

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

# **Funktionelle Charakterisierung des humanen Translokon-assoziierten Protein Komplexes**

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

2019

vorgelegt von: Regine Stutz  
geb. am: 12.09.1989 in Dudweiler

*Für meine Familie*

„Die Zeit verwandelt uns nicht, sie entfaltet uns nur.“

*(Max Frisch)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das endoplasmatische Retikulum (ER) .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Signalsequenzen .....	3
1.2.2. SRP-abhängiger Proteintransportweg .....	5
1.2.3. SRP-unabhängige Proteintransportwege .....	7
<b>1.3. Komponenten der Proteintranslokase .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Der Sec61-Komplex .....	10
1.3.2. Der Translokon-assoziierte Protein (TRAP) Komplex .....	12
1.3.3. Der Oligosaccharyltransferase (OST) Komplex .....	15
1.3.4. Der Signalpeptidase-Komplex .....	17
1.3.5. Chaperone und Co-Chaperone .....	17
1.3.5.1. Das Hsp70-Chaperon BiP und der ATPase Zyklus .....	18
1.3.5.2. Calreticulin und Calnexin .....	22
<b>1.4. Calcium Homöostase im ER .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. Qualitätskontrolle im ER .....</b>	<b>24</b>
1.5.1. Die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) .....	24
1.5.2. Die „unfolded protein response“ (UPR) .....	25
<b>1.6. Congenitale Glykosylierungskrankheiten .....</b>	<b>26</b>
<b>1.7. Biogenese von ER-Membranproteinen .....</b>	<b>28</b>
<b>1.8. Ziele der Arbeit .....</b>	<b>30</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>



<b>2.1.</b>	<b>Material .....</b>	<b>32</b>
2.1.1.	Geräte .....	32
2.1.2.	Chemikalien .....	34
2.1.3.	Enzyme .....	35
2.1.4.	Antikörper.....	36
2.1.4.1.	Primäre Antikörper.....	36
2.1.4.2.	Sekundäre Antikörper.....	38
2.1.5.	Oligonukleotide .....	38
2.1.5.1.	DNA Oligonukleotide (Primer) .....	38
2.1.5.2.	RNA Oligonukleotide (siRNA) .....	41
2.1.6.	Plasmide .....	41
2.1.7.	Raue Mikrosomen.....	43
2.1.8.	Bakterienstämme.....	43
2.1.9.	Zelllinien.....	43
<b>2.2.</b>	<b>Biochemische Analysemethoden .....</b>	<b>44</b>
2.2.1.	SDS Page .....	44
2.2.2.	Western Blot .....	46
2.2.2.1.	Tank-Blot-Verfahren .....	46
2.2.2.2.	<i>Semidry</i> -Blot .....	47
2.2.3.	Immunologische Detektion von Proteinen .....	48
2.2.4.	Densitometrie.....	49
<b>2.3.</b>	<b>Molekularbiologische Analysemethoden.....</b>	<b>49</b>
2.3.1.	Strategien zur Klonierung von Plasmiden.....	49
2.3.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	50
2.3.2.1.	Amplifikation von Plasmid-DNA.....	51
2.3.2.2.	Gerichtete in vitro Mutagenese von Plasmid-DNA .....	53
2.3.2.3.	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) .....	57
2.3.3.	Restriktionsanalyse von Nukleinsäuren .....	58

2.3.4.	Agarosegelelektrophorese .....	60
2.3.5.	DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Fällung .....	61
2.3.6.	Ligation von fragmentierter DNA .....	62
2.3.7.	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	63
2.3.8.	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA.....	64
2.3.9.	Kultivierung von <i>E. coli</i> Zellen .....	64
2.3.10.	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> Zellen.....	65
2.3.10.1.	DNA-Minipräparation .....	65
2.3.10.2.	DNA-Midipräparation .....	66
2.3.11.	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	66
2.3.12.	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	67
<b>2.4.</b>	<b>Zellkulturmethoden .....</b>	<b>68</b>
2.4.1.	Kultivierung von Säugerzellen .....	68
2.4.2.	Zellernte und Zellzählung .....	69
2.4.3.	Kryokonservierung von Säugerzellen .....	70
2.4.4.	Zellmanipulation.....	71
2.4.4.1.	Zellmanipulation mittels siRNA.....	71
2.4.4.2.	Zellmanipulation mittels Toxin .....	73
2.4.4.3.	Zellmanipulation mittels Plasmid-DNA.....	74
2.4.5.	Präparation des geernteten Zelllysats.....	75
2.4.6.	Untersuchung des Transports von Polypeptiden in intakten Zellen .....	76
2.4.6.1.	Inhibition des Proteasoms mittels MG132 .....	77
2.4.6.2.	Identifizierung von Prozessierungsstufen plasmidkodierter Polypeptide .....	78
2.4.6.3.	Quantitative Beurteilung der Prozessierungsstufen eines Modellsubstrats .....	79
<b>2.5.</b>	<b>Analyse der substratspezifischen Eigenschaften von BiP mittels HeLa Flp- In System.....</b>	<b>80</b>
2.5.1.	Gentechnische Herstellung stabiler HeLa-Flp-In-Zelllinien .....	80
2.5.2.	Charakteristika der BiP-Mutanten .....	82

2.5.3.	Generierung stabiler HeLa Flp-In Zellen manipuliert mit BiP-Mutanten.....	84
<b>2.6.</b>	<b>Massenspektrometrische Analyse.....</b>	<b>87</b>
<b>2.7.</b>	<b>Bioinformatische Auswertung &amp; Proteinmengenbestimmung.....</b>	<b>89</b>
<b>2.8.</b>	<b>Statistische Auswertemethoden.....</b>	<b>90</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>91</b>
<b>3.1.</b>	<b>Strategie zur Bestimmung des Substratspektrums von des TRAP-Komplexes in intakten HeLa Zellen.....</b>	<b>92</b>
3.1.1.	Proof of concept: Identifizierung von Sec61-Substraten und kompensatorischer Mechanismen nach siRNA vermittelter Depletion von <i>SEC61A1</i> .....	96
3.1.2.	Identifizierung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> .....	100
<b>3.2.</b>	<b>Validierung der Ergebnisse der Proteomanalyse.....</b>	<b>108</b>
3.2.1.	Der TRAP Komplex wird nach Depletion der beta-Untereinheit degradiert.....	109
3.2.2.	Validierung potentieller TRAP-Substrate.....	116
3.2.2.1.	Der Gehalt von PPIC, TMED5 und ACP2 ist nach Depletion von <i>TRAPB</i> vermindert.....	116
3.2.2.2.	Der Gehalt der OST-Komplex Untereinheiten Ost48, Stt3b und Dad1 ist nach der Depletion von <i>TRAPB</i> vermindert.....	124
3.2.2.3.	Der Gehalt von Calreticulin, Sil1 und Sel1 ist nach Depletion von <i>TRAPB</i> vermindert.....	130
3.2.2.4.	Der Gehalt von EPDR1 ist nach Depletion von <i>TRAPB</i> vermindert.....	136
3.2.3.	Validierung potentiell kompensatorischer Mechanismen aufgrund der Depletion des TRAP Komplexes.....	138
3.2.4.	Validierung unbeeinflusster Proteine nach <i>TRAPB</i> Depletion.....	144
<b>3.3.</b>	<b>Charakteristika der TRAP-Substrate.....</b>	<b>150</b>
<b>3.4.</b>	<b>Evaluierung der TRAP Substrate sowie deren Charakteristika in Fibroblasten von CDG-Patienten.....</b>	<b>153</b>
3.4.1.	Datenvergleich der Proteomanalyse von chronisch TRAP-defizienten CDG-Patientenfibroblasten mit transient TRAP-depletierten HeLa-Zellen.....	153

3.4.2.	Validierung der TRAP-Substrate in CDG-Fibroblasten .....	157
<b>3.5.</b>	<b>Übersicht weiterer Ergebnisse der Proteomanalysen ohne zusätzliche Validierungsexperimente .....</b>	<b>175</b>
<b>3.6.</b>	<b>Validierung der Eigenschaften identifizierter TRAP-Substrate .....</b>	<b>178</b>
3.6.1.	Die Paraloge PPIB und PPIC .....	178
3.6.1.1.	Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften von PPIB und PPIC .....	178
3.6.1.2.	Charakterisierung einzelner Prozessierungsstufen nach Expression plasmid-kodierter Modellsysteme .....	180
3.6.1.3.	Analyse der Translokation der plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufer PPIB und PPIC nach Depletion von Translokasekomponenten .....	181
3.6.2.	Untersuchung weiterer TRAP-Substrate .....	184
3.6.2.1.	Charakterisierung der weiteren Modell-Polypeptidvorläufer .....	184
3.6.2.2.	Analyse der Translokation plasmidgetriebener Modell-Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten .....	187
3.6.3.	Validierung der TRAP-Substrat Eigenschaften .....	189
<b>3.7.</b>	<b>Einfluss des TRAP-Komplexes auf die Biogenese von Membranproteinen .....</b>	<b>196</b>
<b>3.8.</b>	<b>Untersuchung des Substratspektrums von BiP .....</b>	<b>202</b>
3.8.1.	Identifizierung potentieller BiP-Substrate .....	202
3.8.2.	Charakterisierung und Validierung identifizierter BiP-Substrate und Untersuchung auf TRAP-Abhängigkeit .....	205
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>211</b>
<b>4.1.</b>	<b>Charakterisierung des TRAP-Substratspektrums .....</b>	<b>211</b>
4.1.1.	Der TRAP-Komplex ist an der Translokation bestimmter Polypeptide in das ER-Lumen beteiligt .....	211
4.1.2.	Konzept und Machbarkeitsstudie als Grundlage zur Identifizierung der TRAP-Substratspektrums .....	212
4.1.3.	Identifizierung von TRAP-Substraten nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> .....	214
4.1.4.	Validierung der TRAP-Substrate .....	217

4.1.5.	Vergleich der TRAP-Substratspektren transient TRAP-depletierter HeLa-Zellen und chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten.....	219
<b>4.2.</b>	<b>TRAP-Substrate weisen bestimmte Eigenschaften auf.....</b>	<b>220</b>
<b>4.3.</b>	<b>Validierung der TRAP-Substrateigenschaften .....</b>	<b>221</b>
<b>4.4.</b>	<b>Der TRAP-Komplex und BiP weisen korrespondierende Funktionen bei der Translokation von Proteinen in das ER auf .....</b>	<b>226</b>
<b>4.5.</b>	<b>Potentielle Kompensationsmechanismen nach Degradation des TRAP-Komplexes .....</b>	<b>227</b>
<b>4.6.</b>	<b>Der TRAP-Komplex erfüllt keine direkte Rolle an der N-Glykosylierung .....</b>	<b>229</b>
<b>4.7.</b>	<b>Einfluss des TRAP-Komplexes auf die Biogenese von Membranproteinen .....</b>	<b>230</b>
<b>4.8.</b>	<b>Beteiligung des TRAP-Komplexes am ERAD-Prozess.....</b>	<b>231</b>
<b>4.9.</b>	<b>Hypothese zur Funktionsweise des TRAP-Komplexes .....</b>	<b>232</b>
<b>4.10.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>236</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>XV</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIX</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>XX</b>
	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>XXXIII</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>XXXIV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Acrylamid
ACP2	„Lysosomal acid phosphatase“
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATF6	„Activating transcription factor 6“
ATP	Adenosintriphosphat
Bag6	„Large prolin-rich protein Bag6“
BiP	„immunoglobulin heavy chain binding protein“
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CALR	Calreticulin
CaM	Calmodulin-1
CAML	„calcium signal-modulating cyclophilin ligand“
CDG	„congenital disorder of glycosylation“
cDNA	„complementary“ DNA
CET	„cryo electron tomography“
CHOP	„CCAAT/enhancer-binding homologous protein“
CMV	Cytomegalie-Virus
ct	„threshold cycle“
CZE	„capillary zone electrophoresis“
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Dad1	„Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit DAD1“
DC2	Oligosaccaryltransferase complex subunit C“
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

eIF2 $\alpha$	„eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ “
EM	Elektronenmikroskopie
EPDR1	„Mammalian ependymin-related protein 1“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER assoziierte Protein-Degradation
ERj	„ER-associated dnaJ protein“
ESI	Elektrospray Ionisation
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
Fc	„crystallisable fragment“
FCS	„fetal calve serum“
FKBP14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
FRT	„Flp Recombinase Target“
G	Guanidin
GET	„guided entry of tail-anchor proteins“
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GlcNac	N-Acetylglucosamin
glyk	glykosyliert
GnHCl	Guanidinhydrochlorid
GO	Gene Ontology
GOI	„Gene Of Interest“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grp170	„170 kDa glucose-regulated protein“
Grp94	„94 kDa glucose-regulated protein“
GTE	Glucose/Tris/EDTA
HCD	„Higher energy Collisional Dissociation“
HLTF	„helicase like transcription factor“
Hsp	Hitzeschockprotein
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
IRE1	„Inositol-requiring enzyme 1“
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KOAc	Kaliumacetat
LB	„lysogeny broth“
LFQ	“Label-Free Quantification”
LLO	„dolichol-linked oligosaccharid“
LLS	“Local Least Squares”

<i>M. jannaschii</i>	Methanocaldococcus jannaschii
MG132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal-Z-Leu-Leu-Leu-al
MID1	E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(chlorid)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPI	Phosphomannose Isomerase
mRNA	„messenger“ RNA
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NEF	„Nucleotide Exchange Factor“
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
Orai1	„calcium release-activated calcium channel protein 1“
OST	Oligosaccharyltransferase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PERK	„PKR-like endoplasmic reticulum kinase“
<i>Pfu</i>	Pyrococcus furiosus
PLAC	Proteaseinhibitormix (Pepstatin A, Leupeptin, Antipain, Chymostatin)
PMM2	Phosphomannomutase 2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PPIase	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
PIIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
PPIC	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	„quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“
R	„ratio“
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
RISC	„RNA-Induced Silencing Complex“
RM	Raue Mikrosomen



RNA	„ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RNaseA	Ribonuklease A
RNaseT2	Ribonuclease T2
RNC	„ribosome-nascent chain complex“
rpm	„rotations per minute“
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAS	„signal anchor sequence“
SBD	Substrat-Bindedomäne
SDB-RPS	„Styrenedivinylbenzene – Reversed Phase Sulfonate“
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sel1	Protein Sel-1 Homolog 1
SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
Sil1	„Nucleotide exchange factor SIL1“
siRNA	„small interfering“ RNA
SND	„SRP independent“
SOB	„Super Optimal Broth“
SOCE	„store-operated Ca <sup>2+</sup> entry“
SP	Signalpeptid
SPA	„single particle analysis“
SPase	Signalpeptidase-Komplex
SR	SRP-Rezeptor
SRP	„signal recognition particle“
SSR	„signal sequence receptor“
Stim1	„stromal interaction molecule 1“
Stt3b	„Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit Stt3b“
SubA <sub>A273B</sub>	Inaktiviertes Subtilase AB Toxin
SubAB	Subtilase AB Toxin
SUMF1	„Sulfatase-modifying factor 1“
T	Triton-X-100
TA	„tail-anchor“
TAE	Tris-Acetat
TB	„Terrific Broth“
TBS	„Tris Buffered Saline“
TBS-T	„Tris Buffered Saline“ + Triton-X-100
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin

TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMED5	„Transmembrane emp24 domain-containing protein 5“
TRAM	„translocating chain-associating membrane“
TRAP	„Translocon associated protein“
TRC40	„tail-anchor receptor complex“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUSC3	„tumor suppressor candidate 3“
UDP	Uridindiphosphat
UdS	Universität des Saarlandes
UPR	„Unfolded protein response“
UTR	„untranslated region“
UV	Ultraviolett
UV/Vis	„ultraviolet and visible“
v/v	„volume/volume“
w/v	„weight/volume“
WRB	„tail-anchored protein insertion receptor WRB“
WT	Wildtyp
XBP1	„X-box binding protein 1“

**Ein-(Drei)-Buchstabencode der Aminosäuren**

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

**Maße und Einheiten**

°C	Grad Celsius	m	Meter
A	Ampere	M	Molarität (mol/L)
Da	Dalton	min	Minute
g	Gramm	mol	Mol
h	Stunde	s	Sekunde
L	Liter	V	Volt

**Präfixe**

k	Kilo	$10^3$	n	Nano	$10^{-9}$
c	Centi	$10^{-2}$	p	Piko	$10^{-12}$
m	Milli	$10^{-3}$	f	Femto	$10^{-15}$
$\mu$	Mikro	$10^{-6}$			

## Zusammenfassung

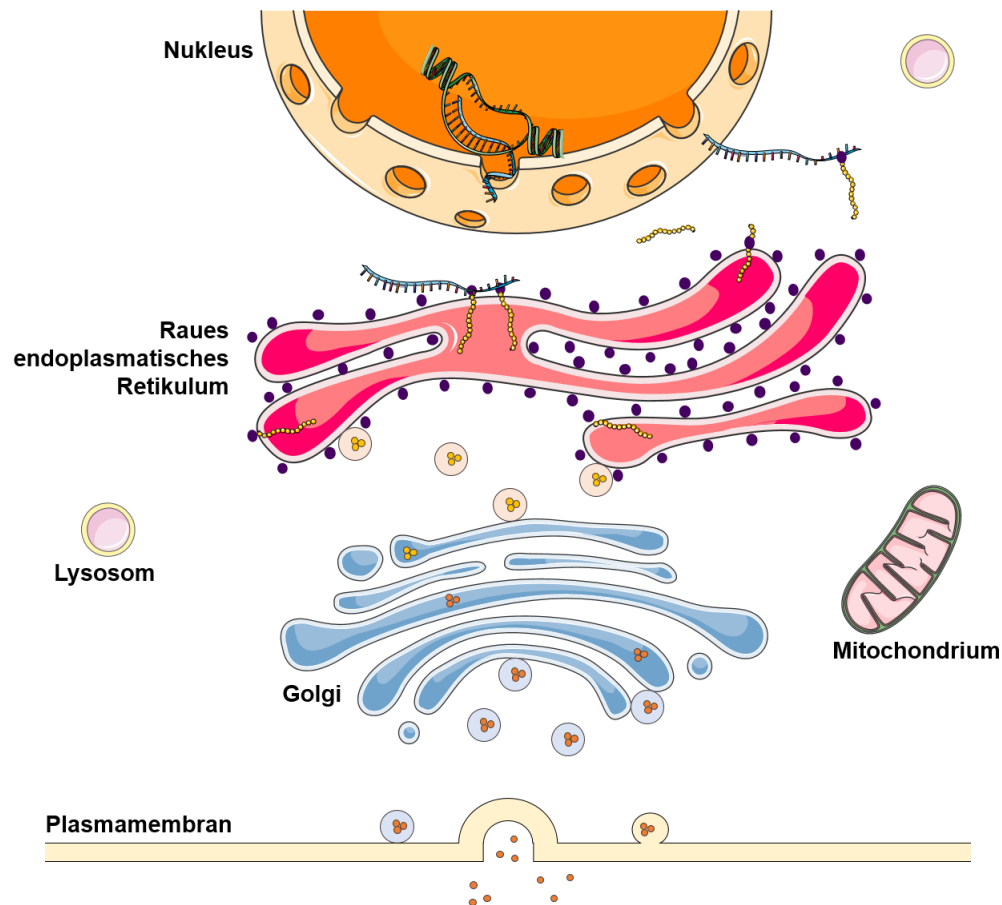
Das humane Proteom umfasst zu etwa einem Drittel solche Proteine, welche über den sekretorischen Weg prozessiert und modifiziert werden, bevor sie anschließend an ihren Funktionsort gelangen. Der Transport der synthetisierten Polypeptide wird über den heterotrimeren Sec61-Komplex vermittelt. Je nach Eigenschaften der Substrate sind dabei akzessorische Komponenten nötig, die den Import unterstützen. Eine dieser Komponenten ist der Translokation-assoziierte Protein (TRAP) Komplex, dessen Struktur jüngst mittels Cryo-Elektronentomografie (CET) näher charakterisiert wurde. Auf funktioneller Ebene waren die Eigenschaften des TRAP-Komplexes bis dato jedoch weitestgehend unverstanden. Mutationen der Untereinheiten des TRAP-Komplexes führten zur Ausprägung einer congenitalen Glykosylierungskrankheit („congenital disorder of glycosylation“, CDG), deren Manifestation mechanistisch unverstanden ist. Zur funktionellen Charakterisierung des TRAP-Komplexes, seiner Substrate und deren Eigenschaften sowie der Erstellung eines mechanistischen Modells wurden markierungsfreie massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Sowohl Fibroblasten der CDG-Patienten als auch mittels RNA-Interferenz (RNAi) TRAP-depletierte HeLa-Zellen wurden hinsichtlich Veränderungen des Proteoms gegenüber Kontrollzellen analysiert. Durch bioinformatisch gestützte Proteinhäufigkeitsbestimmungen wurden potentielle TRAP-Substrate identifiziert und in unabhängigen Experimenten mittels Western Blot, qRT-PCR und Komplementationsanalysen validiert. Dabei wurde ermittelt, dass die Signalpeptide dieser Proteine, die zum Import in das ER-Lumen auf die Anwesenheit des TRAP-Komplexes angewiesen sind, einen erhöhten Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin (GP) sowie verminderte Hydrophobizität aufweisen. Diese Substrateigenschaften wurden ebenfalls durch Mutationsanalysen in intakten HeLa-Zellen validiert. Unter Beachtung der Daten der CET-Analysen könnten die Funktionen des TRAP-Komplex folgendermaßen beschrieben werden: Auf cytosolischer Seite der ER-Membran könnte der TRAP-Komplex als Signalpeptidrezeptor agieren, der solche Signalpeptide mit einem erhöhten GP-Gehalt und/oder verminderter Hydrophobizität erkennt. Diese Information könnte innerhalb des Komplexes an luminalen Teile weitergeleitet werden, wodurch diese in substratspezifischer Art und Weise die Öffnung der Translokationspore fördern. Die strukturellen Untersuchungen zeigten, dass der TRAP-Komplex in räumlicher Nähe zu Loop 5 von Sec61 $\alpha$  steht, worüber eine Interaktion möglich sein könnte.

