CN, Wambach M, Katze MG. (1997)** Cloning, expression, and cellular localization of the oncogenic 58-kDa inhibitor of the RNA-activated human and mouse protein kinase. *Gene* **170**:181-188
83. **Kwong JQ, Beal MF, Manfredi G. (2006)** The role mitochondria in inherited neurodegenerative disease. *J Neurochem* **97**:1659-1675
84. **Ladiges WC, Knoblauch SE, Morton JF, Korth MH, Sopher BL, Baskin CR, MacAuley A, Goodman AG, LeBoeuf RC, Kathe MG. (2005)** Pancreatic β -cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes* **54**:1074-1081
85. **Lang S, Schäuble N, Cavalié A, Zimmermann R. (2011)** Live cell calcium imaging combined with siRNA mediated gene silencing identifies Ca^{2+} leak channels in the ER membrane and their regulatory mechanisms. *J Vis Exp* 2011 Jul 7; (**53**):e2730
86. **Lee J, Ishihara A, Oxford G, Johnson B, Jacobson K. (1999)** Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* **400**:382-386
87. **Lee TG, Tang N, Thompson S, Miller J, Katze MG. (1994)** The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of protein. *Mol Cell Biol* **14**:2331-2342
88. **Li F, Abuarab N, Sivaprasadarao A. (2016)** Reciprocal regulation of actin cytoskeleton remodelling and cell migration by Ca^{2+} and Zn^{2+} : role of TRPM2-channels. *J Cell Sci* **129**:2016-2029
89. **Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. (2001)** N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* **61**:3819-3825
90. **Limame R, Wouters A, Pauwels B, Fransen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P. (2012)** Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* **7**(10):e46536
91. **Linxweiler J, Kollipara L, Zahedi RP, Lampel P, Zimmermann R, Greiner M. (2014)** Proteomic insights into non-small cell lung cancer. New ideas for cancer diagnosis and therapy from a functional viewpoint. *EuPA Open Proteom* **4**:25-39

92. **Linxweiler M, Linxweiler J, Barth M, Benedix J, Jung V, Kim YJ, Bohle RM, Zimmermann R, Greiner M. (2012)** Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol* **180**:473-483
93. **Linxweiler M, Schorr S, Schäuble N, Jung M, Linxweiler J, Langer F, Schäfers HJ, Cavalié A, Zimmermann R, Greiner M. (2013)** Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer* **13**:574
94. **Liu CY, Wong HN, Schauerte JA, Kaufman RJ. (2002)** The protein kinase/endoribonuclease IRE1 α that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J Biol Chem* **277**:18346-18356
95. **Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N. (2010)** A point mutation in Sec61 α 1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* **59**:460-470
96. **Lu Q, Haragopal H, Slepchenko KG, Stork C, Li YV. (2016)** Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **8**:35-43
97. **Lyman SK, Schekman R. (1995)** Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **131**:1163-1171
98. **Makoto D, Susa S, Suzuki K, Kato O, Yamatani K, Sasaki H. (1997)** Identification of a human cDNA homologue to the Drosophila translocation protein 1 (Dtrp1). *Biochem Biophys Res Commun* **230**:100-104
99. **Marcus NY, Marcus RA, Schmitd BZ, Haslam DB. (2007)** Contribution of the HEDJ/ERdj3 cysteine-rich domain to substrate interactions. *Arch Biochem Biophys* **468**:147-158
100. **Matlack KES, Plath K, Misselwitz B, Rapoport T. (1996)** Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* **277**:938-941
101. **Massey S, Burress H, Taylor M, Nemec KN, Ray S, Haslam DB, Haslam KT. (2011)** Structural and Functional interactions between the cholera toxin A1 subunit and ERdj3/HEDJ, a chaperone of the endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **79**:4739-4747
102. **Maus M, Medgyesi D, Kiss E, Schreider AE, Enyedi A, Szilágyi N, Matkó J, Sármay G. (2013)** B cell receptor-induced Ca²⁺ mobilization mediates F-actin rearrangements and is indispensable for adhesion and spreading of B lymphocytes. *J Leukoc Biol* **93**:537-547
103. **Mayer MP, Bukau B. (2005)** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell mol Life Sci* **62**:670-684
104. **McConkey DJ, Orrenius S. (1997)** The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **239**:357-366
105. **Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM. (2002)** A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* **13**:4456-4469
106. **Meyer HA, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehns S, Kalies KU, Hartmann E. (2000)** Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* **275**:14550-14557