## Abstract

### Functional characterization of the human translocon associated protein complex

The human proteome comprises about one-third of proteins, which are processed and modified via the secretory pathway before they subsequently arrive at their functional place of destination. The transport of the synthesized polypeptides is mediated by the heterotrimeric Sec61 complex. Depending on the properties of the substrates, the Sec61 complex needs accessory components that support the import of the proteins. Such an accessory component is the translocon associated protein (TRAP) complex, whose structure has recently been characterized by cryo electron tomography (CET). At the functional level, however, the properties of the TRAP complex have been poorly understood so far. Mutations in the subunits of the TRAP complex result in a loss of whole TRAP complex, which lead to the development of a congenital disorder of glycosylation (CDG), which is mechanistically not understood. Here, siRNA mediated gene knock-down in HeLa cells was combined with label-free quantitative proteomic analysis and differential protein abundance analysis to identify TRAP dependent precursors and to characterize determinants of TRAP substrate specificity. Also, CDG-fibroblasts were analyzed for cellular protein abundance changes upon the loss of TRAP complex. The results were validated in independent experiments by quantitative RT-PCR, western blotting and complementation analysis. The signal peptides of TRAP clients, e.g. proteins that are dependent on TRAP complex for import into the ER lumen, exhibit above-average content of helix-breaking amino acids glycine-plus-proline and below-average hydrophobicity as distinguishing features. These determining substrate properties were validated by mutagenesis studies in intact HeLa cells. Considering the data of the CET analysis, the functions of the TRAP complex could be described as follows: On the cytosolic face of the ER membrane, TRAP complex may act as a signal peptide receptor recognizing precursor polypeptides peptides of high glycine-plus-proline content and/or low hydrophobicity. The transmembrane part of the TRAP complex may serve as an information relay on the luminal side of the ER membrane, thereby triggering opening of the Sec61-channel in a substrate specific manner. Structural studies revealed the TRAP complex in close proximity to the hinge region of Sec61 $\alpha$  (loop 5), which may allow interaction.

# 1. Einleitung



**Abbildung 1: Sekretorischer Transportweg**

Bei etwa einem Drittel aller Proteine, welche im humanen Genom kodiert sind, handelt es sich um sekretorische Proteine oder um Proteine der dem sekretorischen Transportweg zugehörigen Organellen. Eine zentrale Rolle nimmt dabei das endoplasmatische Retikulum (ER) ein, das größte tubuläre Membrannetzwerk einer kernhaltigen Zelle. An diesem Organell erfolgt nach der Proteinbiosynthese der Transport in das ER-Lumen und anschließend die Prozessierung, Faltung und Assemblierung der Proteine. Native Proteine werden folgend im Golgi-Apparat sortiert und durch vesikulären Transport zu ihrem funktionalen Zielort befördert (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licences/by/3.0/>).

Bei etwa einem Drittel aller Proteine, welche im humanen Genom kodiert sind, handelt es sich um sekretorische Proteine oder um Proteine der dem sekretorischen Transportweg zugehörigen Organellen (Abbildung 1). Eine zentrale Rolle nimmt dabei das endoplasmatische Retikulum (ER) ein, das größte tubuläre Membrannetzwerk einer kernhaltigen Zelle (Friedman & Voeltz, 2011). Zu Beginn der Proteinbiosynthese passieren ein Großteil der Membranproteine und alle luminalen Proteine der Organellen des sekretorischen Wegs die ER-Membran, um in selbige integriert oder in das ER-Lumen zur Faltung und Assemblierung geleitet zu werden (Blobel & Dobberstein, 1975 I & II). Native Proteine werden folgend im Golgi-Apparat sortiert und durch vesikulären Transport zu ihrem funktionalen Zielort befördert (Schekman, 2004; Barlowe & Miller, 2013).

## 1.1. Das endoplasmatische Retikulum (ER)

Humane Zellen zeichnen sich durch ein dynamisches Netzwerk, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) aus. Dieses kann unter verschiedenen Gesichtspunkten unterteilt werden: Räumlich in peripheres und perinukleäres ER, strukturell in Tubuli und Zisternen sowie funktional in glattes und raues ER. Letztere Bezeichnung geht auf die Besetzung der ER-Membran mit 80S Ribosomen zurück, welche maßgeblich, und somit auch das raue ER, an der Synthese sekretorischer Proteine beteiligt sind. So ist das ER nicht nur am Import der Polypeptidketten beteiligt, sondern auch für die Prozessierung und Assemblierung der Proteine im ER-Lumen (English & Voeltz, 2013; Palade, 1975; Blobel & Dobberstein, 1975). Das endoplasmatische Retikulum stellt des Weiteren auch den zentralen Speicherort für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen der Zelle dar (Raffaello et al., 2016). Darüber hinaus steht das ER mit einigen anderen Organellen der Zelle in Kontakt. So wird der Interaktion zwischen ER und Golgi traditionell mit anterogradem und retrogradem Transport als Teil des sekretorischen Wegs in Verbindung gebracht, sowie dem direkten Transport von Lipiden (Spang, 2009; Lev, 2010). Die Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien sind ebenfalls wichtig für den Lipidtransfer sowie der Calcium-Signalgebung (de Brito & Scorrano, 2010). Als Teilschritt derer Biogenese bilden sich außerdem Peroxisomen sowie sog. „lipid droplets“ aus der ER-Membran (Dimitrov et al., 2013; Joshi et al., 2018). Die Interaktion zwischen ER und der Plasmamembran ist außerdem wichtig zur Regulation der Calciumhomöostase und wurde darüber hinaus auch mit der Regulation des Phosphatidylinositol-Metabolismus sowie direktem Steroltransfer in Verbindung gebracht (Carrasco & Meyer, 2011; Stefan et al., 2011; Baumann et al., 2005). Fehlfunktionen des ER bzw. Mutationen einzelner Komponenten im ER werden mit verschiedenen Krankheiten assoziiert wie z.B. Diabetes, Glioblastom, Prostata- Lungenkarzinom, Fett- und Zystenleber und congenitaler Glykosylierungskrankheit (Haßdenteufel et al., 2014; Lloyd et al., 2010; Lu et al., 2009; Linxweiler et al., 2013; Davila et al., 2004; Ng et al., 2015).

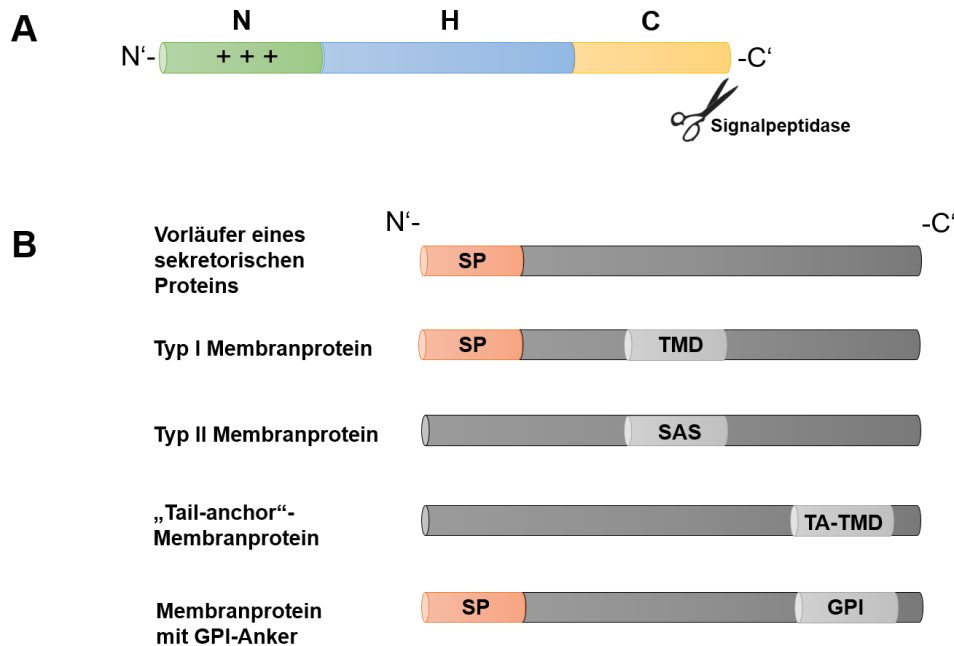
## 1.2. Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum

Der Transport von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum erfolgt durch den heterotrimeren Sec61-Komplex. Der gerichtete Transfer der Vorläuferpolypeptide von sekretorischen oder Membranproteinen wird entweder noch während der Synthese durch kodierende N-terminale Signalpeptide bzw. Transmembranhelices (co-translational) oder nach abgeschlossener Synthese (post-translational) vermittelt, was folgend näher erläutert wird (von Heijne, 1986; Blobel & Dobberstein, 1975).

### 1.2.1. Signalsequenzen

Zum zielgerichteten Transport von Proteinen zur ER-Membran und als Stimulus zum Öffnen der Translokationspore, sind innerhalb der naszierenden Polypeptidketten kodierende Bereiche integriert. Diese können entweder in Form eines N-terminalen, abspaltbaren Signalpeptids, einer kodierenden integralen Transmembrandomäne („signal-anchor sequence“, SAS) oder komplett C-terminalen Transmembrandomäne („Tail-anchor“, TA), beide nicht abspaltbar, vorliegen (Blobel & Dobberstein, 1975 I & II; Kutay et al., 1993). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass C-terminale Ankersequenzen von Proteinen, die über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Zellmembran befestigt sind, den zielgerichteten Transport zum ER kodieren. (Ferguson, 1999; Ast et al., 2013). Abspaltbare Signalsequenzen sind N-terminale Verlängerungen naszierender Vorläuferpolypeptide, die anschließend an die Translokation vom Signalpeptidase-Komplex erkannt und abgeschnitten werden (Blobel, 1980). Bei solchen Signalpeptiden handelt es sich meist um etwa 16 bis 32 Aminosäuren lange Sequenzen, die eine charakteristische, dreigliedrige Struktur aufweisen. Die N-terminale, hydrophile Region (N) weist meist positive Ladungen auf. Daran schließen sich die etwa aus 5-15 hydrophoben Aminosäuren bestehende Kernregion (H), und eine leicht polare C-terminale Region an, die die Schnittstelle nach der (-3 -1) Regel des Signalpeptidase-Komplexes umfasst. Diese Merkmale beschreiben einen Großteil der ER-Signalpeptide, jedoch gibt es auch Ausnahmen z.B. hinsichtlich Länge, Domänenstruktur, Aminosäurekomposition und Ladungsverteilung (von Heijne, 1983 & 1985; Kapp et al., 2009).





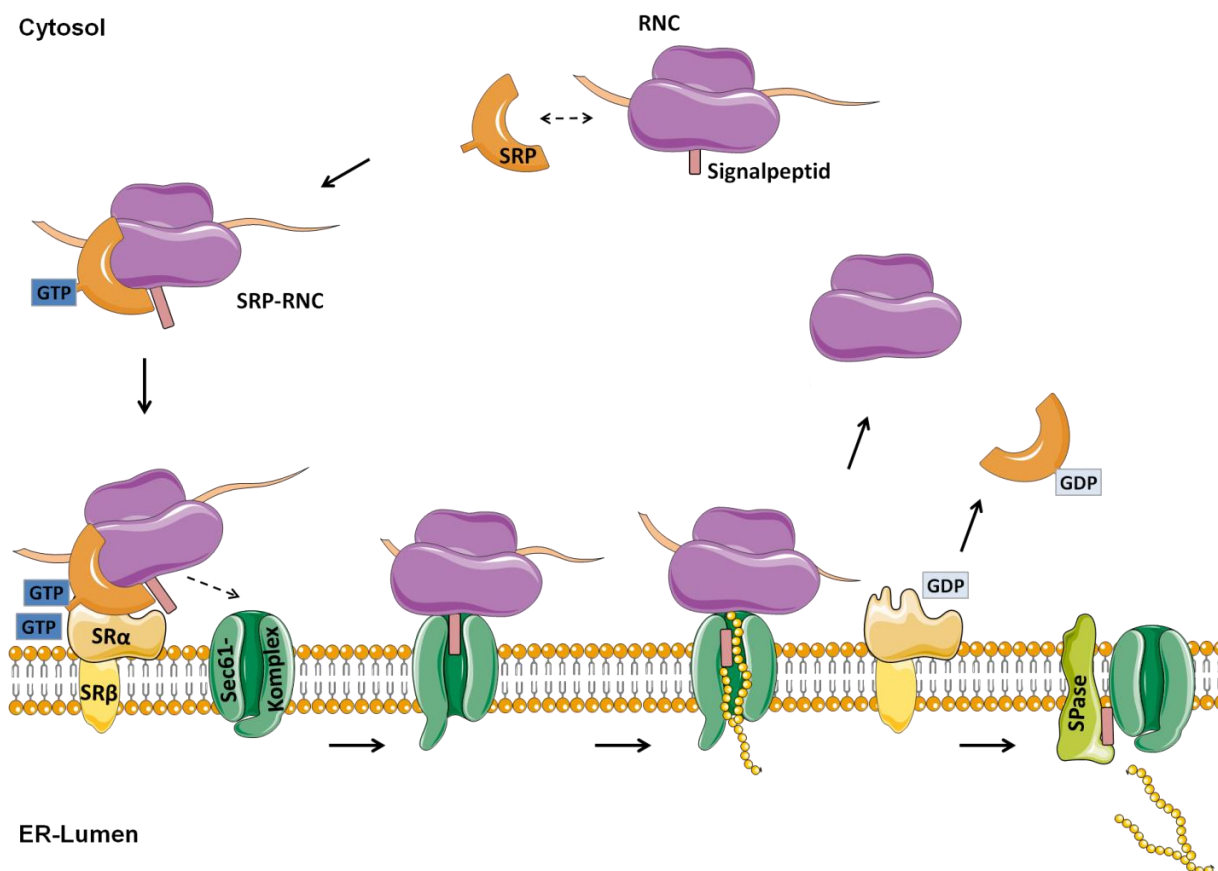
**Abbildung 2: Schemata ER-gerichteter Proteine**

**A** Schematische Darstellung abspaltbarer N-terminaler Signalsequenzen. Bei solchen Signalpeptiden handelt es sich meist um etwa 16 bis 32 Aminosäuren lange Sequenzen, die eine charakteristische dreigliedrige Struktur aufweisen. Die N-terminale, hydrophile Region (N, grün) weist meist positive Ladungen auf. Daran schließen sich die etwa aus 5-15 hydrophoben Aminosäuren bestehende Kernregion (H, blau), und eine leicht polare C-terminale Region an, die die Schnittstelle nach der (-3 -1) Regel des Signalpeptidase-Komplexes umfasst (C, gelb). **B** Relative Position der unterschiedlichen ER-zielgerichteten Signale innerhalb der Aminosäuresequenz. SP: (abspaltbares) Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; SAS: „signal-anchor sequence“; TA: „Tail-anchor“; GPI: Glykosylphosphatidylinositol. (verändert nach Haßdenteufel, 2017).

Die Variabilität der Signalsequenzen erlaubt der Zelle die Kontrolle und Regulation der Zielführung und des Transports der Vorläuferpolypeptide. Manche Signalpeptide erfüllen nach der proteolytischen Abspaltung weitere zelluläre Funktionen (Kapp et al., 2009). Gemeinsamkeit aller Arten der beschriebenen Signalsequenzen ist die hydrophobe Kernregion, welche zur Ausbildung von alpha-helikalen Strukturen tendiert (O'Neil & DeGrado, 1990). Diese muss während dem zielgerichteten Transport zum ER abgeschirmt werden, um ungewollte Aggregation oder Interaktion zu vermeiden. Daher binden cytosolische Chaperone diese Regionen, um die Polypeptidkette in einem translokationskompetenten Zustand zu halten. Dabei sind die bindenden Chaperone charakteristisch für das Substrat und die Route, über welche die Polypeptidkette zur ER-Membran geleitet wird (Stefanovic & Hegde, 2007; Walter & Johnson, 1994; Aviram et al., 2016)

### 1.2.2. SRP-abhängiger Proteintransportweg

Der Proteintransport zum ER wird im Säuger hauptsächlich co-translationale über den SRP-abhängigen Transportweg vermittelt. SRP meint dabei den „signal recognition particle“, einen cytosolischen Ribonukleoprotein Komplex. Translation und Translokation der Polypeptidkette laufen zeitlich und räumlich nicht getrennt voneinander ab (Abbildung 3).

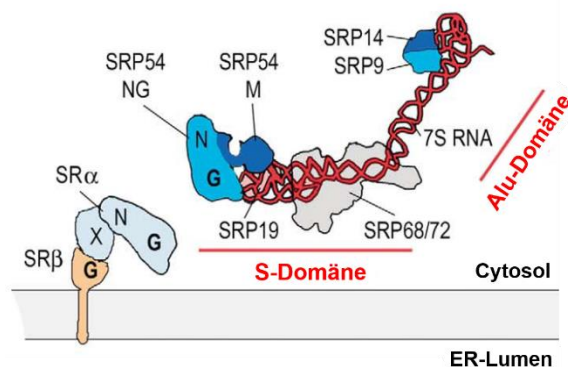


**Abbildung 3: SRP-abhängiger Proteintransportweg**

SRP bindet das hydrophobe Signalpeptid, das im Zuge der Proteinbiosynthese aus dem ribosomalen Tunnel austritt und bildet dadurch den „ribosome-nascent-chain“ (RNC)-SRP Komplex. Durch die Bindung von SRP an den Rezeptor (SR $\alpha$  und SR $\beta$ ), wird der RNC-SRP Komplex zur ER-Membran dirigiert und dockt dort an. Anschließend wird der RNC zum Sec61-Komplex transferiert und kappt die Bindung zu SRP. Die Interaktion des Signalpeptids mit der Sec61-Kanal bewirkt die Öffnung der Translokationspore. Im Zuge der co-translationalen Translokation erfolgt der Transport während der Synthese der Polypeptidkette in das ER-Lumen. Der Signalpeptidase-Komplex (SPase) entfernt die Signalsequenz des Vorläuferpolypeptids mit anschließender Prozessierung, Faltung und Assemblierung. Nach abgeschlossener Translokation können Ribosom und SRP einen neuen Transportzyklus beginnen (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

SRP erkennt dazu zunächst das hydrophobe N-terminale Signalpeptid einer aus dem ribosomalen Tunnel hervortretenden Polypeptidkette und bindet dieses während der Rest der Polypeptidkette weiter synthetisiert wird. Diese Synthese wird durch die zusätzliche Interaktion zwischen dem Ribosom und SRP drastisch verlangsamt.

Anschließend bindet SRP den membranständigen SRP-Rezeptor (SR), einem Dimer aus den Untereinheiten SR $\alpha$  und SR $\beta$ . Durch diese Interaktion wird gleichzeitig auch der „ribosome nascent chain“ (RNC) Komplex zur ER-Membran und schließlich zum Sec61-Komplex dirigiert. Ist dieser Schritt erfolgt, wird durch die kontinuierlich weiter ablaufende Translation die gleichzeitige Translokation in das ER-Lumen oder die Integration in die ER-Membran ermöglicht.



**Abbildung 4: Schematischer Überblick des SRP-Komplexes und seines membranständigen Rezeptors**

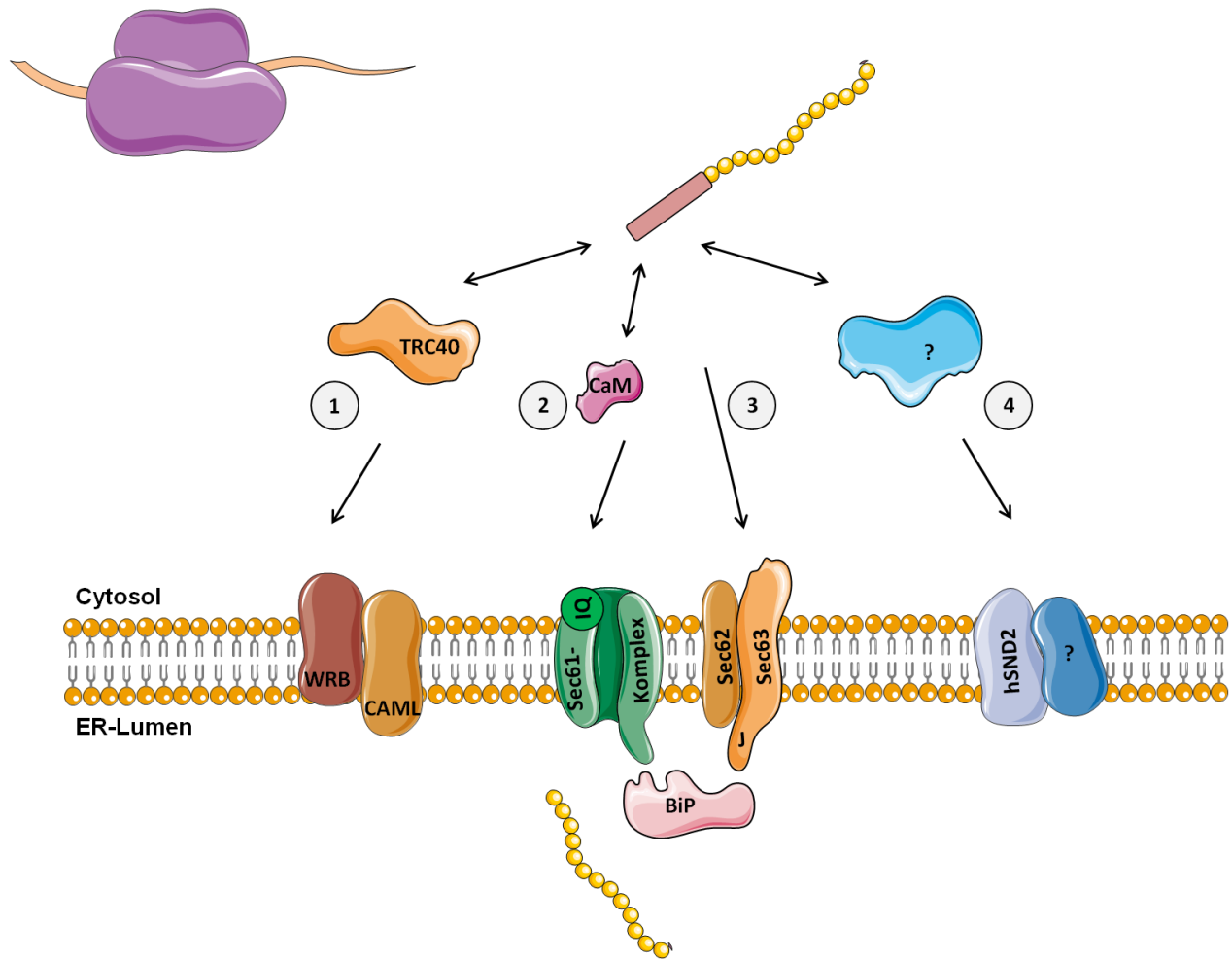
Der cytosolische SRP-Komplex lässt sich in zwei Subdomänen sowie die 7S rRNA unterteilen: Alu- und S-Domäne. Die Alu-Domäne wird aus den Untereinheiten SRP9 und SRP14 gebildet, die S-Domäne aus den Untereinheiten SRP19, SRP68, SRP72 und SRP54. Letztere verfügt über eine zentrale G-Domäne, die ATPase-Aktivität aufweist, und eine N-Domäne, die regulierend auf die GTP-Affinität wirken könnte. Auch beide Untereinheiten des SRP-Rezeptors weisen ATPase-Aktivität auf. Die  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors ist strukturell und funktional homolog zur NG-Domäne von SRP54 aufgebaut (modifiziert nach Halic & Beckmann, 2005).

Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung des SRP-Komplexes bestehend aus den sechs Untereinheiten SRP9 und SRP14 (Alu-Domäne), SRP19, SRP54, SRP68 und SRP72 (S-Domäne) sowie der 7S rRNA (Walter & Blobel, 1983; Gundelfinger et al., 1983). Die SRP54-Untereinheit verfügt über eine zentrale G-Domäne, die ATPase-Aktivität aufweist, und eine N-Domäne, die regulierend auf die GTP-Affinität wirken könnte. Auch beide Untereinheiten des SRP-Rezeptors weisen ATPase-Aktivität auf. Die  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors ist strukturell und funktional homolog zur NG-Domäne von SRP54 aufgebaut. Die Bindung von SRP an den SRP-Rezeptor verläuft in einer GTP-abhängigen Interaktion über die jeweiligen NG-Domänen. Studien am bakteriellen SRP-SR Komplex zeigten, dass die Interaktion mit dem Translokon zu Konformationsänderungen führen, die die Hydrolyse von GTP beider GTPasen dahingehend stimulieren, dass die Bindung zwischen SRP und der Signalsequenz gelöst und deren Transfer zur Translokationspore eingeleitet wird (Egea et al., 2004; Freymann et al., 1999; Akopian et al., 2013).

### 1.2.3. SRP-unabhängige Proteintransportwege

Der Proteintransport in das ER-Lumen auf SRP-unabhängigem Wege ist in Hefen der klassische Transportweg, doch auch im Säuger werden im Cytosol vollständig synthetisierte Vorläufer-Polypeptide zur weiteren Prozessierung in das ER-Lumen SRP-unabhängig transportiert. SRP-unabhängige Transportwege zeichnen sich dadurch aus, dass die Synthese an freien Ribosomen und Translokation der Vorläuferpolypeptide in das ER räumlich und zeitlich strikt voneinander getrennt sind. Grund dafür sind die Substrateigenschaften, die eine Interaktion mit SRP nicht zulassen, wie z.B. der geringen Kettenlänge des Polypeptids und sofern vorhanden, der Position und Hydrophobizität der Signalsequenzen (Johnson et al., 2013; Ast et al., 2013; Haßdenteufel et al., 2018). Diese posttranslational transportierten Substrate sind vor allem durch ihre Kettenlänge mit maximal 100 AS gekennzeichnet, die daher zu kurz ist, um noch während der Proteinbiosynthese im Ribosom mit SRP zu interagieren (Schlenstedt, 1990; Flanagan et al., 2003; Lakkaraju et al., 2012). Cytosolische Chaperone halten die vollständig synthetisierte Polypeptidkette in einem translokationskompetenten Zustand.

Zur Translokation müssen die Polypeptide zunächst im Cytosol zum Sec61-Kanal geleitet werden („Targeting“). Dies kann substratspezifisch über verschiedene Mechanismen passieren, welche cytosolische und ER-membranständige Komponenten umfassen, und ebenfalls mit Ribosomen interagieren können. Die bekannten „Targeting“-Routen weisen ein überlappendes Substratspektrum auf und sind mechanistisch noch nicht vollständig verstanden (Abbildung 5).



**Abbildung 5: SRP-unabhängige Proteintransportwege zum ER**

Der Transport v.a. kurzer Vorläuferpolypeptide wird ohne Beteiligung von SRP posttranslational vermittelt. Der Transportweg zur ER-Membran hängt dabei maßgeblich von den Eigenschaften der zu transportierenden Substrate ab. Der Transport sogenannter Tail-anchor Proteine wird vorwiegend über den TRC40-Weg vermittelt. Nach der Synthese der Vorläuferpolypeptide erfolgt die Bindung durch sogenannte „Pre-targeting“ Faktoren (Bag6, TRC35, Ubl4A) und die Übergabe des Substrats an den „Tail-anchor receptor complex“ (TRC40), einer cytosolischen ATPase. Anschließend erfolgt der Transport zum heterodimeren (oder heteropentameren) Rezeptorkomplex für TRC40, bestehend aus WRB und CAML und die Integration in die ER-Membran unter ATP-Hydrolyse (1). Alternativ können kurze Vorläuferpolypeptide durch Bindung mit dem cytosolischen Protein Calmodulin (CaM) zur Sec61-Translokationspore geleitet werden und dort mit einem CaM-IQ-Bindemotiv interagieren (2). Darüber hinaus können Signalpeptide kleiner sekretorischer Polypeptide direkt mit dem ER-membranständigen Protein Sec62 eine Bindung eingehen. Durch die Interaktion von Sec62 mit dem Hsp40 Co-Chaperon Sec63 (ERj2) und der Assoziation über dessen J-Domäne mit BiP, kann folgend die Öffnung der Sec61-Translokationspore vermittelt werden (3). Die SND Route könnte als Alternative für Substrate dienen, deren Signalsequenz sich am N- oder C-Terminus befindet, und daher eigentlich der SRP- oder TRC40-Route zugeordnet würde. Diese Route ist in der *S. cerevisiae* charakterisiert, im Säuger konnte bisher erst eine Komponente des Transportwegs identifiziert werden (4) (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Vollständig synthetisierte, Vorläuferpolypeptide werden somit über folgende Routen zur ER-Membran transportiert. Der Transport sogenannter „Tail-anchor“ Proteine wird vorwiegend über den TRC40-Weg vermittelt.

Das klassische Kennzeichen dieser Typ-II-Membranproteine ist die C-terminale kodierende Transmembranhelix, die als Anker in der ER-Membran dient. Sie verfügen nicht über ein N-terminales, abspaltbares Signalpeptid (Borgese & Fasana, 2011).

Nach der Synthese der Vorläuferpolypeptide erfolgt die Bindung durch sogenannte „Pre-targeting“ Faktoren (Bag6, TRC35, Ubl4A) und die Übergabe des Substrats an den „Tail-anchor receptor complex“ (TRC40), einer cytosolischen ATPase. Anschließend erfolgt der Transport zum heterodimeren (oder heteropentameren) Rezeptorkomplex für TRC40, bestehend aus WRB und CAML und die Integration in die ER-Membran unter ATP-Hydrolyse (Vilardi et al., 2014; Leznicki et al., 2013; Shao & Hegde, 2011).

Alternativ können kurze Vorläuferpolypeptide durch Bindung mit dem cytosolischen Protein Calmodulin (CaM) zur Sec61-Translokationspore geleitet werden und dort mit einem CaM-IQ-Bindemotiv interagieren (Shao & Hegde, 2011; Erdmann, et al., 2011).

Darüber hinaus können Signalpeptide kleiner sekretorischer Polypeptide direkt mit dem ER-membranständigen Protein Sec62 eine Bindung eingehen. Durch die Interaktion von Sec62 mit dem Hsp40 Co-Chaperon Sec63 (ERj2) und der Assoziation über dessen J-Domäne mit BiP, kann folgend die Öffnung der Sec61-Translokationspore vermittelt werden (Schäuble et al. 2015; Conti et al., 2015; Haßdenteufel et al., 2018).

Bioinformatische Analysen und experimentelle Validierungen zeigten, dass etwa 30 % des Hefe Sekretoms unabhängig von SRP zur ER-Membran transportiert wird (Ast et al., 2013). Zusätzliche Screenings in *S. cerevisiae* zeigten, dass Stämme nach Knock-out der GET-Maschinerie („guided entry of TA proteins“, homolog zur TRC40-Route) weiterhin lebensfähig sind und identifizierten einen weiteren „SRP-independent (SND)“-Transportweg (Aviram et al., 2016). Snd1 wurde als cytosolischer Bindungspartner des Substrats nachgewiesen, der den gerichteten Transport zum heterodimeren Rezeptor in der ER-Membran (Snd2 und Snd3) vermittelt. Die SND Route könnte als Alternative für Substrate dienen, deren Signalsequenz sich am N- oder C-Terminus befindet, und daher eigentlich der SRP- oder TRC40-Route zugeordnet werden. Die identifizierten SND-Substrate wiesen meist eine innerhalb des Substrats zentral positionierte Transmembrandomäne auf, was diese These unterstützt. Durch weitere in vitro Studien in Säugerzellen konnte das humane Snd2-Ortholog – hSnd2 (TMEM208) – ermittelt und funktional validiert werden, was für die Konservierung dieser Route auch im Säuger spricht (Haßdenteufel et al., 2017).

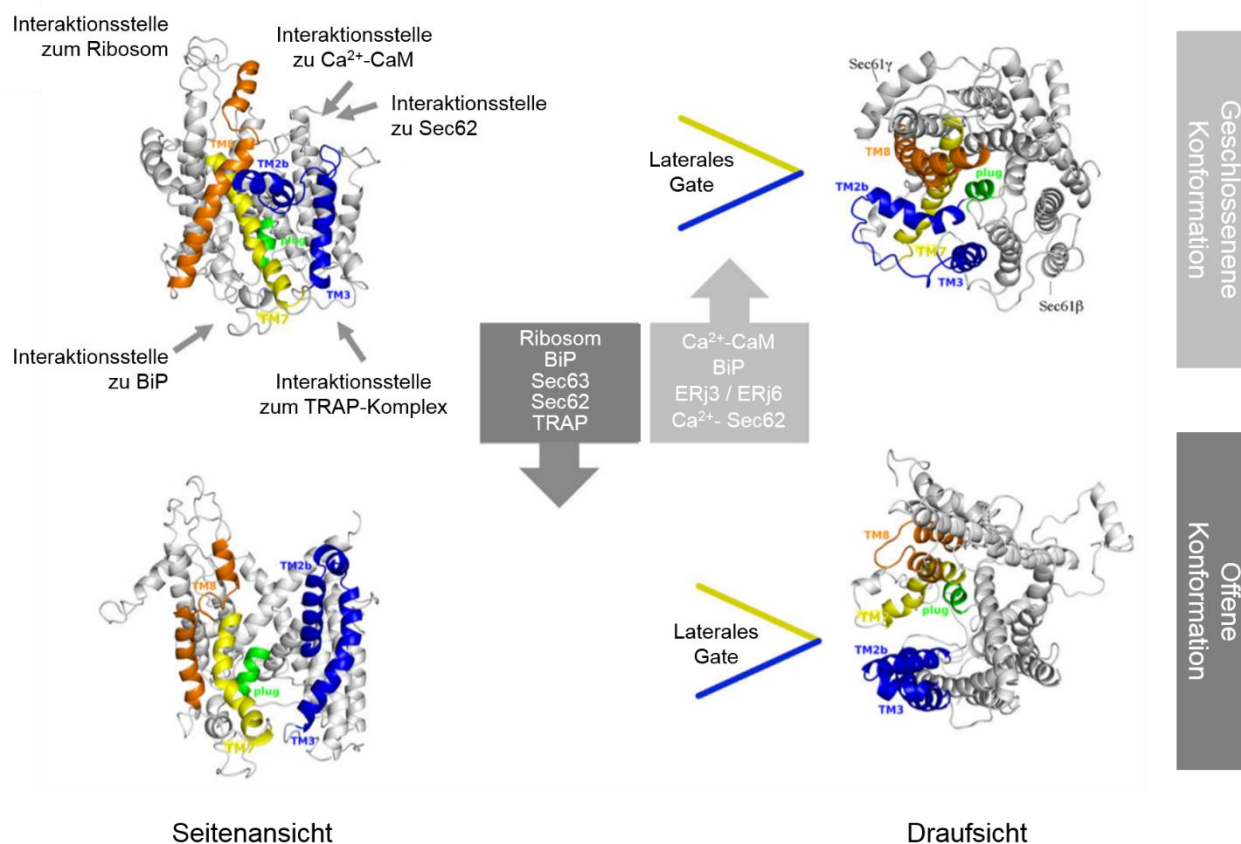
### 1.3. Komponenten der Proteintranslokase

Der Proteintransport der synthetisierten Polypeptide in das ER wird über den heterotrimeren Sec61-Komplex vermittelt. Je nach Eigenschaften der Substrate sind dabei akzessorische Komponenten nötig, die den Import unterstützen. Folgend werden einzelne Teile der Proteintranslokase näher beschrieben.

#### 1.3.1. Der Sec61-Komplex

Der heterotrimere Sec61-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , bildet eine wässrige Translokationspore, durch welche die Proteintranslokation in das ER-Lumen oder die Insertion von Proteinen in die ER-Membran vermittelt wird. Eine Struktur für diesen Komplex wurde basierend auf Röntgenkristallanalysen des isolierten Orthologs SecY Komplexes vorgeschlagen, weitergehende Cryo-EM Analysen bestätigten den hohen Konservierungsgrad (Van den Berg et al., 2004; Voorhees et al., 2014; Gogala et al., 2014). Durch Sec61 $\alpha$  wird der zentrale Translokationskanal, einem polytopen Membranprotein aus 10 Transmembrandomänen, gebildet. Bei Sec61 $\beta$  und Sec61 $\gamma$  handelt es sich im Säuger um „Tail-anchor“-Membranproteine. Die Sec61 $\alpha$ -Untereinheit setzt sich aus zwei pseudosymmetrischen Hälften zusammen, der N-terminalen (TM1-5) und der C-terminalen Hälfte (TM6-10) um eine zentrale Einschnürung aus sechs hydrophoben Aminosäureresten („pore ring“). Diese Einschnürung wirkt gemeinsam mit der „plug“-Domäne/Minihelix auf luminaler Seite abdichtend für den Kanal. Je nach relativer Positionierung der beiden Hälften lässt sich zwischen geschlossener und offener Konformation der Translokationspore unterscheiden (Abbildung 6). In offener Konformation wird der seitliche Zugang zur Phospholipid-Doppelschicht von Signalpeptiden oder Transmembranhelices naszierender Polypeptidketten durch das „lateral gate“ (TM2b/3 und TM7/8) ermöglicht. Cryo-EM Untersuchungen zeigten, dass erst durch die Interaktion des Ribosom mit dem Sec61 $\alpha$ -Kanal (Loop 6 und Loop 8) und dem N-Terminus von Sec61 $\gamma$  eine Reihe von Ereignissen auslösen, zielführend zur Translokation der Polypeptidkette, beginnend mit der Freilegung eines hydrophoben Teilbereichs im cytosolisch zugänglichen Bereich von Sec61 $\alpha$  (Voorhees & Hegde, 2016). Durch die Interaktion der in den Kanal eintretenden Signalsequenz mit der freigelegten hydrophoben Stelle im Translokationskanal, wird die TM2 so verschoben, dass das „lateral gate“ destabilisiert und der Kanal in die offene Konformation übergeht. Dadurch wird die Translokation der naszierenden Kette aus dem ribosomalen Tunnel durch die Sec61-Translokationspore in das ER-Lumen ermöglicht (Conti et al., 2015; Park et al., 2014). Die naszierende Polypeptidkette kann in einer von zwei möglichen Konformationen in den Kanal inserieren:

1. In der „hairpin“-Konformation, wobei der N-Terminus des Signalpeptids zum Cytosol gerichtet ist oder 2. In der „head-first“-Konformation, wobei der N-Terminus des Signalpeptids zum ER-Lumen zeigt (Park et al., 2014; Devaraneni et al., 2011; Vermeire et al., 2014). Die "hairpin"-Insertion stellt den produktiveren Modus dar, wohingegen nach "head-first"-Insertion eine Umkehrung der Orientierung erfolgen muss, damit die dem Signalpeptid nachgeschaltete Sequenz in das ER-Lumen gelangen kann. Letztere kann als eine energetisch ungünstige Reaktion angesehen werden, die normalerweise die Hilfe von Komponenten erfordert, die die energetische Barriere zur Orientierungsumkehrung des Signalpeptids senken können (Lang et al., 2017).



**Abbildung 6: Modell des dynamischen Gleichgewichts und Mechanismen zur Konformationsänderung des humanen Sec61-Komplexes**

**Oben:** Strukturelles Modell des humanen Sec61-Komplexes in geschlossener Konformation basierend auf der Cryo-EM Struktur des Sec61-Komplexes des Hundes unter Verwendung der Röntgenstruktur von SecY aus Archaeobakterium *M. jannaschii*. **Unten:** Vorgeschlagenes Homologiemodell des humanen Sec61-Komplexes in offener Konformation basierend auf der Cryo-EM Struktur des SecY aus *E. coli*. **Links:** Laterale Seitenansicht aus der Ebene der ER-Membran. **Rechts:** Draufsicht auf den Komplex von cytosolischer Seite aus. TM2b, TM3, TM7 und TM8 bilden das „lateral gate“. Markiert sind darüber hinaus experimentell nachgewiesene Interaktionsstellen zu akzessorischen Komponenten des Translokasekomplexes BiP, Sec62 und dem TRAP-Komplex sowie der Interaktionsstelle zum Ribosom und Ca<sup>2+</sup>-CaM. (modifiziert nach Lang et al. 2017, basierend auf Dudek et al. 2015)



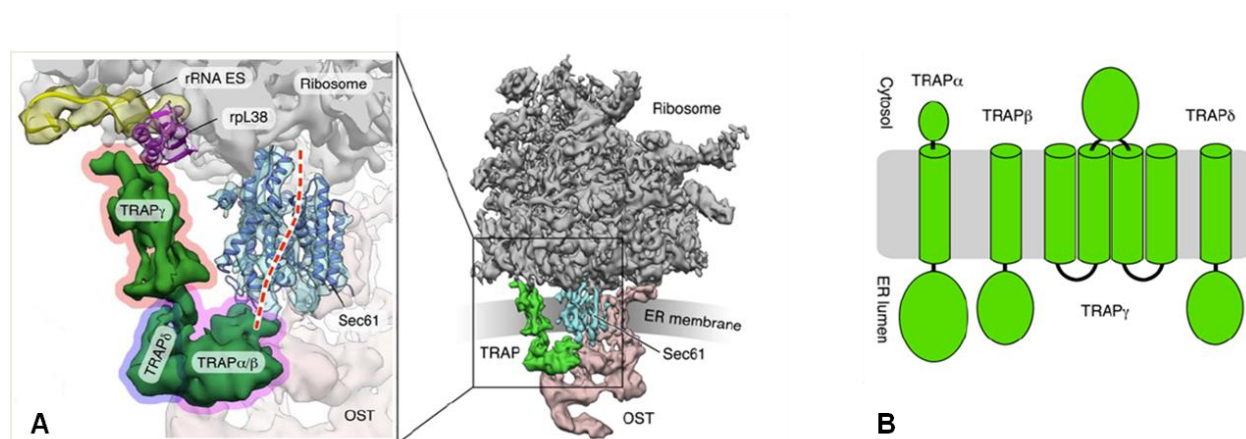
Weitere Einblicke in die Architektur und Dynamik des Sec61-Kanals in seiner physiologischen Umgebung konnten aktuelle Cryo-Elektronentomografie (CET) Untersuchungen nativer ER-Membranvesikel liefern (Pfeffer et al., 2014, 2015, 2017). Mit Hilfe der CET-Daten konnten ergänzend zum Atommodell des solubilisierten Ribosomen-gebundenen Sec61-Komplexes die Positionen und Konformation der Sec61-Untereinheiten bestimmt werden (Voorhees et al., 2014). Dadurch konnten mögliche Interaktionsstellen zwischen dem Translokon und dem OST- sowie dem TRAP-Komplex sowie zum Ribosom eingegrenzt werden (Pfeffer et al., 2014, 2015, 2017). Weitere Informationen zur Zusammensetzung der Translokationsmaschinerie in der ER-Membran wurden durch Experimente mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) realisiert. Diese demonstrierten eine Assoziation von Sec61 $\alpha$ 1, Sec61 $\beta$ , Sec62 und ERj1 zum Ribosom sowie die permanente räumliche Nähe des SRP-Rezeptors, des TRAP-Komplexes und des „translocating chain-associating membrane“ (TRAM) Proteins zum Sec61-Komplex (Snapp et al., 2004; Benedix et al., 2010; Müller et al., 2010). Die Ergebnisse aktueller Cross-Linking Studien lassen die Vermutung zu, dass SR und Sec62 an gleicher Stelle mit Sec61 $\alpha$  interagieren und SR den Sec61-Kanal von Sec62 zu SRP-abhängiger Translokation umschalten kann (Jadhav et al., 2015). Durch die Interaktion von unterstützenden Translokasekomponenten zu Sec61 $\alpha$  können in einer substratspezifischen Art und Weise Translokationsprozesse erleichtert werden. Auf solche Hilfskomponenten sind z.B. Substrate angewiesen, die ein sogenanntes „schwaches“ Signalpeptid oder Transmembranhelices aufweisen. Diese können nicht die direkte Öffnung der Translokationspore stimulieren oder etwa in der „head-first“ Konfiguration inserieren, weshalb ihnen zur Umkehrung der Orientierung verholfen werden muss. In diesem Zusammenhang sind vor allem der TRAP-Komplex und das Hsp70 Chaperon BiP zu nennen (Fons et al., 2003; Schäuble et al., 2012; Van Lehn et al., 2015).