107. **Mitra K, Frank J, Driessen A. (2006)** Co- and posttranslational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work? *Struct Mol Biol* **13**:957-964
108. **Mohler JL. (2008)** A role for the androgen-receptor in clinically localized and advanced prostate cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22**:357-372
109. **Mohler JL. (2008)** Castration-recurrent prostate cancer is not androgen-independent. *Adv Exp Med Biol* **617**:223-234
110. **Mollá B, Riveiro F, Bolinches-Amorós A, Muñoz-Lasso DC, Palau F, González-Cabo P. (2016)** Two different pathogenic mechanisms, dying-back axonal neuropathy and pancreatic senescence, are present in the YG8R mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech* **9**:647-657
111. **Morral JA, Davis AN, Qian J, Gelman BB, Koeppen AH. (2010)** Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol* **61**:101-110
112. **Müller G, Zimmermann R. (1987)** Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *EMBO J* **6**(7):2099-2107
113. **Müller L, Diaz de Escauriaza M, Lajoie P, Theis M, Müller A, Burgard C, Freiner M, Snapp EL, Dudek J, Zimmermann R. (2010)** Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to human. *Mol Biol Cell* **21**:691-703
114. **Müller L, Funato Y, Miki H, Zimmermann R. (2011)** An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease. *FEBS Lett* **585**:596-600
115. **Nguyen TH, Law DT, Williams B. (1991)** Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**(4):1565-1569
116. **Ohtsuka K, Hata M. (2000)** Mammalian *HSP40/DNAJ* homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell Stress Chaperones* **5**:98-112
117. **Otero JH, Lizak B, Hendershot LM. (2010)** Life and death of a BiP substrate. *Semin Cell Dev Biol* **21**:472-478
118. **Ong DS, Mu TW, Palmer AE, Kelly JW. (2010)** Endoplasmic reticulum Ca²⁺ increases enhance glucocerebrosidase proteostasis. *Nat Chem Biol* **6**:424-432
119. **Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, Harding HP, Goodman AG, Harant H, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Ron D. (2006)** Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* **126**:727-739
120. **Palade G. (1975)** Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**:347-358
121. **Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA. (1995)** Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**:561-570

122. **Patham B, Duffy J, Lane A, Davis RC, Wipf P, Fewell SW, Brodsky JL, Mensa-Wilmot K. (2009)** Post-translational import into the endoplasmatic reticulum of a trypanosome: an in vitro system for discovery of anti-trypanosomal chemical entities. *Biochem J* **419**:507-517
123. **Pellecchia M, Szyperski T, Wall D, Georgopoulos C, Wuthrich K. (1996)** NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rech region of the *Escherichia coli* DnaJ chaperone. *J Mol Biol* **260**:236-250
124. **Pelled D, Trajkovic-Bodennec S, Lloyd-Evans E, Sidransky E, Schiffmann R, Futerman AH.** Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiol Dis* **18**:83-88
125. **Pennuto M, Tinelli E, Malaguti M, Del Carro U, D'Antonio M, Ron D, Quattrini A, Feltri ML, Wrabetz L. (2008)** Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron* **57**:393-405
126. **Petersen S, Aninat-Meyer M, Schlüns K, Gellert K, Dietel M, Petersen I. (2000)** Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *British J Cancer* **82**:65-73
127. **Petrova K, Oyadomari S, Hendershot LM, Ron D. (2008)** Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3. *EMBO J* **27**:2862-2872
128. **Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. (1993)** The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* **3**:191-197
129. **Pollard TD, Borisy GG. (2003)** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**:453-465
130. **Potter GA, Barrie SE, Jarman M, Rowlands MG. (1995)** Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P450 17 alpha (17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer. *J Med Chem* **38**:2463-2471
131. **Qian YQ, Patel D, Hartl FU, McDoll DJ. (1996)** Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J Mol Biol* **260**:224-235
132. **Rapiejko PJ, Gilmore R. (1997)** Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**:703-13
133. **Rapoport T, Jungnickel B, Kutay U. (1996)** Protein Transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem* **65**:271-303
134. **Rapoport T, Matlack K, Plath K, Misselwitz B, Staack O. (1998)** Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **274**:20110-20115
135. **Rapoport TA. (2008)** Protein transport across the endoplasmatic reticulum membrane. *FEBS J* **275**:4471-4478
136. **Ribeiro FR, Henrique R, Martins AT, Jeronimo C, Teixeira MR. (2007)** Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients. *Eur Urol* **52**:116-24
137. **Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. (2003)** Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**:1704-1709