### **1.3.2. Der Translokon-assoziierte Protein (TRAP) Komplex**

Als eine akzessorische Komponente des Translokons wurde der Translokon-assoziierte Protein (TRAP)-Komplex identifiziert (Prehn et al., 1990; Wang & Dobberstein, 1999; Hartmann et al., 1993). Der TRAP-Komplex wurde ursprünglich als „Signal Sequence Rezeptor“ entsprechend seiner zunächst zugeschriebenen Funktion bezeichnet (Wiedmann et al., 1987 & 1989; Hartmann et al., 1993). Hinsichtlich der Position des TRAP-Komplex wurde durch Anwendung biochemischer Methoden nachgewiesen, dass der Sec61-Komplex mit TRAP in physischer Verbindung steht (Conti et al., 2015; Snapp et al., 2004).

Weitere Studien belegten, dass der TRAP-Komplex zusammen mit dem Ribosom-assoziierten Sec61-Komplex einen stabilen stöchiometrischen Superkomplex bildet (Ménétret, et al., 2008; Pfeffer, et al., 2014 & 2017).

Mit Hilfe von Proteinsequenzdatenbanken wurde nachgewiesen, dass der heterotetramere TRAP-Komplex im Tierreich konserviert ist, jedoch nicht einheitlich für alle Eukaryoten: So fehlt dieser in Pilzen komplett, in Algen und Pflanzen weist der TRAP-Komplex jedoch eine vereinfachte Struktur auf, da die Untereinheiten TRAP $\gamma$  (SSR3) und TRAP $\delta$  (SSR4) fehlen. Mutationen in den TRAP $\gamma$  und TRAP $\delta$  Untereinheiten führen zum Verlust des gesamten TRAP-Komplexes und zu einer Form der Congenitalen Glycosylierungskrankheit (CDG, 1.6). Mittels CET am nativen Translokon evolutionär divergierender Organismen sowie der CDG-Patientenzellen wurde die strukturelle Zuordnung der vier TRAP-Untereinheiten ermöglicht (Pfeffer, et al., 2017), (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Gesamtstruktur und Zusammensetzung der Untereinheiten des humanen TRAP-Komplexes.**

(A) Mittels CET vorausgesagte Struktur eines Ribosoms angeheftet an der Membran des humanen endoplasmatischen Retikulums. Die annähernd zugeordneten Positionen der TRAP-Untereinheiten entstammen eines Satzes von Dichtedifferenzen, aus dem TRAP $\alpha\beta$ -defizienten Algen-Translokon und dem TRAP $\delta$ -defizienten Fibroblasten-Translokon (B) Komposition der Untereinheiten des humanen TRAP-Komplexes nach bioinformatischer Analyse (modifiziert nach Pfeffer, et al., 2017, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Die substratspezifischen Funktionen des TRAP-Komplexes sind bis zu diesem Zeitpunkt weitestgehend ungeklärt. Einige Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass der TRAP-Komplex an der Biogenese von Proteinen beteiligt ist:

Durch Cross-Linking-Experimente erfolgte der Nachweis, dass in das ER-Lumen naszierende Polypeptide in einem späten Stadium der Translokation mit dem TRAP-Komplex in Verbindung stehen (Wiedmann et al., 1989; Conti et al., 2015). Untersuchungen von Nagasawa et al. 2007 sprechen TRAP aufgrund dieser und eigener Beobachtungen eine Beteiligung an der „endoplasmic reticulum associated protein degradation (ERAD)“ zu.

Des Weiteren wurde mit Hilfe von in-vitro Transportstudien beobachtet, dass TRAP den Import in das ER-Lumen von Proteinen fördert, abhängig von der Effizienz der Signalsequenz zum Start der Translokation. Dabei wurde eine inverse Korrelation zwischen TRAP-Abhängigkeit und Sec61-Gating-Effizienz beobachtet (Fons et al., 2003). Schorr (2014) konnte mit Hilfe von live cell calcium imaging in intakten Zellen nachweisen, dass die Depletion des TRAP-Komplexes zum reduzierten Calcium-Ausstrom aus dem ER in das Cytosol führt. Dieser Effekt kam der Depletion des Sec61-Komplexes etwa gleich, was dafür spricht, dass der TRAP-Komplex am Gating des Sec61-Kanals zum offenen Zustand beteiligt ist.

Neuere Untersuchungen in intakten Zellen lassen die Vermutung zu, dass TRAP die Topologie von Transmembranhelices beeinflussen könnten (Sommer et al., 2013).

All diese Hinweise werden durch die strukturellen Aufklärungen mittels CET durch Pfeffer et al., (2017) unterstützt. Gleichzeitig ließ die Interpretation dieser Daten Vermutungen hinsichtlich der Funktion einzelner Untereinheiten zu: So wurde nachgewiesen, dass der TRAP $\alpha/\beta$ -Subkomplex im ER-Lumen in direkter räumlicher Nähe zur Hinge-Region von Sec61 $\alpha$  und somit etwa unter dem Translokationskanal steht. Die Autoren bringen diese Beobachtung in direkte Verbindung zu den Hinweisen, dass TRAP an frühen und späten Stufen des Polypeptidtransports sowie an der Topogenese von Membranproteinen beteiligt ist. So könnte TRAP zunächst durch die Bindung an Sec61 die Konformation des Translokationskanals beeinflussen und weiterführend auch direkt mit der naszierenden Kette interagieren. Auswertungen hinsichtlich TRAP $\gamma$  zeigen, dass diese Untereinheit im TRAP-Komplex des Säugers eine zentrale Position einnimmt und auf cytosolischer Seite mit dem Ribosom, auf luminaler Seite mit anderen Komponenten des Translokons wechselwirken könnte. Aus diesen Daten resultierten Mutmaßungen, dass die TRAP $\gamma$ -Untereinheit an der Assemblierung und Stabilisierung des TRAP-Komplexes maßgeblich beteiligt ist. Dagegen spricht jedoch der Fakt, dass der heterodimere TRAP-Komplex der Pflanzen und Algen, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha\beta$ , zur Bildung eines stabilen Komplexes unter Ribosomenbindung fähig ist. Die Position von TRAP $\delta$  in räumlicher Nähe zum OST-Komplex sowie des CDG-Phänotyps aufgrund der SSR4-Mutation zeigen eine potentielle Beteiligung des TRAP-Komplexes an der N-Glykosylierung von Proteinen (Losfeld et al., 2014; Ng et al., 2015). Des Weiteren wurde durch Wada et al. (1991) gezeigt, dass TRAP $\alpha$  phosphoryliert werden kann und gleichzeitig dazu fähig ist  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Bereich der ER-Membran zu binden. Diese Erkenntnisse lassen Mutmaßungen zu, dass durch diese Modifizierungen sich regulierend auf den Import von Proteinen bzw. auf die Proteinhomeostase im ER-Lumen auswirken.

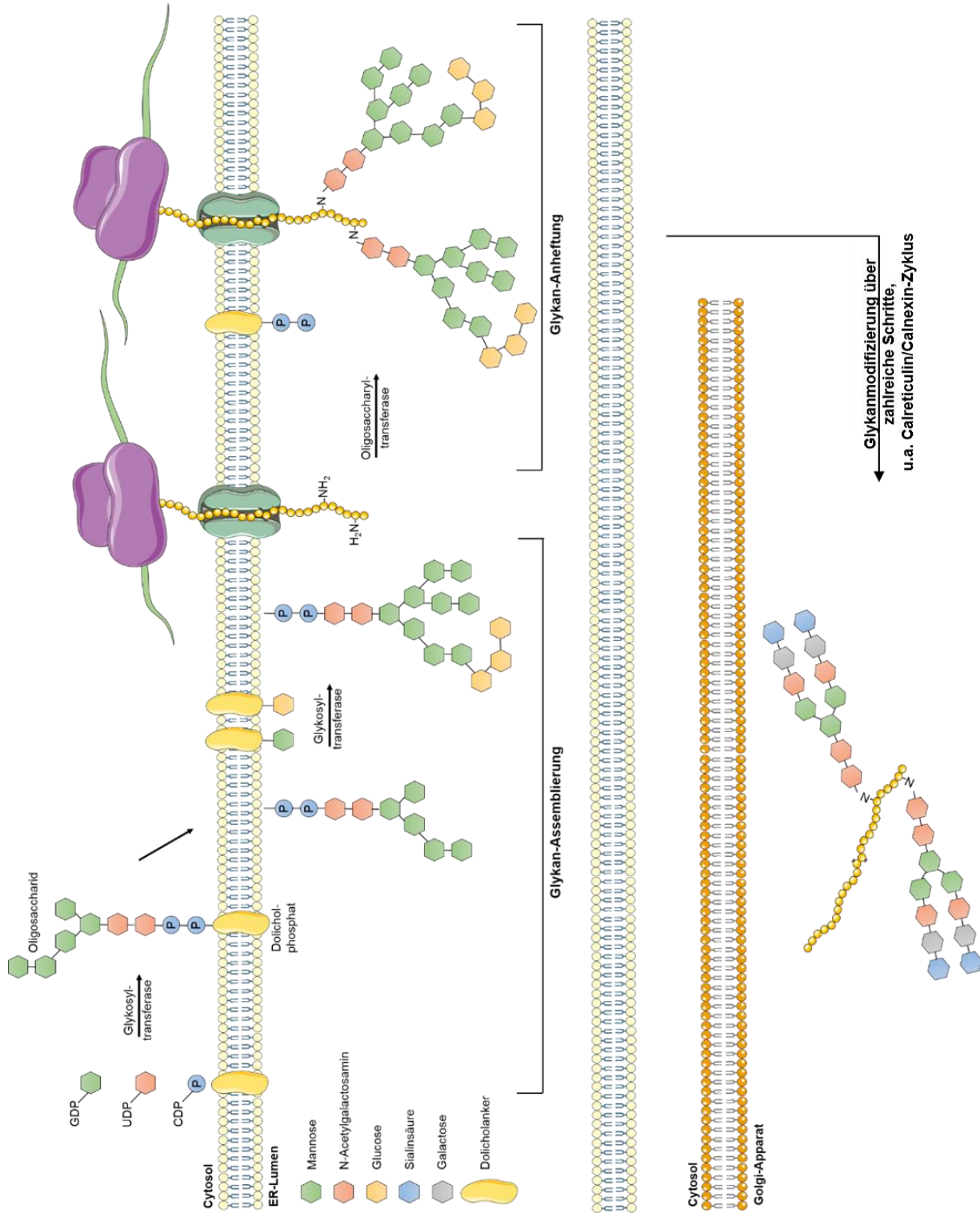
### 1.3.3. Der Oligosaccharyltransferase (OST) Komplex

Der Oligosaccharyltransferase (OST) Komplex ist eine weitere integrale Komponente des Translokons. Der OST-Komplex stellt das zentrale Enzym der N-Glykosylierung von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum dar (Mohorko et al., 2011). OST katalysiert den Transfer von High-Mannose-Oligosacchariden an die in der ER-Lumen naszierende Polypeptidkette innerhalb der Konsensus-Sequenz Asn-X-Thr/Ser (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Ein zusammenfassender Überblick über den Ablauf der N-Glykosylierung von Proteinen in ist Abbildung 8 dargestellt.

CET und Einzelpartikelanalyse („single particle analysis“, SPA) wiesen nach, dass der OST-Komplex in räumlicher Nähe zum Sec61-Komplex positioniert ist. Diese Untersuchungen ergaben Hinweise auf zwei verschiedene Translokon-Populationen, da OST und Sec61 nicht im stöchiometrischen Verhältnis aufzufinden waren (Pfeffer et al., 2014).

Der humane OST-Komplex wurde als Komplex bestehend aus äquimolaren Mengen von sieben Untereinheiten nachgewiesen: STT3, Ribophorin I, Ribophorin II, Ost48, Dad1, Ost4 und N33/TUSC3 oder IAP. STT3 wird im Säuger in zwei paralogen Formen A und B coexprimiert, welche die katalytischen Untereinheiten des OST-Komplexes bilden. (Ruiz-Canada et al., 2009) wiesen beiden Untereinheiten distinkte Funktionen zu. So wurde STT3A primär die Katalyse cotranslationaler Glykosylierung zugesprochen, wohingegen STT3B posttranslational selektiv an solchen unbesetzten Glykosylierungsstellen noch nicht gefalteter Polypeptidketten aktiv wird, welche von STT3A noch nicht bedient wurden. Die Funktionen der anderen Komponenten des OST-Komplexes sind weitestgehend unverstanden. CET Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Interaktion zwischen dem Ost-Komplex und dem Ribosom möglich ist, wahrscheinlich über die „large-subunit rRNA expansion segment 7“ und Ribophorin I (Pfeffer et al., 2014). N33 (TUSC3) und IAP (MagT1) sind Paraloge, reziproke Untereinheiten des humanen OST-Komplexes, welchen Oxidoreduktase-Aktivität zugeschrieben wird (Mohorko et al., 2014). Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurden die Proteine DC2 und KCP2 als akzessorische Komponenten des OST-Komplexes identifiziert (Shibatani et al., 2005).

Mutationen innerhalb der OST-Komplex Untereinheiten STT3A, STT3B, Ost48, N33 und IAP wurden nachgewiesen zu einer Form des Congenitalen Glykosylierungsdefekts zu führen (Shrimal et al., 2013; Garshasbi et al., 2008; Jones et al., 2012).



**Abbildung 8: Überblick über den Mechanismus der N-Glykosylierung von Proteinen**

N-Glykosylierung von Proteinen in Eukaryoten ist ein zweigeteilter Prozess, der im endoplasmatischen Retikulum beginnt. Er umfasst den Aufbau eines Oligosaccharidgerüsts auf einem Dolicholanker, den Transfer an bestimmte Asparaginreste an eine naszierende Polypeptidkette und abschließende Prozessierungsschritte. Die Assemblierung des Oligosaccharidgerüsts erfolgt an der ER-Membran und benötigt die Aktivität spezifischer Glykosyltransferasen. Dieser Prozess beginnt auf cytosolischer Seite und endet im ER-Lumen, wo die Oligosaccharyltransferase rekrutiert wird, zur Übertragung des Oligosaccharids an einen Asparaginrest einer N-X-S/T-Sequenz einer in das ER-Lumen translozierten Polypeptidkette. In folgenden Schritten wird die Glykanstruktur in verschiedenen Stufen, u.a. mit Hilfe des Calnexin/Calreticulin-Zyklus modifiziert. Nach Transport aus dem ER zum Golgi werden die Glykane einem Remodelling-Prozess unterzogen, spezifisch für jedes Protein und Zelltyp, was eine hohe strukturelle Vielfalt von N-verknüpften Glykanen in Eukaryoten mit sich bringt (Aebi, 2013; Helenius & Aebi, 2001; modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**1.3.4. Der Signalpeptidase-Komplex**

Noch vor dem kompletten Import in das ER-Lumen einer Polypeptidkette mit N-terminaler Signalsequenz wird letztere durch den Signalpeptidase-Komplex proteolytisch abgespalten (Blobel & Dobberstein 1975 I). Strukturell wird der Komplex aus fünf Untereinheiten gebildet und anhand der jeweiligen molekularen Masse benannt: SPC-12, SPC-18, SPC-21, SPC-22/23 und SPC-25. Das katalytische Zentrum wird wahrscheinlich von den Untereinheiten SPC-12 und SPC-18 gebildet (Evans et al., 1986; Dalbey et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SPC-25 direkt mit Sec61 $\beta$  der Translokase interagiert. In Anwesenheit von Ribosomen wurde diese Interaktion stimuliert, was dafür spricht, dass der SPC-Komplex zu aktivierten Translokasen rekrutiert wird (Kalies et al., 1998). Die Abspaltung des Signalpeptids vom Pre-Protein erfolgt normalerweise nach der -1 -3 Regel (von Heijne, 1983). Misslingt die Abspaltung des Signalpeptids, kann es zu Fehlfaltungen des Proteins und somit zu Störungen der Proteostase kommen (Liu et al., 2012).

**1.3.5. Chaperone und Co-Chaperone**

Molekulare Chaperone und Co-Chaperone sind an allen Schritten der ER-assoziierten Proteinbiogenese beteiligt: Transport der Polypeptide in das ER, anschließende Faltung und Assemblierung im ER-Lumen und Export fehlgefalteter Proteine aus dem ER gefolgt von deren proteasomalem Abbau (ERAD) (Buck et al., 2007; Plemper et al., 1997). Bei Störungen dieses Gleichgewichts wird die „unfolded protein response“ (UPR) aktiviert, ein Prozess in welchen Chaperone ebenfalls involviert sind (Ma & Hendershot, 2001) (1.5)

Viele dieser molekularer Chaperone lassen sich klassischerweise der Familie sogenannter „heat shock proteins“ (Hsp) zuordnen, Hsp40, Hsp70 und Hsp90. Des Weiteren finden sich jedoch auch solche Chaperone oder Lektine, welche an der Faltung von Glykoproteinen beteiligt sind.

Vertreter dieser Klasse sind das ER-luminale Lektin Calreticulin und das ER-Membranprotein Calnexin (Burns et al., 1992; Degen & Williams, 1991). An der Entstehung von Disulfidbindungen sind Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) beteiligt, an Isomerisierung Prolinhaltiger Peptidbindungen Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen) (Meunier et al., 2002). Eine wichtige Rolle nimmt das ER-luminale Hsp70-Chaperon BiP ein, daher ist es sowohl in die Biogenese von Proteinen als auch in die Calcium-Homöostase involviert (Haas & Wabl, 1983; Bole et al., 1986).

### **1.3.5.1. Das Hsp70-Chaperon BiP und der ATPase Zyklus**

Das ER-luminale Hsp70-Chaperon BiP, abgeleitet von „immunoglobulin heavy-chain binding protein“, erfüllt eine Reihe von Funktionen und unterliegt daher der Regulation unterschiedlicher Konditionen der Zelle. Unter ER-Stress Bedingungen ist die Abundanz von BiP stark erhöht und ist für seine Aktivität von ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  und Interaktionsproteinen abhängig (Haas & Wabl, 1983; Otero et al., 2010).

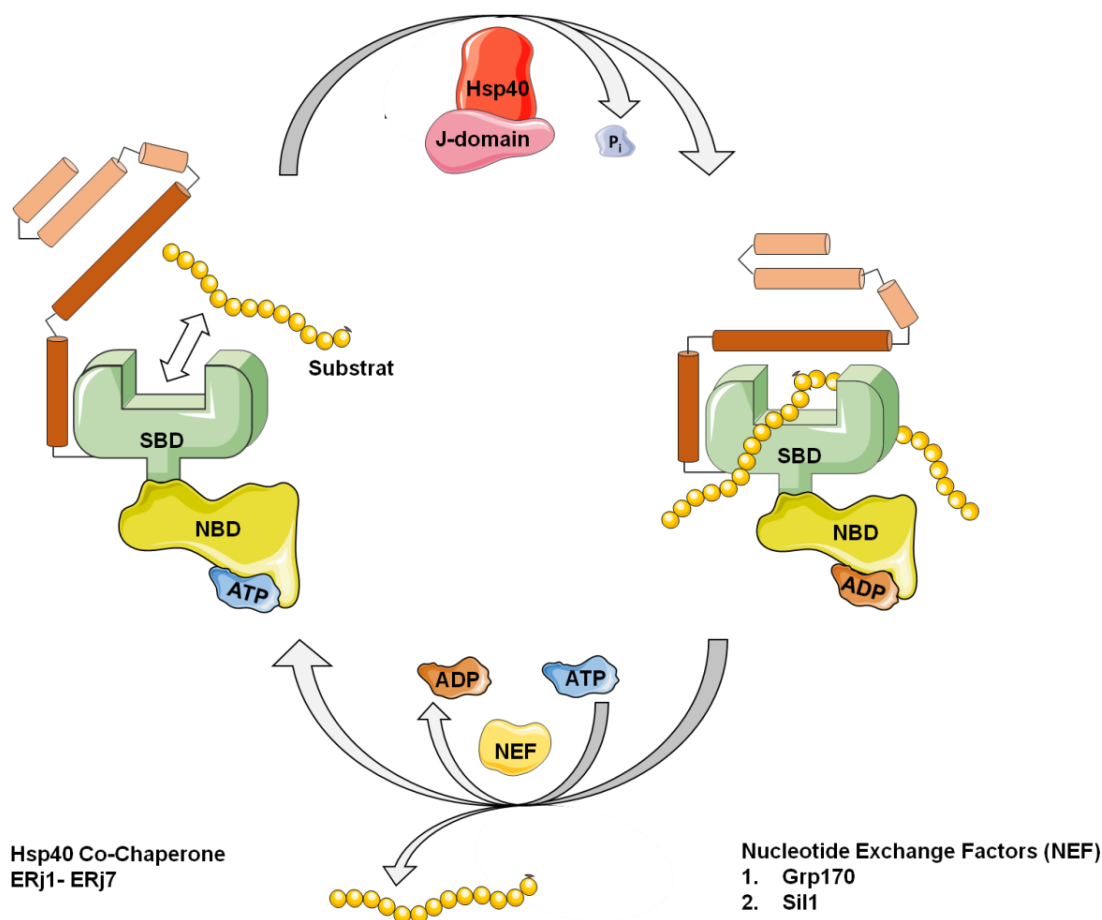
Hsp70-Chaperone binden reversibel Polypeptidsubstrate, d.h. hydrophobe Oligopeptide innerhalb unvollständig- oder fehlgefalteter Polypeptide, um unerwünschte andere Interaktion zu unterbinden und deren korrekte Faltung in eine native Konformation zu fördern (Blond-Elguindi, et al., 1993). Im Zuge dessen ist die Interaktionsfähigkeit von BiP mit andere Chaperonen (Grp94, Calnexin, Calreticulin) und Faltungskatalysatoren (PPIasen & PDIs) zu nennen (Tatu & Helenius, 1997; Meunier et al., 2002). Darüber hinaus bindet BiP auch korrekte gefaltete Proteine, um regulierend auf diese einzuwirken, wie z.B. Sec61 $\alpha$ .

Die Fähigkeit des Hsp70 Chaperons BiP Substrate zu binden und wieder freizugeben wird maßgeblich durch Interaktionen mit Hsp40-Co-Chaperonen und Nukleotidaustauschfaktoren („nucleotid exchange factors“, NEF) im Zuge eines Hsp70-ATPase-Zyklus reguliert (Abbildung 9) (Kampinga & Craig, 2010). BiP lässt sich strukturell in zwei Domänen unterteilen, eine Nukleotidbindedomäne (NDB) und einer Substratbindedomäne (SBD), wobei sich letztere in SBD $\alpha$  („Substrattasche“) und SBD $\beta$  („Deckel“) gliedert. Im ATP-gebundenen Zustand der NBD liegt die Substratbindedomäne in einer geöffneten Konfiguration mit hoher Affinität aber schwacher Bindungsstabilität für hydrophobe Regionen ihrer Substrate vor (Kassenbrock & Kelly, 1989; Flynn et al., 1989).

Durch die Interaktion zwischen NBD und der J-Domäne eines Hsp40 Co-Chaperons wird die Hydrolyse von ATP zu ADP eingeleitet und BiP erfährt über die Linkerregion zwischen NBD und SBD eine Konformationsänderung vom geöffneten zum geschlossenen Zustand der SBD (Yang et al., 2015; Wisniewska et al., 2010).

Substrate sind in dieser Konformation stabil zwischen „Substrattasche“ und „Deckel“ gebunden. Durch den Austausch von ADP gegen ATP wird die Konformationsänderung von BiP wieder umgekehrt (Woo et al., 2009; Swain et al., 2007). Dadurch wird das Substrat, klassischerweise neusynthetisierte oder fehlgefaltete Polypeptide, freigelassen und somit zur weiteren Faltung zur Verfügung gestellt, der Zyklus kann erneut beginnen. Co-Faktoren, die den Austausch der von ADP gegen ATP katalysieren sind sogenannte Nukleotidaustauschfaktoren (NEF). Im Säuger wurden Sil1 und Grp170 als NEFs identifiziert (Chung et al., 2002; Lin et al., 1993). Im Säuger sind aktuell sieben Hsp40 Co-Chaperone mit J-Domäne identifiziert (ERj1-ERj7) (Otero et al., 2010; Zahedi et al., 2009). Diese J-Domänen umfassen strukturell jeweils vier alpha-Helices und weisen ein Tripeptidmotiv der Aminosäureabfolge Histidin-Prolin-Aspartat, ein HPD-Motiv, auf. Das HPD-Motiv wird sowohl für die ATP-abhängige Interaktion mit dem Hsp70-Chaperon als auch die Stimulation der ATPase Aktivität benötigt (Suh et al., 1998; Qian et al., 1996; Cheetham & Caplan, 1998).



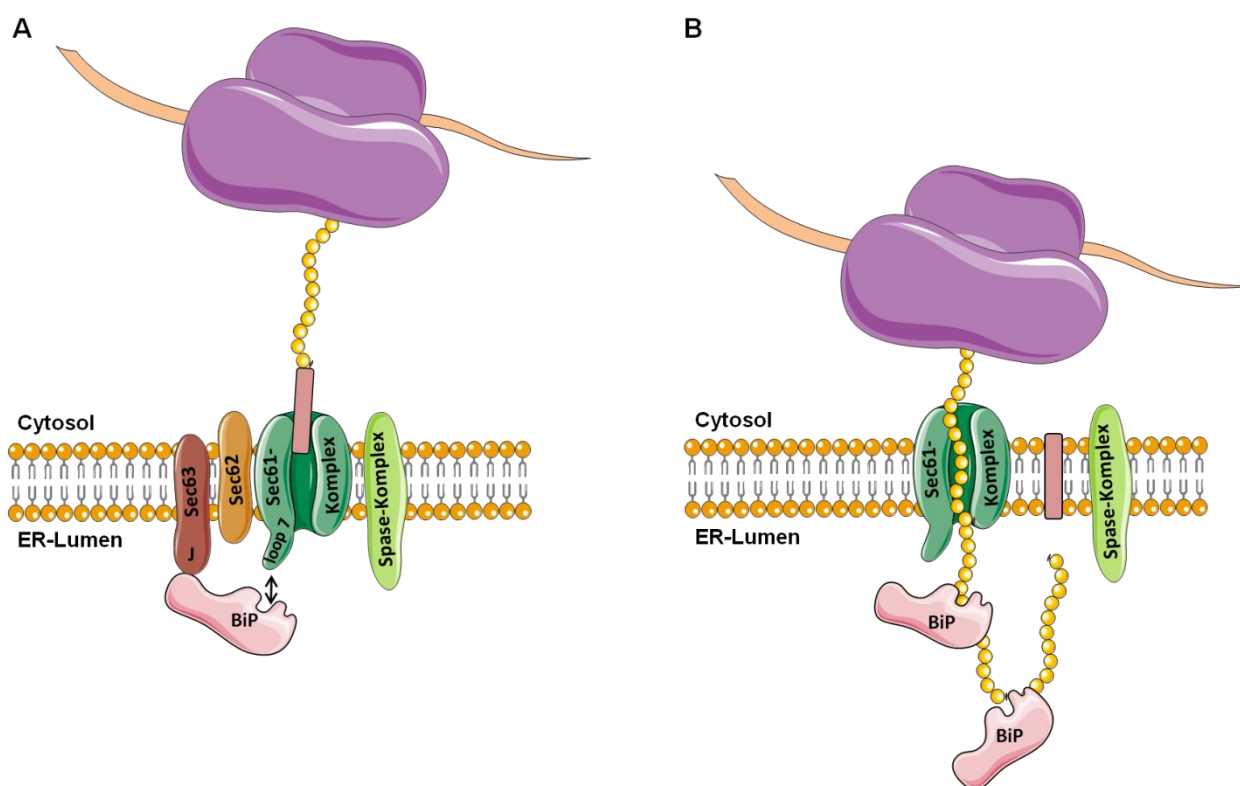


**Abbildung 9: Der ATPase-Zyklus des Hsp70-Chaperons BiP**

Die Fähigkeit des Hsp70 Chaperons BiP Substrate zu binden und wieder freizugeben wird maßgeblich durch Interaktionen mit Hsp40-Co-Chaperonen und Nucleotidaustauschfaktoren („nucleotid exchange factors“, NEF) im Zuge eines Hsp70-ATPase-Zyklus reguliert. BiP lässt sich strukturell in zwei Domänen unterteilen, eine Nucleotidbindedomäne (NBD) und einer Substratbindedomäne (SBD), wobei sich letztere in SBD $\alpha$  („Substrattasche“) und SBD $\beta$  („Deckel“) gliedert. Im ATP-gebundenen Zustand der Nucleotidbindedomäne liegt die Substratbindedomäne in einer geöffneten Konfiguration mit hoher Affinität aber schwacher Bindungsstabilität für hydrophobe Regionen ihrer Substrate vor. Durch die Interaktion zwischen NBD und der J-Domäne eines Hsp40 Co-Chaperons wird die Hydrolyse von ATP zu ADP eingeleitet und BiP erfährt über die Linkerregion zwischen NBD und SBD eine Konformationsänderung vom geöffneten zum geschlossenen Zustand der SBD. Substrate sind in dieser Konformation stabil zwischen „Substrattasche“ und „Deckel“ gebunden. Durch den Austausch von ADP gegen ATP wird die Konformationsänderung von BiP wieder umgekehrt. Dadurch wird das Substrat, klassischerweise neusynthetisierte oder fehlgefaltete Polypeptide, freigelassen und somit zur weiteren Faltung zur Verfügung gestellt, der Zyklus kann erneut beginnen. Co-Faktoren, die den Austausch der von ADP gegen ATP katalysieren sind sogenannte Nucleotidaustauschfaktoren (NEF). Im Säuger wurden Sil1 und Grp170 als NEFs und sieben Hsp40 Co-Chaperone mit J-Domäne identifiziert (ERj1-ERj7) (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Durch die Interaktion mit Sec61 $\alpha$  ist BiP in die Öffnung der Translokationspore, vorbereitend zur Insertion des Vorläuferpolypeptids in den Translokationskanal involviert. Experimentell wurde dabei die Interaktion zwischen BiP und dem Loop 7 (YY-Motiv) von Sec61 $\alpha$  nachgewiesen. Studien zeigten außerdem, dass das ER-membranständige Co-Chaperon ERj2 (Sec63) BiP sowohl in räumliche Nähe zur Translokationspore als auch der naszierenden Polypeptidkette bringt (Brodsky et al., 1995; Lang et al., 2012).

Denn BiP fungiert auch in direkter Art und Weise unterstützend beim Import naszierender Polypeptidketten. Diese werden von BiP gleichzeitig zur fortschreitenden Translokation repetitiv gebunden, sodass ein unidirektional gerichteter Import in das ER-Lumen gewährleistet und ein Zurückgleiten in das Cytosol unterbunden wird. BiP wird an dieser Stelle als sogenannte „molekulare Ratsche“ zur Ausführung der vollständigen Translokation der naszierenden Polypeptidkette genannt (Abbildung 10). Nach erfolgreichem Transport der gesamten Kette wird gebundenes BiP unter Wirkung der Nukleotidaustauschfaktoren vom Substrat entfernt (Tyedmers et al., 2003). Zu beachten ist jedoch, dass BiP nicht an jedem Translokationsprozess beteiligt ist, sondern in substratspezifischer Art und Weise reguliert wird (Hegde & Kang, 2008).



**Abbildung 10: Funktionen des Hsp70-Chaperons BiP während des Polypeptidimports**

**(A)** Durch die Interaktion mit Sec61 $\alpha$  ist BiP in die Öffnung der Translokationspore, vorbereitend zur Insertion des Vorläuferpolypeptids in den Translokationskanal involviert. Studien zeigten, dass das ER-membranständige Co-Chaperon ERj2 (Sec63) BiP sowohl in räumliche Nähe zur Translokationspore als auch der naszierenden Polypeptidkette. **(B)** BiP fungiert auch in direkter Art und Weise unterstützend beim Import naszierender Polypeptidketten. Diese werden von BiP gleichzeitig zur fortschreitenden Translokation repetitiv gebunden, sodass ein unidirektional gerichteter Import in das ER-Lumen gewährleistet und ein Zurückgleiten in das Cytosol unterbunden wird. BiP wird an dieser Stelle als sogenannte „molekulare Ratsche“ zur Ausführung der vollständigen Translokation der naszierenden Polypeptidkette genannt (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Des Weiteren kommt BiP und den Co-Chaperonen eine wichtige Rolle in Bezug auf Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase zu. Unter physiologischen Bedingungen sind diese Komponenten daran beteiligt den passiven Calcium-Efflux durch den Sec61-Komplex zu beschränken. Diese Funktion geht mit der Fähigkeit von BiP einher, mit Sec61 $\alpha$  zu interagieren, und dadurch den Translokationskanal nach erfolgreicher Translokation auch wieder zu verschließen (Schäuble et al., 2012). Schorr (2015) wies in diesem Zusammenhang die beiden Hsp40 Co-Chaperone ERj3 und ERj6 als BiP-Interaktionspartner zur Konformationsregulation des Translokationskanals nach. BiP selbst ist darüber hinaus ein Ca<sup>2+</sup>-bindendes Protein, das etwa 25 % des gesamten ER-luminalen Calciums zu puffern vermag. Gleichzeitig wird die ATPase-Aktivität von BiP durch Calcium reguliert (Lièvrement et al., 1997; Lamb et al., 2006; Klein et al., 2018).

Im Falle akkumulierter, fehlgefalteter Proteine, z.B. durch Störung der Calcium- oder Glucose-Homöostase, kann ER-Stress ausgelöst werden. BiP wurde durch die Bindung fehlgefalteter Proteine als Teil der ER-Qualitätskontrolle und des ERAD-Prozesses nachgewiesen. Ferner ist BiP Hauptregulator der resultierenden „unfolded protein response (UPR)“ (1.5). Die Co-Chaperone ERj3-ERj5 werden im Zuge des ERAD-Prozesses und der UPR in der Literatur genannt, was die direkte Involvierung von BiP in diese Mechanismen bestätigt (Ellgaard & Helenius, 2003; Jin et al., 2008; Dong et al., 2008).

#### **1.3.5.2. Calreticulin und Calnexin**

Calreticulin ist ein ER-luminales Ca<sup>2+</sup>- und Glykan-bindendes Protein sowie molekulares Chaperon. Gemeinsam mit Calnexin und ERp57 ist es im Calreticulin/Calnexin-Zyklus an der Faltung und Qualitätskontrolle naszierender Proteine beteiligt (Hebert & Molinari, 2007). Das Typ I Membranprotein Calnexin und sein ER-luminales Paralog Calreticulin verfügen über eine ähnliche Grundorganisation. Beide verfügen über ein N-terminales Signalpeptid, eine Lektin-Bindedomäne, eine Prolin-reiche Domäne vor der C-terminalen Domäne (Schrag et al., 2001). Beide Proteine unterdrücken effizient ungewollte Aggregation glykosylierter aber auch nicht-glykosylierter Proteine (Hebert & Molinari, 2007). Calcium ist wichtig für die Stabilität der Lektin-Chaperone und die Regulierung der Substratbindungseigenschaften durch induzierte Konformationsänderung. Für Calnexin wurde eine hohe Bindungsaffinität bei gleichzeitig geringerer Bindungskapazität von Ca<sup>2+</sup>-Ionen innerhalb der Lektin-Bindedomäne nachgewiesen. Calreticulin dagegen zeigt eine geringe Affinität, aber eine hohe Kapazität zur Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Schrag et al., 2001; Conte et al., 2007).

ATP scheint ebenfalls die Konformation der beiden Lektin-Chaperone zu beeinflussen, da sie in Anwesenheit höherer ATP-Konzentrationen eine kompaktere Konformation einnehmen, was sie resistenter gegen Proteasen macht (Ou et al., 1995; Wijeyesakere et al., 2015). Calreticulin wird aufgrund der  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernden Eigenschaften als wichtiger Regulator der Calciumhomöostase im ER angesehen.

#### 1.4. Calcium Homöostase im ER

Die Calcium Homöostase ist von zentralem Interesse für die Zelle, was die Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als Regulator einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie z.B. Metabolismus, (De-) Phosphorylierung von Proteinen, Zellproliferation und –differenzierung widerspiegelt (Berridge et al., 2003). Um die Calciumhomöostase aufrechtzuerhalten, muss der Ionenfluss in und aus Zellen sowie Organellen genau reguliert werden. An der Erhaltung der Calcium-Homöostase sind zahlreiche  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Proteine,  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter, -Kanäle, sowie -Pumpen beteiligt. Das ER stellt den zentralen Calciumspeicher der Zelle dar (100  $\mu\text{M}$  – 2 mM). Maßgeblich sind daran  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende/-puffernde Proteine beteiligt, wie z.B. PDI, Grp94, BiP und Calreticulin, wobei letztere gemeinsam etwa 75 % des gesamten Calcium im ER binden (Nakamura, et al., 2001; Halperin et al., 2014; Lièvreumont et al., 1997). Der natürliche Konzentrationsgradient zwischen ER und Cytosol erklärt, weshalb auch ohne physiologische Stimulation ein passiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux durch die ER-Leak-Kanäle (z.B. Sec61 und Preseniline) zustande kommt (Lang, et al., 2011; Tu et al., 2006). Zum Ausgleich wird kontinuierlich  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Sarcoplasmatische-ER-ATPase (SERCA) zurück in das ER-Lumen gepumpt, um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten aufrecht zu erhalten. Darüber hinaus erfolgt auch der Austausch von Calcium über Lipid- und Proteinbrücken zwischen dem ER und Mitochondrien (Mitochondrien-assoziierte ER-Membran, MAM) sowie dem ER und der Plasmamembran/Extrazellularraum („store-operated calcium entry“, SOCE) (Rieusset, 2018; Putney et al., 2017). Kurzzeitige Änderungen der Calciumhomöostase aktivieren Qualitätskontrollmechanismen im ER (ERAD & UPR), an welchen o.g.  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernde Chaperone direkt beteiligt sind (Michalak et al. 2002). Längerfristige Änderungen des Gleichgewichts können zum Zelltod sowie einhergehend zu schweren Krankheiten führen (Nicotera & Orrenius, 1998; Wang & Kaufman, 2012).

## 1.5. Qualitätskontrolle im ER

### 1.5.1. Die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD)

Manche Proteine können nach der Translokation in das ER spontan ihre native Konformation annehmen. Andere Proteine sind auf die Unterstützung verschiedener Faltungsenzyme angewiesen. Die Faltung von Polypeptiden ist recht fehleranfällig und führt häufig zur falschen Konformation der Proteine. Darüber hinaus führen auch Mutation des Substrats, Zellstress oder ein Ungleichgewicht in der Faltungsmaschinerie zu Fehlfaltungen der Proteine. So verfügt das ER über ein Protein-Qualitätskontroll-System, wodurch unreife Proteine erkannt werden und erneute Faltungsversuche hin zur Ausbildung der nativen Struktur des Substrats erfolgen. Gleichzeitig erkennt das System solche Proteine, die ihre korrekte Konformation nicht erreichen können und beginnt zur Entlastung des gesamten Systems mit deren Entfernung aus dem ER gefolgt vom proteasomalen Abbau (Bagola et al., 2011). Erste Hinweise zur Existenz der ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) gaben Studien von Lippincott-Schwartz et al. (1988).

Molekulare Chaperone, wie z.B. BiP und Grp94, und Lektine interagieren im ER-Lumen mit fehlgefalteten oder falsch assemblierten Proteinen (Otero et al., 2010). Dies führt dazu, dass die Substrate zu ER-membranständigen E3-Ligasen und durch einen Retrotranslokationskanal ins Cytosol geleitet werden. Der genaue Mechanismus ist für den Säuger nicht vollständig aufgeklärt. Cryo-EM-Untersuchungen charakterisierten Hrd1 in *S. cerevisiae* als den Retrotranslokationskanal für ERAD-Substrate (Schoebel et al., 2017). Wegen der Homologie zum Hefeortholog wurde die E3-Ligase Hrd1 vorgeschlagen eine Retrotranslokationspore zu bilden und durch den Co-Faktor Sel1 stabilisiert zu werden (Christianson et al., 2008; Carvalho et al., 2010; Olzmann et al., 2013; Jeong et al., 2016). Sel1 vermittelt dabei den Transfer von Lektin-gebundenen, fehlgefalteten Glykoproteinen zu Hrd1. Es wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass die verminderte Expression von Sel1 zu Beeinträchtigung des Abbaus von ERAD-Substraten führt (Christianson et al., 2012). Außerdem wurden aufgrund der nachgewiesenen Assoziation mit ERAD-Substraten der Sec61-Kanal sowie die Derlin-Familie (Derlin1-3) als Dislokationskanäle vorgeschlagen (Scott & Schekman, 2008; Lilley & Ploegh, 2004). Retrotranslozierte Substrate werden mit Hilfe von E3-Ubiquitin Ligasen polyubiquitiniert und so für die Bindung der ATPase p97 vorbereitet. Diese unterstützt zum einen die weitere Retrotranslokation, zum anderen den Transport zum Proteasom, wo die Polypeptide deubiquitiniert und schlussendlich in der proteolytisch aktiven 20S-Kernuntereinheit degradiert werden (Vembar & Brodsky, 2008).

Die Bedeutung dieses Qualitätskontroll-Systems ist durch eine Vielzahl an Krankheiten belegt, welche mit fehlgefalteten Proteinen des sekretorischen Wegs in Verbindung gebracht wurden (Guerriero & Brodsky, 2012).