138. **Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, Schubert M, Michael L, Zhang CY, Ueki K, Michael MD 2nd, Lowell BB, Kahn CR. (2000)** Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:12239-12243
139. **Rothblatt JA, Deshaies RJ, Sanders SL, Daum G, Schekman R. (1989)** Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* **109**(6):2641-2652
140. **Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M, Dobberstein B. (1989)** Homology of 54K protein of signal-recognition particle, docking protein and two E. coli proteins with putative GTP-binding domains. *Nature* **340**:478-82
141. **Rowley JD. (1973)** Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**(5405):290-3
142. **Rusmini P, Crippa V, Cristofani R, Rinaldi C, Cicardi ME, Galbiati M, Carra S, Malik B, Greensmith L, Poletti A. (2016)** The Role of the Protein Control System in SBMA. *J Mol Neurosci* **58**:348-364
143. **Russo M, Laura M, Polke JM, Davis MB, Blake J, Bradner S. (2011)** Variable phenotypes associated with PMP22 missense mutations. *J Med Genetic* **39**:e81
144. **Rutkowski DT, Kang SW, Goodman AG, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Kaufman RJ, Hedge RS. (2007)** The role of p58^{IPK} in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **18**:3681-3691
145. **Sanders SL, Schekman R. (1992)** Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **267**:13791-13794
146. **Satelli A, Li S. (2011)** Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **68**:3033-3046
147. **Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, Linxweiler J, Dudek J, Blum R, Helms V, Pato AW, Paton JC, Cavalié A, Zimmermann R. (2012)** BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J* **31**(15):3282-3296
148. **Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin, ME, Efstathiou E, Rathkopf D, Shelkey J, Yu EY, Alumkal J, Hung D, Hirmand M, Seely L, Morris MJ, Danila DC, Humm J, Larson S, Fleisher M, Sawyers CL. (2010)** Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet* **375**(9724):1437-46
149. **Schorr S, Klein MC, Gamayun I, Melnyk A, Jung M, Schäuble N, Wang Q, Hemmis B, Bochen F, Greiner M, Lampel P, Urban SK, Hassdenteufel S, Dudek J, Chen XZ, Wagner R, Cavalié A, Zimmermann R. (2015)** Co-chaperone specificity in gating of the polypeptide conducting channel in the membrane of the human endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **290**:18621-18635
150. **Schröder M, Kaufmann RJ. (2005)** The mammalian unfolded protein response. *Ann Rev Biochem* **74**:739-789
151. **Schwab A, Finsterwalder F, Kersting U, Danker T, Oberleithner H. (1997)** Intracellular Ca²⁺ distribution in migrating transformed epithelial cells. *Pflügers Arch* **434**:70-76

152. **Scorrano L, Oakes SA, Opfermann JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. (2003)** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis. *Science* **300**:135-139
153. **Seyle H. (1985)** The nature of stress. *Basal facts* **7**:3-11
154. **Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002)** ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* **3**:99-111
155. **Shen Q, Rigor RR, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY. (2010)** Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res* **87**:272-280
156. **Shen WW. (1999)** A history of antipsychotic drug development. *Compr Psychiatry* **40**(6):407-414
157. **Shen Y, Hendershot LM. (2005)** ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell* **16**:40-50
158. **Sjaastad MD, Nelson WJ. (1997)** Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays* **19**:47-55
159. **Skre H. (1974)** Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* **6**:98-118
160. **Stork CJ, Li YV. (2010)** Zinc release from thapsigargin/IP₃-sensitive stores in cultured cortical neurons. *J Mol Signal* **5**:5
161. **Suh WC, Burkholder WF, Lu CZ, Zhao X, Gottesman ME, Gross CA. (1998)** Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:15223-15228
162. **Suh WC, Luh CZ, Gross CA. (1999)** Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J Biol Chem* **274**:30534-30539
163. **Svitkina TM, Borisy GG. (1999)** Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* **145**:1009-1026
164. **Swain JF, Dinler G, Sivendran R, Montgomery DL, Stotz M, Gierasch LM. (2007)** Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol Cell* **26**:27-39
165. **Synofzik M, Haack TB, Kopajtich R, Gorza M, Rapaport D, Greiner M, Schönfeld C, Freiberg C, Schorr S, Holl RW, Gonzales MA, Fritsche A, Fallier-Becker P, Zimmermann R, Strom TM, Meitinger T, Züchner S, Schüle R, Schöls L, Prokisch H. (2014)** Absence of BiP Co-Chaperone DNAJC3 causes diabetes mellitus and multisystemic neurodegeneration. *Am J Hum Genet* **95**:689-697
166. **Szabo A, Langer T, Schroder H, Flanagan J, Bukau B, Hartl FU. (1994)** The ATP hydrolysis-dependant reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ and GrpE. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:10345-10349.