### 1.5.2. Die „unfolded protein response“ (UPR)

Als „unfolded protein response“ (UPR) wird die komplexe Signaltransduktion und die Antwort auf den Zellstress angesehen, der v.a. durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER ausgelöst wird (Krebs et al., 2011). Dieser komplizierte Mechanismus agiert zielgerichtet zur Wiederherstellung der ER-Homöostase. Die Aktivierung der UPR führt zunächst zur transkriptionellen Regulation von UPR-Zielgenen, Abschwächung der Translation sowie Aktivierung des ERAD-Prozesses. Wenn die ER-Homöostase jedoch nicht wiederhergestellt werden kann, wird der kontrollierte Zelltod eingeleitet (Walter & Ron, 2011). An der Initiation der UPR sind drei integrale ER-Membranproteine maßgeblich beteiligt: 1. „PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)“, 2. „Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)“ und 3. „Activating transcription factor 6 (ATF6)“. Diese Proteine werden unter Normalbedingungen vom Hsp70-Chaperon BiP gebunden und in einem inaktiven Zustand gehalten (Bertolotti et al., 2000). Im Falle von ER-Stress wird BiP zu fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen rekrutiert, wodurch zunächst die Bindung zu den drei UPR-Regulatoren gekappt wird, und diese dadurch in den aktiven Zustand übergehen (Hetz, 2012). Aus der Dimerisierung und Autophosphorylierung der Serin/Threonin Kinase PERK folgt die Phosphorylierung des „eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )“, was die Inhibierung von Translationsprozessen nach sich zieht (Harding et al., 2000). Aktiviertes IRE1 induziert dessen Oligomerisierung und das Splicing des „X-box binding protein 1 (XBP1)“, einem Transkriptionsfaktor, der induzierend auf am ERAD-Prozess beteiligte Proteine wirkt (Lee et al., 2003; Martinon & Glimcher, 2011). Nach der Dissoziation des BiP/ATF6-Komplexes, wird ATF6 zum Golgi transportiert, wo dessen Spaltung zur Erzeugung der aktiven ATF6-Form führt. Durch dessen Bindung der jeweiligen Promotoren im Zellkern, wird die transkriptionelle Aktivierung ER-Stress assoziierter Gene wie z.B. *HSPA5*, *XBP1* und *CHOP* induziert (Chen et al., 2002; Yoshida et al., 2001). Bei andauerndem ER-Stress wird die Konzentration des zentralen Mediators der ER-Stress-induzierten Apoptose, „CCAAT/enhancer-binding homologous protein (CHOP)“, stark erhöht (Kim et al., 2006; Rao et al., 2004). Abweichungen im Prozess der UPR wurden mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, z.B. neurologische Störungen, Diabetes und entzündliche Erkrankungen (Wang & Kaufman, 2012).

Schäuble (2013) demonstrierte durch seine Ergebnisse hinsichtlich der siRNA vermittelten Depletion von BiP, dass die Transfektion von HeLa-Zellen mit BiP-siRNA für 72 h ohne Sekundäreffekte tolerierbar und eine Reduktion der Menge an BiP auf etwa 25 % Restproteingehalt möglich ist. Ab einer Transfektionsdauer von 96 h erfolgte der Nachweis der UPR-Induktion u.a. durch wieder steigende Konzentrationen des Chaperons BiP.

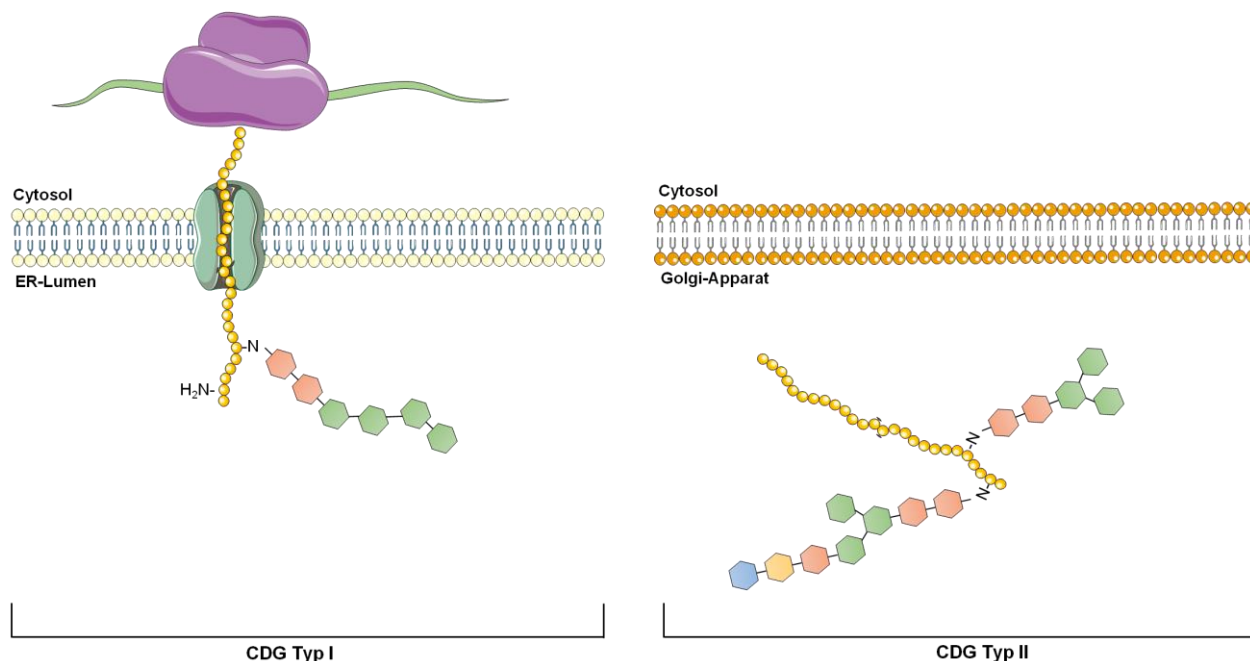
## 1.6. Congenitale Glykosylierungskrankheiten

Glykosylierung meint die Anheftung von Zuckergerüsten (Glykanen) an Proteine oder Lipide. Diese Modifikation zählt zu den häufigsten Modifikationen von sezernierten aber auch Membranproteinen. Eine Störung dieser Modifizierung führt zu einem congenitalen (genetische) Glykosylierungsdefekt („congenital disorder of glycosylation“ - CDG), zum ersten Mal klinisch 1980 beschrieben (Jaeken et al., 1980; Freeze, 2006)

Aktuell wird anhand der Art des CDG-Defekts folgende Klassifizierung vorgenommen (Jaeken et al., 2009):

- Defekt der N-Glykosylierung von Proteinen
- Defekt der O-Glykosylierung von Proteinen
- Defekt im Aufbau von Glycosphingolipiden und in der Glykosylierung von GPI Ankern
- Defekte in verschiedenen Glykosylierungsarten und anderen Biosynthesen

Die Diagnose einer solchen meist autosomal-rezessiv vererbten Hypoglykosylierung erfolgt über die Untersuchung mittels Isoelektrischer Fokussierung hinsichtlich Veränderungen im Glykosylierungsmuster des Apolipoproteins (O-Glykosylierung) und Serum-Transferrins (N-Glykosylierung). Letztere ist aktuell der erste Standarduntersuchung, soll jedoch durch Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ersetzt werden, um effizientere Ergebnisse zu erzielen. Weiterführende Tests umfassen die enzymatische Aktivitätsmessung der Phosphomannomutase 2 (PMM2) und der Phosphomannose Isomerase (MPI) aus Fibroblasten, chromatographischen Analysen metabolisch-markierter Dolichol-gebundener Oligosaccharide („dolichol-linked oligosaccharid“ – LLO) und Exomsequenzierung. Letztere ist vor allem zur Identifizierung unbekannter CDG-Typen sowie neuer CDG-Gene unerlässlich (Jaeken, 2010; Jaeken & Péanne, 2017). Des Weiteren findet sich in der Literatur die klassische Einteilung nach CDG-Typ I und Typ II (Abbildung 11). Typ I beschreibt alle CDG-Arten, die auf einer gestörten Synthese des Lipid-verknüpften Oligosaccharid-Vorläufers oder dessen Übertragung auf das Protein beruhen. CDG-Typ II geht auf Fehlfunktionen in der Prozessierung der Protein-gebundenen Oligosaccharidkette zurück (Freeze, 2007).



**Abbildung 11: Unterscheidung CDG Typ I und Typ II**

Klassischerweise erfolgte die Einteilung der CDG nach Typ I und Typ II. Typ I beschreibt alle CDG-Arten, die auf einer gestörten Synthese des Lipid-verknüpften Oligosaccharid-Vorläufers oder dessen Übertragung auf das Protein beruhen. CDG-Typ II geht auf Fehlfunktionen in der Prozessierung der Protein-gebundenen Oligosaccharidkette zurück (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Diese rückt jedoch mehr und mehr in den Hintergrund, da diese Nomenklatur auf dem Transferrinmuster nach Isoelektrischer Fokussierung und damit nur auf Defekten hinsichtlich fehlerhafter N-Glykosylierung basiert. Mit der Identifizierung weiterer CDG-Typen, welche nicht direkt durch CDG-Typ I oder Typ II erklärt werden können, wird diese Art der Nomenklatur im Laufe der Zeit unzureichend. Aus diesem Grund wurde eine überarbeitete Nomenklatur vorgeschlagen, die jede CDG transparent bezeichnet (Jaeken et al., 2009).

Symptomatisch betrifft eine angeborene Glykosylierungskrankheit nahezu alle Organe und führt zu schwerwiegenden neurologischen Defekten. Fast immer zeigen die Patienten körperliche und mentale Entwicklungsstörungen, Sehstörungen, Beeinträchtigungen der Leber, Gastrointestinale Störungen. Bis dato sind über 100 unterschiedliche CDG beschrieben. Hauptsächlich sind davon Komponenten des ER und Golgi betroffen (Ng et al., 2015; Jaeken & Péanne, 2017).

ER-assoziierte CDG wurden betreffend einiger Untereinheiten des OST-Komplexes und des TRAP-Komplexes nachgewiesen: STT3A und STT3B (Shrimal et al., 2013), TUSC3 (Garshasbi, et al., 2008), Ost48 (Jones, et al., 2012) sowie SSR3 (nicht publiziert) und SSR4.

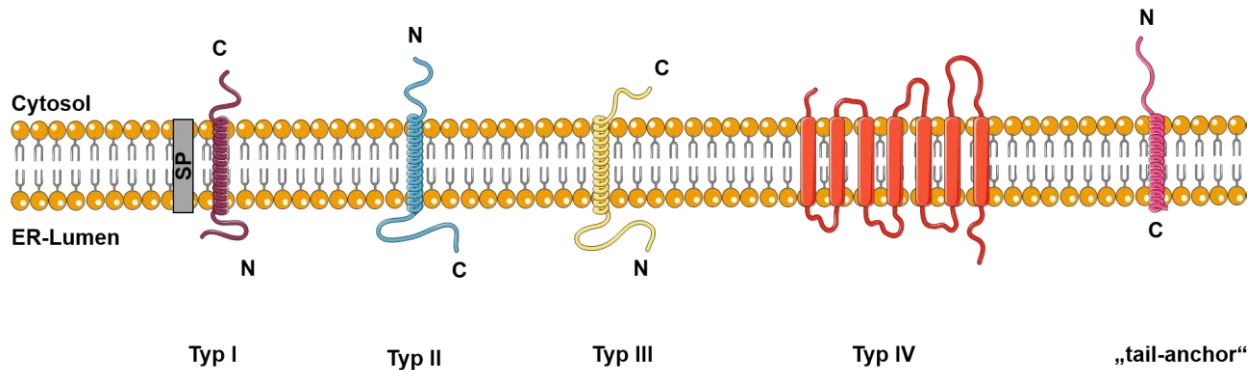


Innerhalb dieser Arbeit wurden von der AG Freeze Fibroblasten eines SSR3-CDG-Patienten und zweier SSR4-CDG-Patienten (405 & 406) zur Verfügung gestellt.

Hinsichtlich des SSR4-CDG-Typs sind Studien zu Untersuchungen mehrerer CDG-Patienten publiziert. Durch jeweils unterschiedliche Mutationen im X-chromosomalen SSR4-Gen wurde der Defekt der N-Glykosylierung ausgelöst. Gleichzeitig erfolgte der Nachweis, dass diese Mutation zur Destabilisierung des gesamten TRAP-Komplexes führt (Losfeld et al., 2014; Ng et al., 2015). Aktuell wird lediglich für wenige Glykosylierungskrankheiten eine Behandlung beschrieben. Diese umfasst je nach Typ die z.B. die orale Applikation von Monosacchariden, Butyrate, oder Cholinesterase-Inhibitoren, zur Milderung spezifischer CDG-Symptome (Péanne et al., 2017; Jaeken, 2010)

### **1.7. Biogenese von ER-Membranproteinen**

Neben der Translokation sekretorischer oder ER-luminaler Proteine durch den Sec61-Kanal, wird durch den Sec61-Komplex auch der Einbau von Transmembranhelices in die hydrophobe Umgebung der ER-Lipiddoppelschicht ermöglicht (Nyathi et al., 2013). Gemäß Abbildung 12 werden folgende Typen integraler Transmembranproteine unterschieden: Die Typen I, II und III zeichnen sich durch jeweils eine Transmembrandomäne aus. Typ I besitzt am N-Terminus eine Signalsequenz, die nach erfolgreicher Translokation proteolytisch durch den Signalpeptidase-Komplex abgespalten wird. Typ II und Typ III haben keine solche abspaltbare Signalsequenz, jedoch weisen eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Nähe des N-Terminus auf, die kodierend dafür ist, das Protein zum ER zu transportieren. Der Insertionsmodus entscheidet weitergehend über die Orientierung des N-Terminus und somit über die Unterscheidung zwischen Typ II und Typ III Membranprotein. Unter Typ IV versteht man im Allgemeinen alle polytopen Membranproteine, ungeachtet der Anzahl an Transmembrandomänen und Orientierung. Der C-Terminus der sogenannten „Tail-anchor“-Proteine bildet die kodierende Sequenz zum Transport zur ER-Membran und gleichzeitig die hydrophobe Sequenz, die als Ankerdomäne zur Integration des Proteins in die ER-Membran dient.



**Abbildung 12: Strukturelle Einteilung integraler Membranproteine**

Die Typen I, II und III zeichnen sich durch jeweils eine Transmembrandomäne aus. Typ I besitzt am N-Terminus eine Signalsequenz, die nach erfolgreicher Translokation proteolytisch durch den Signalpeptidase-Komplex abgespalten wird. Typ II und Typ III weisen eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Nähe des N-Terminus auf, die kodierend dafür ist, das Protein zum ER zu transportieren. Der Insertionsmodus entscheidet weitergehend über die Orientierung des N-Terminus und somit über die Unterscheidung zwischen Typ II und Typ III Membranprotein. Unter Typ IV versteht man im Allgemeinen alle polytopen Membranproteine, ungeachtet der Anzahl an Transmembrandomänen und Orientierung. Der C-Terminus der sogenannten „tail-anchor“-Proteine bildet die kodierende Sequenz zum Transport zur ER-Membran und gleichzeitig die hydrophobe Sequenz, die als Ankerdomäne zur Integration des Proteins in die ER-Membran dient (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Während der Biogenese von integralen Membranproteinen bilden hydrophobe Transmembransegmente noch im ribosomalen Tunnel alpha-helikale Strukturen aus (Woolhead et al., 2004). Während der Translokation solcher Transmembranhelices wird der Prozess unterbrochen, um die Integration der Transmembranhelix in die Lipiddoppelschicht zu ermöglichen. Die Integration beispielsweise eines Membranproteins Typ III ähnelt der Translokation eines sekretorischen Proteins. Die Transmembranhelix interkaliert dabei mit den Transmembrandomänen TM2b und TM7, die das laterale Gate der Sec61 $\alpha$ -Translokationspore bilden. In Folge dessen tritt die Transmembranhelix aus dem Translokon aus und wird in die ER-Membran integriert. Darüber hinaus sind die thermodynamischen Eigenschaften einer Transmembranhelix wichtige Faktoren hinsichtlich der Membranintegration (Hessa et al., 2005; Lundin et al., 2008). Die Biogenese polytopischer Membranproteine ist jedoch weitaus komplexer, da abwechselnd nach Typ II und Typ III ausgerichtete Helices in die Doppellipidschicht integriert werden und die dazwischenliegenden Loops sich auf der korrekten Seite der Membran befinden müssen. Ein passendes Modell schlägt dabei vor, dass sich im ribosomalen Tunnel befindliche Transmembrandomänen zur Ribosomenbindung am Translokon führen. Durch die zusätzliche Interaktion von BiP am luminalen Teil des Translokons kann so in abwechselnden Zyklen die korrekte Insertion der Transmembranhelices und sowie Translokation der Polypeptidketten ermöglicht werden (Lin et al., 2011).

## 1.8. Ziele der Arbeit

Der Proteintransport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums ist der erste Schritt der Biogenese von etwa einem Drittel aller Proteine in humanen Zellen. Der Prozess des Proteinimports wird innerhalb der Zelle genau kontrolliert und reguliert. Es gibt verschiedene Mechanismen, wie eine synthetisierte Polypeptidkette auf cytosolischer Seite zur ER-Membran gelangen kann. Der jeweilige Mechanismus ist maßgeblich vom zu transportierenden Substrat und dessen Eigenschaften abhängig. Der Import des Polypeptids wird für Proteine mit N-terminaler Signalsequenz durch den heterotrimeren Sec61-Komplex vermittelt. Die  $\alpha$ -Untereinheit dieses Komplexes bildet eine wässrige Pore, deren Konformation unter bestimmten Bedingungen zum offenen Zustand stimuliert und somit der Polypeptidimport sowie die Biogenese von Membranproteinen erlaubt wird. An der Regulation der Translokationspore sind unterschiedliche akzessorische Komponenten sowohl auf cytosolischer als auch auf luminaler Seite beteiligt. Viele dieser Hilfskomponenten wurden auf struktureller und funktionaler Ebene eingehend untersucht. Diese Charakterisierungen tragen maßgeblich dazu bei, um die unterschiedlichen Mechanismen des Proteintransports sowie Zusammenhänge zur Ausprägung bestimmter Krankheiten besser zu verstehen. Eine potentiell akzessorische Komponente der Proteintranslokase ist der TRAP-Komplex. Der Komplex wird aus vier Untereinheiten gebildet und wurde kürzlich mittels Cryo-Elektronentomografie strukturell näher charakterisiert. Auf funktioneller Ebene ist der TRAP-Komplex bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nur wenig verstanden. Bekannt ist allerdings, dass verschiedene genetische Mutationen in Untereinheiten des TRAP-Komplexes zur Ausprägung einer Congenitalen Glykosylierungskrankheit führen, was mechanistisch jedoch nicht komplett untersucht und verstanden ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung des TRAP-Komplexes an der Biogenese von Proteinen unter physiologischen Bedingungen, d.h. in intakten Zellen untersucht. Dazu wurde der TRAP-Komplex in HeLa-Zellen mittels RNAi depletiert und daraus resultierende Abweichungen des Proteoms im Vergleich zu Kontrollzellen massenspektrometrisch und bioinformatisch analysiert, um dadurch Rückschlüsse auf das Substratspektrum des TRAP-Komplexes ziehen zu können. Dieser Strategie lag die Überlegung zu Grunde, dass durch das Fehlen des TRAP-Komplexes betreffende Polypeptide nicht in das ER transportiert werden können. Es kommt daher zur Akkumulation der nicht-transportierten Polypeptide im Cytosol und deren proteasomalen Abbau, was dazu führt, dass diese TRAP-abhängigen Proteine innerhalb des massenspektrometrisch quantifizierten Proteoms vermindert nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse hinsichtlich der potentiellen Substrate sowie der determinierenden Substrateigenschaften wurden validiert.

Die funktionalen Eigenschaften des TRAP-Komplexes sollten unter Beachtung der strukturellen Eigenschaften der CET-Untersuchungen zu einem Modell führen, das den TRAP-Komplex und seine Eigenschaften auf funktionaler Ebene eingehend charakterisiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

In Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte, dazugehörige Software und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte und dazugehörige Software, Verbrauchsmaterialien**

Hersteller	Gerät / Software
Abimed, Düsseldorf	Pipetten
Albert BioScience	Chromatographiepapier
Beckman, München	GS-6KR Zentrifuge, J2 MC-Zentrifuge
	Rotoren: JA-10, JA-20
	1,5 ml Reaktionsgefäße
BioRad, Hercules USA	Trans-Blot™ Electrophoretic Transfer Cell
DNA Star, Madison, WI, USA	Lasergene7
Eppendorf, Hamburg	2 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße
	Kühlzentrifuge 5415R, Thermostat 5320,
	Thermomixer 5436, Thermomixer Comfort
	Zentrifuge 5430, Mini-Spin Zentrifuge
	Research Pro 50 - 1000 µl Pipette
Fröbel Labortechnik, Wasserburg	ROCKY® Wipptisch, Sterilbank, Speed-Vac CON-1000
GE Healthcare, Uppsala, Schweden	ImageQuant Software TL 1D Version 7.0,
	Electrophoresis Power Supply EPS 601
	Typhoon Trio™ (9410)
Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim	Sterilbank
Graphpad Software, Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism Software
Greiner Bio-One, Frickenhausen:	CELLSTAR® Zellkultur Flaschen (25 m <sup>2</sup> , 75 m <sup>2</sup> , 175 m <sup>2</sup> )
	CELLSTAR® TC Zellkultur Schale (6 cm)
Heidolph, Schwabach	Laborrührer RZR2020 und MR3000
Heraeus, Hanau	Inkubationsschrank Hera Cell 150
	Christ Bactifuge
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	Pipetus®-akku Pipettierhilfe
Infors, Bottmingen, CH	Inkubationsschüttler
Invitrogen, Darmstadt	Countess® Automated Cell Counter
	Countess® Cell Counting chamber slides
Isotherm KGW, Karlsruhe	Flüssigstickstoff-Behälter

Hersteller	Gerät / Software
Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau	Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO
Julabo, Seelbach	Wasserbad
Konrad Benda, Wiesloch	UV-Tisch N90 LW 36 6nm
LG, Seoul, Südkorea	Mikrowelle
Marienfeld, Lauda Königshofen	Taumel-Rollmischer
Millipore Co., Bedford, USA	Immobilon-P PVDF Transfermembran (0,45 µm)
	Wasseranlage Milli-Q Plus 185
Motic, Wetzlar	Mikroskop AE21
Neolab, Heidelberg	Eisbad 1-6031
Panasonic	Mikrowelle
Peqlab, Erlangen	NanoDrop®ND-1000 UV/Vis,
	PCR-Cycler Primus 96
Pharmacia Biotech AB, Freiburg	Spannungsgeräte EPS 200, EPS 500/400, EPS 600,
	EPS 601, EPS 3500
	MultiTemp®, MultiTemp® II
	Ultrospec 3000 UV/Vis Spectrometer
	ImageMaster VDS Video Documentation Systems
Sarstedt, Nümbrecht:	Pipettenspitzen (0,1 - 5000 mL),
	Reaktionsgefäße (15 mL / 50 mL),
	Polystyrolküvetten (1 mL)
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP61, BP4100, LA420, ED5201
Schütt, Göttingen:	Autoklav
Scientific Industries, Bohemia , USA:	Vortex Mixer (Genie 2™)
Sigma-Aldrich, Steinheim	Stuart™ Scientific roller mixer
Systec GmbH, Wettenberg	AutoKlav DX-65
Thermo Scientific, Dreieich	Nalgene® Bottle-Top Filtereinheit (500 ml)
	Inkubationsschrank Hera Cell 150i
	HERAfreeze® -80°C Tiefkühltruhe
	Sterilbank MSC Advantage
	StepOnePlus Real-Time PCR Systems
Vilber Lourmat, Eberhardzell	Fusion SL luminescence imaging system
	Fusion Capture 16.11
Wenzel Glaserei, München	Glasplatten
Werkstatt Medizinische Biochemie	Elektrophoresekammern,
Whatman GmbH, Dassel	Whatman®, FP 30/0.2 (0,2 µm)
WTW, Weilheim	pH-Meter pH 537
Zeiss, Jena	Binokulares Mikroskop Axiolab
Ziegra, Isernhagen	Eismaschine

## 2.1.2. Chemikalien

In Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien**

Hersteller	Artikel
Applied Biosystems, Darmstadt	TaqMan Gene Expression Assays
Biochrom AG, Berlin	Fetal Bovine Serum (FCS)
Biofroxx, Einhausen	CrossFroxx
Biotium, Fremont, Canada	GelRed Nucleic Acid Stain
Carl Roth, Karlsruhe	Lennox Broth (LB) Agar, LB Medium, MOPS,
	Terrific Broth (TB) Medium, Phenol-Chloroform,
	Magermilchpulver, Agar-Agar, Isoamylalkohol,
	Super Optimal Broth (SOB) Medium,
Agarose, Natriumhydroxid	
Eurofins MWG, Ebersberg	DNA Oligonukleotide
GE Healthcare Uppsala, Schweden	ECL-Western Blot Detection system
Genomed, Löhne	Jetstar Plasmid Purification MIDI-Kit
Invitrogen, Darmstadt	Superscript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit,
	Oligo(dT) Primer, Trypan Blue Solution (0,4 %)
	HiPure Plasmid Midiprep Kit, Hygromycin B
Merck, Darmstadt	Dinatriumhydrogenphosphat, Glycerin, MG132
	Glycin, Kaliumchlorid, Magnesiumacetat,
	Natriumdihydrogenphosphat, Tunicamycin
	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan,
	Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Natriumchlorid,
Natriumacetat, Manganchlorid	
New England Biolabs GmbH	Alkaline Phosphatase
Promega Biotec, Madison, USA	FuGENE HD®
Qiagen, Hilden	HiPerFect Transfektionsreagenz,
	RNA Oligonucleotide, QIAamp RNA Blood Kit,
	QIAquick PCR Purification Kit,
	QIA quick gel extraction kit
Riedel de Haën, Hannover	Kaliumacetat
Roche, Mannheim	RNAse A, DNaseI

Hersteller	Artikel
Serva, Heidelberg	Acrylamid, Ammoniumpersulfat (AMPS),
	Bromphenolblau, Calciumchlorid, Triton X-100
	Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid,
	Natriumlaurylsulfat, Tetramethylethylendiamin,
	Bisacrylamid,
Sigma-Aldrich, Steinheim	Ampicillin, $\beta$ -Mercaptoethanol, Rubidiumchlorid,
	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Glucose,
	Dimethylsulfoxid (DMSO), Kanamycin,
	Nonoxinol 40 (NP-40)
Thermo Fisher Scientific, Dreieich	Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%) in PBS 1 x,
	Gibco® DMEM + GlutaMAX™-I, 1 x PBS,
	OptiMEM®, Penicillin/Streptomycin 100 x,
	O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder,
	PageRuler™ Prestained Protein Ladder,
	Restriktionsendonukleasen,
	Pfu-Polymerase, DNA-Probenpuffer,
Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken	Ethanol, Methanol, Essigsäure, Aceton

### 2.1.3. Enzyme

In Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme aufgelistet. Diese wurden zur Manipulation der humanen Zellen gemäß Kapitel 2.4.4.2, 2.4.5 oder hinsichtlich der Klonierungen gemäß Kapitel 2.3.2.1, 2.3.2.2, 2.3.3, 2.3.6 genutzt.

**Tabelle 3: Liste der verwendeten Enzyme**

Hersteller	Enzym
Prof. James Paton, Adelaide, Australien	Subtilase AB, Subtilase <sub>A272</sub> B
Thermo Scientific, Dreieich	BamHI, BglII, DpnI, EcoRV, HindIII, KpnI, XhoI, Trypsin, Pfu Polymerase
Quiagen, Hilden	T4 Ligase
New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main	Alkaline Phosphatase
Roche, Mannheim	RNAseA, DNaseI
Invitrogen, Karlsruhe	Superscript® II Reverse Transkriptase



## 2.1.4. Antikörper

### 2.1.4.1. Primäre Antikörper

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurde das Prinzip der Antigen-Antikörperbindung genutzt. In Tabelle 4 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper aufgelistet. Die Mehrheit der Antikörper wurde aus den Seren immunisierter Kaninchen unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Jung im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie gewonnen. Den Kaninchen wurden dabei de novo synthetisierte Peptide bzw. gereinigte Proteine injiziert. Die Peptidsynthese, Proteinreinigung, Injektion, Blutentnahme und Gewinnung der Seren sowie das Testen der Antikörper wurden im Team mit Sabine Pelvay, Nicole Heim und Aline Herges durchgeführt.

**Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper.**

UdS: Universität des Saarlandes, ER: Endoplasmatisches Retikulum, OST: Oligosaccharyltransferase, SRP: Signal recognition particle, TRAP: Translocon associated protein complex.

Antikörper	Interne Bezeichnung	Beschreibung	Ursprung / Herkunft	Verwendete Verdünnung
$\alpha$ -ACP2	ACP2	Polyklonaler Antikörper gegen ACP2 (Lysosom)	Kaninchen / Thermo Fisher	1:500
$\alpha$ -BiP	Nast 950*	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus von ER-lumenalem BiP	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -Calreticulin	Calnit	Polyklonaler Antikörper gegen ER-luminales Calreticulin	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -Dad1	Nast 1483	Polyklonaler Antikörper gegen die Dad1-Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex OST	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -DDK	Flag	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den DDK-Tag	Maus / Origene	1:1000
$\alpha$ -EPDR1	EPDR1	Polyklonaler Antikörper gegen EPDR1 (extrazellulär)	Kaninchen / Biorbyt	1:500
$\alpha$ -ERj1	Johanna II	Polyklonaler Proteinantikörper gegen das ER-integrale Membranprotein ERj1	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -Grp94	Grp94	Polyklonaler Antikörper gegen ER-luminales Grp94	Kaninchen / UdS	1:500
$\alpha$ -Grp170	ABP150	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus des ER luminalen Grp170	Kaninchen / UdS	1:500
$\alpha$ -Kar2	Kar2	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den C-Terminus von Kar2	Kaninchen / UdS	1:500

Antikörper	Interne Bezeichnung	Beschreibung	Ursprung / Herkunft	Verwendete Verdünnung
$\alpha$ -Ost48	Ost48	Monoklonaler Antikörper gegen die Ost48-Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex OST	Maus / Santa Cruz Biotechnology	1:1000
$\alpha$ -PPIB	PPIB	Polyklonaler Antikörper gegen ER-luminales PPIB	Kaninchen / UdS	1:1000
$\alpha$ -PPIC	PPIC	Polyklonaler Antikörper gegen ER-luminales PPIC	Kaninchen / Abcam	1:1000
$\alpha$ -Sec61 $\alpha$	Nast 1362	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das IQ Motiv der $\alpha$ -Untereinheit des Sec61 Komplexes	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -Sel1	Nast 465	Polyklonaler Proteinantikörper gegen das ER-luminale Protein Sel1	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -Sil1	BAP / Sil1	Polyklonaler Proteinantikörper gegen ER-luminales Sil1	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -SR $\alpha$	Nast 178a	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der $\alpha$ -Untereinheit des ER-membran- ständigen SRP-Rezeptors	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -SR $\beta$	Nast 510	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der $\beta$ -Untereinheit des ER-membran- ständigen SRP-Rezeptors	Kaninchen / UdS	1:500
$\alpha$ -Stt3b	Stt3b	Polyklonaler Antikörper gegen die Stt3b-Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex OST	Kaninchen / Stephen High	1:1000
$\alpha$ -TMED5	TMED5	Polyklonaler Antikörper gegen TMED5 (Golgi)	Kaninchen / Sigma	1:500
$\alpha$ -TRAP $\alpha$	Nast 1342	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der $\alpha$ -Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex TRAP	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -TRAP $\beta$	Nast 302	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der $\beta$ -Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex TRAP	Kaninchen / UdS	1:250
$\alpha$ -TRAP $\gamma$	Nast 1484	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der $\gamma$ -Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex TRAP	Kaninchen / UdS	1:500

Antikörper	Interne Bezeichnung	Beschreibung	Ursprung / Herkunft	Verwendete Verdünnung
$\alpha$ -TRAP $\delta$	TRAP $\delta$	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der $\delta$ -Untereinheit des integralen ER-Membrankomplex TRAP	Kaninchen / Sigma	1:500
$\alpha$ - $\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin	Monoklonaler Antikörper gegen $\beta$ -Aktin	Maus / Sigma	1:10.000
$\alpha$ - $\beta$ -Aktin	Nast 1485	Polyklonaler Peptidantikörper gegen $\beta$ -Aktin	Kaninchen / UdS	1:10.000

#### 2.1.4.2. Sekundäre Antikörper

Zur Visualisierung der Antigen-Antikörperbindung hinsichtlich der Detektion und Quantifizierung von Proteinen in komplexen Gemischen wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten sekundären Antikörper gebraucht.

**Tabelle 5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper**

Antikörper	Markierung	Ursprung / Herkunft	Verwendete Verdünnung
$\alpha$ -Kaninchen	ECL™ Plex Cy5	Ziege / GE Healthcare	1:1000
$\alpha$ -Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Ziege / Sigma	1:1000
$\alpha$ -Maus	ECL™ Plex Cy3	Ziege / GE Healthcare	1:2500
$\alpha$ -Maus	Meerrettich-Peroxidase	Ziege / Sigma	1:10000

#### 2.1.5. Oligonukleotide

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Oligonukleotide beschrieben.

##### 2.1.5.1. DNA Oligonukleotide (Primer)

In Tabelle 6 sind die DNA Oligonukleotide aufgelistet, die zu in Kapitel 2.3.2.3 zur qRT-PCR verwendet wurden.

**Tabelle 6: Liste der DNA Oligonukleotidprimer für qRT-PCR-Versuche**

Die Gene der TRAP-Komplex-Untereinheiten werden in der gesamten Arbeit zur besseren Zuordnung wie folgt bezeichnet: SSR1 = TRAPA; SSR2 = TRAPB, SSR3 = TRAPG, SSR4 = TRAPD

Gen	Assay ID	Beschreibung
PPIC	Hs00211349_m1	Primer für qRT-PCR von PPIC
TMED5	HS00211349_m1	Primer für qRT-PCR von TMED5
ACP2	Hs00900682_m1	Primer für qRT-PCR von ACP2
EPDR1	Hs01556067_m1	Primer für qRT-PCR von EPDR1
ACTB	Hs00357333_m1	Primer für qRT-PCR von Aktin
TRAPA	Hs00162340_m1	Primer für qRT-PCR von TRAPA
TRAPB	Hs00162346_m1	Primer für qRT-PCR von TRAPB
SRPRA	Hs00162326_m1	Primer für qRT-PCR von SRPRA
SRPRB	Hs00253639_m1	Primer für qRT-PCR von SRPRB

In Tabelle 7 sind die DNA-Oligonukleotidprimer aufgelistet, welche zur Klonierung, Sequenzierung oder Mutagenese der in Tabelle 9 dargestellten Konstrukte gemäß Kapitel 2.3.1 verwendet wurden.

**Tabelle 7: Liste der verwendete DNA Oligonukleotide**

Die DNA Oligonukleotide dienen im Rahmen der Klonierung, Sequenzierung oder Mutagenese der in Tabelle 9 dargestellten Konstrukte gemäß Kapitel 2.3.1. Die kodierende Sequenz der template DNA ist in Großbuchstaben markiert, eingefügte Restriktionsenzymststellen sind unterstrichen, heterologe Sequenzen sind kleingeschrieben

Nummer	Strang	Sequenz (5' --> 3')	Beschreibung
RZ139	-	<u>g</u> cggatccCTACAATTCGTCGTGTTCCG	PCR-Primer: Kar2 - BamHI - Stop
RZ156	-	GCGTCAAGTGCAAATGTG	Sequenzierungsprimer: pcDNA5-FRT-Kar2, 3'
RZ537	+	<u>g</u> atggatccATGAAGTTCACTGTGGTGG CG	PCR-Primer: BamHI - Start - BiP-WT
RZ538	-	<u>g</u> ccgcctcgagCTACAACTCATCTTTTT CTGATGTATCCTC	PCR-Primer: BiP-WT - XhoI - Stop
RZ539	-	<u>g</u> ccgcctcgagCTACAACTCATCTTTAAA CTTCTCAGCATCATTAACCATCC	PCR-Primer: BiP-F549(CΔ92) - XhoI - Stop
RZ540	-	<u>g</u> ccgcctcgagCTACAACTCATCTTTATT CCTGGTGTCAATGCGCTCTTTG	PCR-Primer: BiP-N564(CΔ77) - XhoI - Stop
RZ541	+	<u>g</u> cgggatccATGTTTTTCAACAGACTAAG CGC	PCR-Primer: Kar2 - BamHI - Start
RZ542	-	<u>c</u> tgtctcgagCTACAATTCGTCGTGTTCCG	PCR-Primer: Kar2 - XhoI - Stop

Nummer	Strang	Sequenz (5' --> 3')	Beschreibung
RZ648	-	ACCCGGGATCTGTTTCAGGAAACAGC TATGA	Sequenzierungsprimer: pcMV6-entry, 3'
RZ694	+	gttaagcttTTCCGCAAGCGAGGC	PCR-Primer: HindIII - PPIC (reif)
RZ695	-	CCGAAGAAAACACAAGTGCGC	PCR-Primer: PPIC (reif)
RZ696	-	gttaagcttGGCCGCAGAAGGTC	PCR-Primer: PIIB (Signalpeptid ) - HindIII
RZ697	+	GGATCCGGTACCGAGGAGATCT	PCR-Primer: BgIII - PPIC (Signalpeptid)
RZ698	+	CTTCTTCCTGCTGCTGCCGGGACC TTCTGCGGCCctccgaagcgagg	PCR-Mutageneseprimer: PIIB-PPIC (Entfernung Linker)
RZ699	-	cctcgcttgcggaaggccgcagaaggTC CCGGCAGCAGCAGGAAGAAG	PCR-Mutageneseprimer: PIIB-PPIC (Entfernung Linker)
RZ700	-	ggcaagcttGCCCTCGGCCCCCGAAGA AAACACAA	PCR-Primer: PPIC (Signalpeptid) - HindIII
RZ701	-	CAGCAGCAGGAAGAAGACGGAC	PCR-Primer: PIIB (reif)
RZ702	+	tgaagcttGATGAGAAGAAGAAGGGGCC	PCR-Primer: HindIII - PIIB (reif)
RZ703	+	GTTTTCTTCGGGGCCGAGGGCGAT GAGAAGAAGAAGGGGCCCAAAG	PCR-Mutageneseprimer: PPIC-PIIB (Entfernung Linker)
RZ704	-	CTTTGGGCCCTTCTTCTTCTCATCGC CCTCGGCCCCCGAAGAAAAC	PCR-Mutageneseprimer: PPIC-PIIB (Entfernung Linker)
RZ725	+	CTTCTGGCCGCTCTGCCTCCGGTGCTG CTGgcagcaGCGGCCGCTTCACACCTT CCCTCGATAGC	PCR-Mutageneseprimer: Mut-TMED5 (PG14/15AA)
RZ726	-	GCTATCGAGGGAAGGTGTGAAGCCGGC CGCtgtgtcCAGCAGCACCGGAGGCAGA GCGGCCAGAAG	PCR-Mutageneseprimer: Mut-TMED5 (PG14/15AA)
RZ729	+	GATCGCCATGCTGCGCCTCggaccaCGCA ACATGAAGGTGCTCCTTG	PCR-Mutageneseprimer: Mut-PIIB (SE5/6GP)
RZ730	-	CAAGGAGCACCTTCATGTTGCGtgggtccGA GGCGCAGCATGGCGATC	PCR-Mutageneseprimer: Mut-PIIB (SE5/6GP)
RZ731	+	gaccaCGCAACATGAAGGTGCTCCTTccac caGCCCTCATCGCGGGTCCGTCTTCTT C	PCR-Mutageneseprimer: Mut-PIIB (SE5/6GP & AA14/15PP)
RZ732	-	GAAGAAGACGGACCCCGCGATGAGGG CtgggtgAAGGAGCACCTTCATGTTGCGtg gtc	PCR-Mutageneseprimer: Mut-PIIB (SE5/6GP & AA14/15PP)

### 2.1.5.2. RNA Oligonukleotide (siRNA)

Tabelle 8 zeigt eine tabellarische Zusammenstellung der siRNA Oligonukleotide, die zur Kontrolle der Genexpression mittels RNAi in humanen Zellen gemäß Kapitel 2.4.4.1 genutzt wurden.

**Tabelle 8: Liste der verwendeten siRNA Oligonukleotide.**

Bei allen Nukleotiden handelt es sich um humane Gensequenzen. UTR = untranslatierte Region.

Interne Bezeichnung	Zielgen	Sequenz (sense Strang)	Verwendete Konzentration
control	-	allstars negative control	10 - 35 nM
BiP-CA	HSPA5	CCUUCGAUGUGUCUCUUCUdTdT	35 nM
BiP-hs#1-UTR	HSPA5	GCGGCUGUUUACUGCUUUdTdT	35 nM
Sec61A	SEC61A1	GGAAUUUGCCUGCUAAUCAdTdT	20 nM
Sec61A-UTR #5	SEC61A1	CACUGAAAUGUCUACGUUUdTdT	20 nM
TRAPA #3	SSR1	AGAUUUGAACGGCAAUGUAdTdT	10 nM
TRAPB #3	SSR2	CCUCGGCAACAAUUACUUAAdTdT	10 nM
TRAP $\beta$ -UTR #2	SSR2	AAGGGUAUCUAAAUGCAAdTdT	10 nM

### 2.1.6. Plasmide

In Tabelle 9 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet. Diese wurden entweder kommerziell bei Origene erworben oder innerhalb der Arbeit kloniert. Alle Plasmide besitzen einen CMV Promotor und wurden zur Anwendung in humanen Zelllinien in der Zellkultur aus DH5 $\alpha$  *E. coli* Zellen gereinigt.

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide zur Überexpression in humanen Zelllinien**

Alle Plasmide besitzen einen CMV Promotor und wurden zur Anwendung- in humanen Zelllinien in der Zellkultur aus DH5 $\alpha$  *E. coli* Zellen gereinigt. UdS = Universität des Saarlandes.

Name	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pcAGGSM2-Sil1-IRES-GFP	SIL1 (homo sapiens) Wildtyp	Ampicillin	S.Cappel UdS
pcDNA5-FRT-BiP-WT	HSPA5 (homo sapiens) Wildtyp mit FRT-Rekombinationssequenz	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA5-FRT-BiP-R197H	HSPA5 (homo sapiens) R197H Mutant mit FRT-Rekombinationssequenz	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA5-FRT-BiP-F549(C $\Delta$ 92)	HSPA5 (homo sapiens) c-terminal trunkiert (92 AS) FRT-Rekombinationssequenz	Ampicillin	diese Arbeit

Name	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pcDNA5-FRT-BiP-N564(CΔ77)	HSPA5 (homo sapiens) c-terminal trunkiert (77 AS) FRT-Rekombinationssequenz	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA5-FRT-BiP-L416D	HSPA5 (homo sapiens) c-terminal trunkiert (77 AS) FRT-Rekombinationssequenz	Ampicillin	diese Arbeit
pcDNA5-FRT-Kar2	Kar2 (Saccharomyces cerevisiae) Wildtyp FRT-Rekombinationssequenz	Ampicillin	diese Arbeit
pcMV6-AC-IRES-GFP-Myc-DDK	Kontrollplasmid mit IRES-GFP Sequenz	Ampicillin	Origene
pcMV6-entry-ACP2	ACP2 (mus musculus) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-EPDR1	EPDR1 (mus musculus) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-FKBP14	FKBP14 (homo sapiens) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-PPIB	PPIB (homo sapiens) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-mut-PPIB	PPIB (homo sapiens) SE5/6PG & AA14/15PP c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-PPIB-PPIC	PPIB Signalsequenz (homo sapiens) vor reifem Teil von PPIC (homo sapiens) c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	diese Arbeit
pcMV6-entry-PPIC	PPIC (homo sapiens) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-PPIC-PPIB	PPIC Signalsequenz (homo sapiens) vor reifem Teil von PPIB (homo sapiens) c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	diese Arbeit
pcMV6-entry-RNAseT1	RNAseT2 (homo sapiens) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-SSR2	SSR2 (homo sapiens) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-SUMF1	SUMF1 (homo sapiens) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-TMED5	TMED5 (mus musculus) Wildtyp c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene
pcMV6-entry-mut-TMED5	TMED5 (mus musculus) PG23/24AA c-terminaler Myc-DDK Tag	Kanamycin	Origene

### 2.1.7. Raue Mikrosomen

Mikrosomen bezeichnen membranumhüllte Vesikel und werden in der Literatur als Synonym für das Endoplasmatische Retikulum gebraucht. Um die Prozesse, die am ER ablaufen biochemisch näher zu charakterisieren, isoliert man die Mikrosomenfraktion aus Zellen. Es werden speziell raue Mikrosomen (RM) isoliert, da diese an der Membranaußenseite mit Ribosomen besetzt und damit identisch mit dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum sind. Im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie wird dabei mit Mikrosomen aus dem Pankreas des Hundes gearbeitet, da es sich hierbei um ein sekretorisch hochaktives Gewebe handelt (Walter & Blobel, 1983, Watts, Wickner, & Zimmermann, 1983). Die Präparation wird von Prof. Dr. Martin Jung durchgeführt. Die isolierten rauhen Mikrosomen dienen zum einen zur Analyse von ER-Prozessen basierend auf in vitro Transportversuchen (Haßdenteufel, 2017). Zum anderen dienen die RMs als Positivkontrolle beim Nachweis von ER-Proteinen auf Western Blot Ebene (2.2.3).