167. **Tan YL, Genereux JC, Pankow S, Aerts JMFG, Yates JR III, Kelly JW. (2014)** ERdj3 is an Endoplasmic Reticulum Degradation Factor for Mutant Glucocerebrosidase Variants Linked to Gaucher's Disease. *Chem Biol* **21**:967-976
168. **Tatsuta T, Langer T. (2008)** Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* **27**:306-314
169. **Theocharopoulou G, Vlamos P. (2014)** Modeling protein misfolding in charcot-marie-tooth disease. *Adv Exp Med Biol* **820**:91-102
170. **Thompson IM, Carroll PR, Carducci MA. (2006)** Recommendations for defining and treating high risk localized prostate cancer. *J Urol* **176**:S6-10
171. **Tombal B, Weeraratna AT, Denmeade SR, Isaacs JT. (2000)** Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependant apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. *Prostate* **43**:303-317
172. **Tombal B, Gillis JM, Isaacs JT. (2002)** A supramicromolar elevation of intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) is consistently required to induce the execution phase of apoptosis. *Cell Death Differ* **9**:561-573
173. **Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015)** Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**(2):87-108
174. **Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissmann JS, Walter P. (2000)** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**:249-258
175. **Tyedmers L, Lerner M, Bies C, Dudek J, Sworonek MH, Haas IG, Heim N, Nastainczyk W, Volker J, Zimmermann R. (2000)** Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:7214-7219
176. **Tyedmers J, Lerner M, Wiedmann M, Volkmer J, Zimmermann R. (2003)** Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *Embo rep* **4**:505-510
177. **van Huizen R, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ. (2003)** p58^{IPK}, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 α signaling. *J Biol Chem* **278**:15558-15564
178. **Vankan P. (2013)** Prevalence gradients of Friedreich's ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J Neurochem* **126**:11-20
179. **Von Heijne G. (1985)** Ribosome-SRP-signal sequence interactions. The relay helix hypothesis. *FEBS Lett* **190**:1-5
180. **Von Heijne G, Nilsson IM, Whitley P. (1996)** A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum complex as an extended chain. *J Biol Chem* **271**:6241-44
181. **Walkup GK, Burdette SC, Lippard SJ, Tsien RY. (2000)** A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for Zn²⁺. *J Am Chem Soc* **122**:5644-5645

182. **Walter P, Blobel G. (1980)** Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:7112-7116
183. **Walter P, Blobel G, Ibrahimi I. (1981)** Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **91**:551-6
184. **Weitzmann A Volkmer J, 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 L* **580**:5237-5240
185. **Wiech H, Stuart R, Zimmermann R. (1990)** Role of cytosolic factors in the transport of proteins across membranes. *Semin Cell Biol* **1**(1):55-63
186. **Wirth A, Jung M, Bies C, Frien M, Tyedmers J, Zimmermann R, Wagner R. (2003)** The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol Cell* **12**:261-268
187. **Wittke S, Dünwald M, Johnsson N. (2000)** Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell* **11**:3859-3871
188. **Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG. (2002)** Control of PERK eIF2 α kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone p58^{IPK}. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15920-15925
189. **Yoon T, Cowan JA. (2004)** Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* **279**:25943-25946
190. **Yu M, Haslam RH, Haslam DB. (2000)** HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J Biol Chem* **275**:24984-24992
191. **Yu M, Haslam DB. (2005)** Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun* **73**:2524-2532
192. **Yu Z, Cai C, Gao S, Simon NI, Shen HC, Balk SP. (2014)** Galeterone prevents androgen receptor binding to chromatin and enhances degradation of mutant androgen receptor. *Clin Cancer Res* **20**:4075-4085
193. **Zahedi RP, Volzing C, Schmitt A, Frien M, Jung M, Dudek J, Wortelkamp S, Sickmann A, Zimmermann R. (2009)** Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics* **9**:3463-3473
194. **Zhang HM, Ye X, Su Y, Yuan J, Liu Z, Stein DA, Yang D. (2010)** *J Virol* **84**:8446-8459
195. **Zhang QH, Sheng HP, Loh TT. (2001)** Bcl-2 protects HL-60 cells from apoptosis by stabilizing their intracellular calcium pools. *Life Sciences* **68**:2873-2883
196. **Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, Lee JW, Ackermann SL. (2005)** Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Genet* **37**:974-979
197. **Zhao Y, El-Gabry M, Hei TK. (2006)** Loss of β IGH3 protein is frequent in primary lung carcinoma and related to tumorigenic phenotype in lung cancer cells. *Mol Carcinog* **45**:84-92
198. **Zhang L, Hu X, Chen J, Fu G. (2015)** Impact of E6-associated protein on the proliferation and invasion of prostate cancer cells in bone metastasis. *Int J Clin Exp Pathol* **8**:6571-6575

199. **Zheng T, Nicchitta CV. (1999)** Structural determinants for signal sequence function in the mammalian endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**:36623-30
200. **Zimmermann R, Sagstetter M, Lewis MJ, Pelham HR. (1988)** Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J* **7**(9):2875-2880
201. **Zimmermann R, Müller L, Wullich B. (2006)** Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends Mol Med* **12**:567-573
202. **Zimmermann R, Blatch GL. (2009)** A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends Parasitol* **25**:147-150

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADP	Adenosindiphosphat
AMPS	Ammoniumperoxidisulfat
AR	Androgenrezeptor
ATF6	activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	Bisacrylamid
BAP	BiP-associated protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcr	breakpoint cluster region
BD	Becton Dickinson
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
C-Terminus	Carboxylterminus
ca.	zirca
CaM	Calmodulin
cDNA	complementary DNA (aus mRNA revers transkribierte DNA)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
CHOP	C/EBP homologous protein
Cis	Carcinoma in situ
CML	chronisch myeloische Leukämie
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EP58	endoplasmic reticulum protein 58
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Degradation
F-AX	Fibroblasten-Ataxie
F-CO	Fibroblasten-Kontrolle
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-in-situ Hybridisierung
GDP	Guanosindiphosphat
GE	General Electrics
GFP	green fluorescent protein
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
Grp	glucose regulated protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK293	human embryonic kidney 293 (Zelllinie)

Abkürzungsverzeichnis

HeLa	Henrietta Lacks (Zelllinie: humanes Zervixkarzinom)
Hsp	heat-shock protein
i.d.R.	in der Regel
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IRE1	iron responsive element 1
IRES	internal ribosomal binding site
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>K-RAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LLC	Lewis lung carcinoma
LNCaP	lymphnode cancer of the prostate
mCRCP	metastasierte kastrationsresistente Prostatakarzinome
mRNA	messenger RNA
MSS	Marinesco-Sjögren-Syndrom
MW	Mittelwert
<i>MYC</i>	Myelozytomatose-Onkogen
N-Terminus	Aminoterminus
NC	nascent chain
NEF	nucleotide exchange factor
NEJM	New England Journal of Medicine
o.g.	oben genannt
PAK	Primärantikörper
PBS	phosphate buffered saline
PCa	Prostatakarzinom
PCLD	polyzystische Lebererkrankung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERK	PKR-like kinase
PSA	prostataspezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RISC	RNA-induzierter Stilllegungskomplex
RKI	Robert-Koch-Institut
RM	raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	ribosome-nascent-chain complex
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
SAK	Sekundärantikörper
SCC	squamous cell carcinoma
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis
SERCA	sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SILAC	stable isotope labeling for amino acids in cell culture
siRNA	small interfering RNA
sog.	Sogenannt
SP	Signalpeptidase
SR	SRP-Rezeptor
SREBP1	sterol regulatory element-binding protein 1
SRP	signal recognition particle
STD	Standardabweichung
TEMED	Tetraethylmethyldiamid
TFP	Trifluoperazin
TG	Thapsigargin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
<i>TLOC1</i>	human translocation protein 1 (Synonym: <i>SEC62</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminosäuren
tRNA	transport RNA
Tun	Tunicamycin
u.a.	unter anderem
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
UPR	unfolded protein response
UTR	untranslatierte Region
v.a.	vor allem
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

Ein- bzw. Dreibuchstabencode für Aminosäuren (nach IUPAC):

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D (Asp)	Aspartat
E (Glu)	Glutamin
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	nicht identifizierte Aminosäure

Einbuchstabencode für Nucleobasen (nach IUBMB):

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

Einheiten (nach SI):

Länge	Meter (m)
Masse	Kilogramm (kg)
Zeit	Sekunde (s)
Stromstärke	Ampere (A)
thermodynamische Temperatur	Kelvin (K)
Stoffmenge	Mol (mol)
Lichtstärke	Candela (cd)

DANKSAGUNG

Sehr gerne möchte ich die Möglichkeit zum Bedanken bei allen nutzen, die zum Gelingen meiner Promotionsbestrebungen beigetragen haben. Allen voran danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Richard Zimmermann und meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Markus Greiner für ihre schier unermessliche Geduld, die mir selbst mehr als einmal abhanden ging. Gerade in kritischen Phasen fand ich stets Gehör und eine schnelle Antwort, was im Bereich der medizinischen Promotionen alles andere als eine Selbstverständlichkeit ist.

Im Allgemeinen gilt mein Dank allen Mitarbeitern der AG Zimmermann, die mich in einer familiären Atmosphäre mit viel freundschaftlicher Wärme in ihrer Mitte aufnahmen. Immer war es möglich Fragen zu stellen, zu diskutieren, um Hilfe zu bitten und auch nach getaner Arbeit Zeit miteinander zu verbringen. Hierzu zählen auch Maximilian und Johannes Linxweiler, die sich trotz maximaler Einspannung in klinischer Arbeit und Forschung immer Zeit nahmen meine Anliegen zu beantworten. Gerade das Erlernen grundlegender Techniken der Laborarbeit und statistischen Auswertung, die mir ein lebenslang nutzen werden, habe ich der Zusammenarbeit und Zeitinvestition aller genannten Personen zu verdanken.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Ludger Schöls (Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für neurodegenerative Erkrankungen) und Dr. rer. nat. Holger Prokisch (Helmholtz Zentrum München, Institut für Humangenetik) für die Möglichkeit der Erforschung des überaus interessanten ERJ6-Mangels.

Ganz besonders möchte ich mich meiner Familie, meinen Freunden und Bekannten widmen. Ihr habt meine vielfach schlechte Laune ertragen, mich aufgemuntert und mir den ein oder anderen Tritt verpasst, der meiner Motivation sicherlich nicht geschadet hat. Vor allem meinen Eltern danke ich dafür, dass sie selbstlos ihre Heimat und ihr Hab und Gut verließen, um meinen Geschwistern und mir eine Zukunft zu bieten, die die zerfallende Sowjetunion für uns nicht bereitgehalten hätte.

Ähnlich dankbar bin ich den herausragenden Ärzten, die meine klinische Ausbildung inspiriert und begleitet haben und von denen ich gelernt habe, dass die Medizin dem Patienten dienen sollte und nicht umgekehrt. Insbesondere mein Hausarzt Dr. med. Wolfgang Schroeter hat mich von frühester Kindheit an in dieser Hinsicht beeinflusst und so zu meinem Werdegang beigetragen.

Artikel in Medline-gelisteten Fachzeitschriften:

Johannes Linxweiler, Laxmikanth Kollipara, René P. Zahedi, **Pavel Lampel**, Richard Zimmermann, Markus Greiner. (2014) *Proteomic insights into non-small cell lung cancer: New ideas for cancer diagnosis and therapy from a functional viewpoint* EUPA Open Proteom 4:25-39

Stefan Schorr, Marie-Christine Klein, Igor Gamayun, Armin Melnyk, Martin Jung, Nico Schäuble, Qian Wang, Birgit Hemmis, Florian Bochen, Markus Greiner, **Pavel Lampel**, Sabine Katharina Urban, Sarah Hassdenteufel, Johanna Dudek, Xing-Zhen Chen, Richard Wagner, Adolfo Cavalié and Richard Zimmermann. (2015) *Co-Chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum*. J Biol Chem 290:18621-18635