### 2.1.8. Bakterienstämme

Zur Klonierung der in Tabelle 9 gelisteten, im Zuge dieser Arbeit hergestellten, Plasmide wurden die *E. coli* Bakterienstämme JM101 (supE thi-1  $\Delta$ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ $\Delta$ M15]) sowie XL1 blue super competent cells ((recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]; Agilent technologies, Santa Clara, USA ) verwendet. Der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  (F-,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44,  $\lambda$ -, thi-1, gyrA96, relA1  $\hat{A}$ ) wurde zur Amplifikation von Plasmiden zum Einsatz in der Zellkultur genutzt.

### 2.1.9. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der substratspezifischen Eigenschaften des TRAP-Komplexes sowie des ER-luminalen Chaperons BiP HeLa Zellen verwendet (ATCC Nr. CCL-2). TRAP $\delta$ -defiziente Fibroblasten von CDG-Patienten (CDG405, CDG406) wurden von der AG Freeze (San Diego) zur Verfügung gestellt, TRAP $\gamma$ -defiziente Fibroblasten (CDG359) von Dr. Charles Marques Lourenco, Kontrollfibroblasten vom Coriell Institute (Ng et al., 2015).

Mit Hilfe des Flp-In™ Systems (Thermo Fisher) sollten weiterhin Mutanten des HSPA5-Gens stabil in das Genom der HeLa-Zellen integriert werden (2.5.1). Die Mutterzelllinie wurde von der AG Förster (München) zur Verfügung gestellt.



## 2.2. Biochemische Analysemethoden

Im folgenden Kapitel sind die biochemischen Analysemethoden, welche in dieser Arbeit angewendet wurden, näher beschrieben.

### 2.2.1. SDS Page

In der vorliegenden Arbeit wurden komplexe Proteingemische in Gelen aus dem quervernetzten Polymer Polyacrylamid mittels diskontinuierlicher Elektrophorese in vertikaler Laufrichtung aufgetrennt. Die Methode des SDS-PAGE wurde von U. Laemmli entwickelt (Laemmli, 1970). Das Gel wirkt in diesem Zusammenhang wie ein Molekularsieb, was bedeutet, dass kleinere Proteine schneller wandern als größere. Beeinflusst wird die elektrophoretische Wanderung der Proteine durch ihre Nettoladung.

Sowohl das Polyacrylamidgel als auch der Laemmli-Probenpuffer, mit welchem jede aufzutrennende Probe versetzt wird, enthält Natriumdodecylsulfat (SDS). Das stark denaturierend wirkende anionische Detergenz SDS lagert sich im Verhältnis 1,4:1 an hydrophobe Regionen der Proteine an und maskiert deren Ladung, sodass die Auftrennung im elektrischen Feld rein über das Molekulargewicht des SDS-Proteinkomplexes erfolgt. Zur vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstruktur wurden die Proben nach Zugabe des Probenpuffers, der zusätzlich  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält, 15 min bei 56 °C erhitzt, wodurch auch die Zugänglichkeit von SDS in das gesamte Proteinmolekül erleichtert wird. Die Auftrennung wird maßgeblich über die Konzentration an Acrylamid gesteuert, da diese die Porengröße eines Polyacrylamid-Gels beeinflusst.

Die verwendeten Trenngele wurden je nach Art der zu analysierenden Probe ausgewählt und nach Mischen der Komponenten gemäß Tabelle 10 in den Hohlraum zwischen zwei Glasplatten gegeben. Bei der Verwendung von Glasplatten im Maßstab 14 x 11 x 0,1 cm (klein) wurde der untere Rand mit einem Bodengel aus Agarose (2 %) abgedichtet, im Maßstab 35 x 27 x 0,1 cm (groß) kam ein 20%iges Acrylamid-Bodengel zum Einsatz. Unabhängig von der zu analysierenden Probe wurde bei allen Gelen auf das polymerisierte Trenngel ein weitporiges Sammelgel gegossen. Fertige Gele wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Verwendung der Gele wurden diese in der Elektrophoresekammer fixiert, Anoden- und Kathodenkammer mit ausreichend Elektrophoresepuffer befüllt und anschließend die erhitzten Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Proteinstandard wurden bei jedem Gel 5  $\mu$ L des „Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in kleinen Gelen bei 5 mA für etwa 16 h bzw. bei 45 mA etwa 3 h. Große Gele, mit höherer Trenneffizienz, liefen ca. 20 h bei 20 mA.

**Tabelle 10: Pipettierschema für Tris-Glycin-Gele zur SDS-PAGE**

**A:** Pipettierschema für Tris-Glycin-Gele im Maßstab 14 x 11 x 0,1 cm (klein); **B:** Pipettierschema für Tris-Glycin-Gele im Maßstab 35 x 27 x 0,1 cm (groß); AA = Acrylamid

**A**

AA-Konzentration Lösungen		Trenngel				Sammelgel
		10,0%	12,5%	15,0%	17,5%	5,0%
40 % (w/v) Acrylamid	[mL]	3,8	4,7	5,6	6,6	0,9
2 % (w/v) Bisacrylamid	[mL]	1,0	1,3	1,5	1,8	0,2
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	[mL]	4,0	2,9	1,7	0,4	5,0
1,875 M Tris / HCl (pH 8,8)	[mL]		6,0			-
1 M Tris / HCl (pH 6,8)	[mL]		-			0,9
10 % (w/v) SDS	[µL]		150,0			72,0
20 % (w/v) AMPS	[µL]		45,0			67,5
TEMED	[µL]		5			10,5
Gesamtvolumen	[mL]		15,0			7,2

**B**

AA-Konzentration Lösungen		Trenngel				Sammelgel	Bodengel
		10,0%	12,5%	15,0%	17,5%	5,0%	20,0%
40 % (w/v) Acrylamid	[mL]	17,5	21,9	26,3	30,6	3,6	20,0
2 % (w/v) Bisacrylamid	[mL]	4,7	5,8	7,0	8,2	1,0	2,7
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	[mL]	18,9	13,3	7,8	6,5	20,0	16,6
1,875 M Tris / HCl (pH 8,8)	[mL]		28,0			-	-
1 M Tris / HCl (pH 6,8)	[mL]		-			3,6	-
10 % (w/v) SDS	[µL]		700,0			288,0	400,0
20 % (w/v) AMPS	[µL]		210,0			270,0	200,0
TEMED	[µL]		23,0			42,0	100,0
Gesamtvolumen	[mL]		70			28,8	40,0

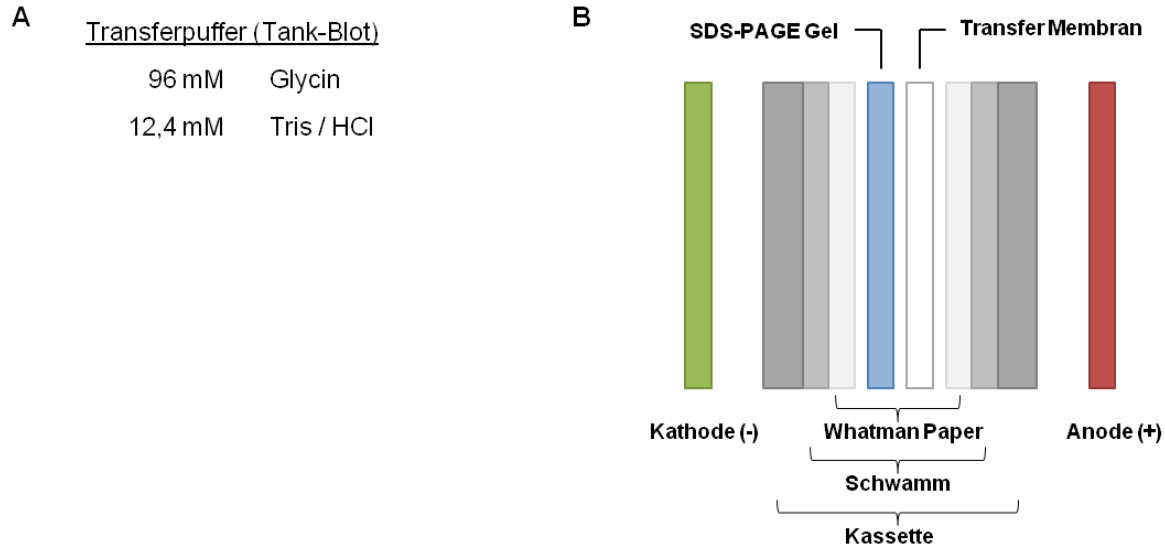
## 2.2.2. Western Blot

Zur Untersuchung des Proteingehalts in Zellen wurde die Methode des Western Blots genutzt (Renart, Reiser, & Stark, 1979). Dabei werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf einen geeigneten Träger, z.B. wie in dieser Arbeit auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF), transferiert und dort immobilisiert. Die Bindung der Proteine erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Anschließend können Proteine durch Bindung des entsprechenden Antikörpers nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Arten des Western Blottings genutzt. Zur Detektion von Proteinen mit einem Molekulargewicht größer als 35 kDa wurde das Tank-Blot-Verfahren genutzt. Dabei kam das System "Trans-Blot™ Cell" (BioRad) zum Einsatz. Die Alternativmethode zur Detektion kleinerer Proteine war das *Semidry*-Blotting-Verfahren.

### 2.2.2.1. Tank-Blot-Verfahren

Für den Tank-Blot-Transfer wurden sowohl Schwämme als auch geeignetes Filterpapier im Transferpuffer äquilibriert, die PVDF-Membran (ca. 10 cm x 15 cm) mit einer Porengröße von 0,45 µm in Methanol aktiviert um die hydrophobe Membran zugänglich für wässrige Lösungen zu machen. Das System wurde anschließend gemäß Abbildung 13B zusammengesetzt: Auf die geöffnete Western Blot Kassette wurde zunächst ein Schwamm, ein Filterpapier (ca. 12 cm x 17 cm) und anschließend das um seine Längsachse invertierte Gel gelegt. Daran schlossen sich die PVDF-Membran, ein weiteres Filterpapier und ein Schwamm an. Es war darauf zu achten, dass Gel und Membran luftblasenfrei aneinander hafteten um einen kompletten Transfer zu gewährleisten. Die verschlossene Kassette wurde in die mit ca. 2,5 L Transferpuffer (Abbildung 13A) gefüllte Western Blot Kammer überführt, sodass die Membran zur Anode gerichtet war. Der Transfer erfolgte bei 14 °C, 400 mA für 3 h.

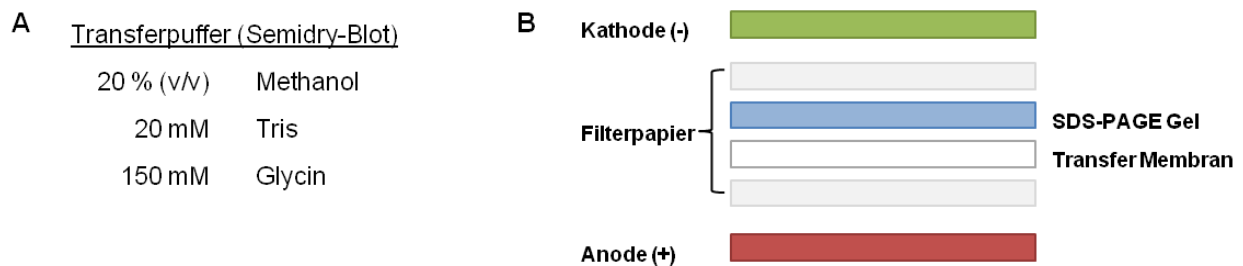


**Abbildung 13: Tank-Blot Verfahren**

**A:** Zusammensetzung des Transferpuffers zur Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Transfer Membran mittels Tank-Blot-Verfahren. **B:** Schematischer Aufbau des Tank-Blot-Verfahrens.

### 2.2.2.2. *Semidry-Blot*

Zum effizienten Transfer von Proteinen kleiner als 35 kDa wurde in dieser Arbeit das *Semidry-Blotting*-Verfahren angewendet. Der Vorteil gegenüber dem Tank-Blot-Verfahren liegt hierbei darin, dass Proteine offensichtlich weniger tief in die Membran wandern und daher eine empfindlichere Immundetektion möglich wird. Hierbei wurden geeignete Filterpapiere in *Semidry*-Transferpuffer äquilibriert (Abbildung 14A), PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Die Anode der Blotapparatur wurde mit *Semidry*-Transferpuffer benetzt, darauf ein Filterpapier, die Membran, das nicht-invertierte Gel und ein weiteres Filterpapier luftblasenfrei gepackt (Abbildung 14B). Die Kathode wurde ebenfalls lediglich leicht benetzt, sodass insgesamt nur ca. 100 mL Puffer nötig waren. Der Transfer erfolgte bei 150 mA für 3 h.



**Abbildung 14: *Semidry*-Blot Verfahren**

**A:** Zusammensetzung des Transferpuffers zur Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Transfer-Membran mittels *Semidry*-Verfahren. **B:** Schematischer Aufbau des *Semidry*-Verfahrens.

### 2.2.3. Immunologische Detektion von Proteinen

Die Methode der immunologischen Proteindetektion nutzt die Fähigkeit von Antikörpern (Immunglobulinen) hochspezifisch Epitope auf Proteinoberflächen zu erkennen und diese mit den sich auf der Antikörperoberfläche befindlichen korrespondierenden Paratopen zu binden. Diese Bindung kann durch Antikörperkopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Meerrettichperoxidase, zur Vermittlung einer Chemilumineszenzreaktion, visualisiert und quantifiziert werden. Dieses Prinzip wurde in dieser Arbeit dazu verwendet Proteinmengen bzw. verschiedene Prozessierungsstufen von Proteinen in Zellen nach genetischer Manipulation zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein komplexes Proteingemisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.1) und anschließend die Proteine auf einer PDVF-Membran immobilisiert (2.2.3). Die Puffer, die zur weiteren Analyse verwendet wurden, sind in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11: Puffer zur immunologischen Detektion von Proteinen**

<u>TBS-Puffer</u>		<u>Blockierlösung</u>	
150 mM	NaCl	TBS (1x)	
10 mM	Tris / HCl (pH 7,4)	5 % (w/v)	Magermilchpulver
<u>Antikörperlösung</u>		<u>TBS-T-Puffer</u>	
Verdünnung gemäß	Blockierlösung	150 mM	NaCl
Tabelle 4	Antikörper	10 mM	Tris / HCl (pH 7,4)
		0,05 % (v/v)	Triton-X-100

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde in Magermilch-TBS-Lösung (5%) abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde gemäß Tabelle 4 in der Antikörperlösung verdünnt und die Membran über Nacht mit dieser Lösung inkubiert. Es folgen drei Waschstufen à 10 min mit TBS-T vor der Inkubation mit dem passenden sekundären Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichtet ist, und mit einem Fluorophor oder Peroxidase (POD) gekoppelt ist. Für ersteres erfolgte nach erneutem Waschen und Trocknen der Membran die Detektion mit Hilfe des „Typhoon Trio Fluorescence Imaging“ Systems, die Quantifizierung wird mittels ImageQuant TL 7.0 durchgeführt.

Für POD-gekoppelte Antikörper wird die Membran gleichermaßen gewaschen und anschließend durch Zugabe von Substrat und Verstärker zur Detektion der Chemilumineszenz-Reaktion zugänglich gemacht. Die Emission wurde mittels „Fusion SL (peqlab) luminescence imaging“ System visualisiert und über die zugehörige Software quantifiziert.

#### **2.2.4. Densitometrie**

Unter Densitometrie versteht man die quantitative Dichtemessung. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die Farbdichte als Farbmenge pro Flächeneinheit quantifiziert. Die zu messende Farbdichte wurde durch die Signalintensität des Messenger-Molekül gekoppelt an den sekundären Antikörper im Rahmen der immunologischen Detektion von Proteinen hervorgerufen. Zur Quantifizierung von Fluoreszenz basierten Signalen wurde die Software „Image Quant TL 7.0 (GE Healthcare)“ verwendet. Mittels „Fusion Capture 16.11 (Vilber Lourmat)“ Software wurden solche Signale quantifiziert, welche durch Chemilumineszenz hervorgerufen wurden. Jegliche weitere Auswertungen wurden je nach Fragestellung mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 oder GraphPad Prism durchgeführt.

### **2.3. Molekularbiologische Analysemethoden**

#### **2.3.1. Strategien zur Klonierung von Plasmiden**

Innerhalb dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide neu kloniert. Nachfolgend werden die zugrundeliegenden Strategien erläutert.

Um einzelne Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur eines Proteins zu ändern, wurde die ortsspezifische Mutagenese mittels Quick-change-PCR gewählt (mut-PPIB, mut-TMED5). Die verwendeten Primer wurden so designt, dass etwa 15 Basen beidseitig der zu mutierenden DNA-Sequenz das Template binden. Die Primer enthalten an passender Position die Sequenz der einzubringenden Mutation, welche im Laufe der PCR-Zyklen in die vervielfältigte Plasmid-DNA übernommen wird. Durch Einsatz des Enzyms DpnI wird die methylierte Template-DNA anschließend abgebaut.

Außerdem wurden Chimäre zu den kodierenden Sequenzen von PPIB und PPIC kloniert, um den Effekt der jeweiligen Signalsequenz im Transport der Polypeptidkette nach TRAP Depletion näher zu analysieren. Dabei wurden die DNA-Sequenzen im pcMV6-entry-Vektor jeweils ohne Signalsequenz bzw. nur die Signalsequenz mittels PCR (2.3.2.1) amplifiziert und die geeignete Schnittstellen an die Enden der DNA-Sequenzen über DNA-Oligonukleotide (Tabelle 7) eingeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente der Signalsequenzen mit dem Vektor, der die kodierende Sequenz für das jeweils andere Protein beinhaltetete, in einer Ligationsreaktion (2.3.6) zusammengefügt (pcMV6-entry-PPIC-KL-PPIB und pcMV6-entry-PPIB-KL-PPIC).

Durch das Einfügen der genannten Schnittstellen ergaben sich kurze Linkersequenzen zwischen den Signalpeptidsequenzen und den Sequenzen der reifen Teile.

Die Linker wurden anschließend mittels overlap-extension PCR (2.3.2.2) aus den Template-Plasmiden entfernt und so die relevanten Sequenzen direkt miteinander verknüpft (pcMV6-entry-PPIC-PPIB und pcMV6-entry-PPIB-PPIC).

Des Weiteren wurde die Fragestellung adressiert, welchen Effekt verschiedene Mutanten des Hsp70 Chaperons BiP auf den Transport von Polypeptiden in das ER haben. Dazu sollten diese Mutanten durch Rekombination über FRT-Sites stabil in das Genom von HeLa-Flp-In-Zellen integriert werden. Dazu mussten die kodierenden Sequenzen der BiP-Mutanten sowie des Wildtyps in einen zur Rekombination über FRT-Sites geeigneten Vektor kloniert werden. Die kodierenden Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert und über die eingesetzten Primer geeignete Schnittstellen angefügt, welche zur Integration in den Flp-In-Vektor pcDNA-FRT genutzt wurden (pcDNA5-FRT-BiP, pcDNA5-FRT-BiP-R197H, pcDNA5-FRT-BiP-F549, pcDNA5-FRT-BiP-N564, pcDNA5-FRT-BiP-L416D, pcDNA5-FRT-Kar2p).

### **2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren geht auf Kary Mullis zurück (U.S. Patentnr. 4.683.195, 1985) und findet breite Anwendungsmöglichkeiten.

In dieser Arbeit wurde die Technik der PCR zu zwei Zwecken genutzt. Zum einen zur Amplifikation von Plasmid-DNA-Fragmenten bzw. deren Mutagenese im Zuge von Klonierungsexperimenten. Zum anderen wurde die quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zur Amplifikation von mRNA dazu verwendet die Depletionseffizienz der Zellbehandlung mit siRNA zu beurteilen. Das Grundprinzip der in vitro Nukleinsäurevervielfältigung ist dabei ähnlich der natürlichen Replikation. Die Synthese eines neuen DNA-Strangs bzw. DNA-Fragments erfolgt mit Hilfe einer DNA-Polymerase ausgehend von gegenläufig orientierten Oligonukleotidprimern, die sich an die einsträngige Template-DNA anlagern. Durch die zyklische Wiederholung der PCR wird die Matrize exponentiell amplifiziert.

### 2.3.2.1. Amplifikation von Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA-Fragmenten werden zunächst 20-30 bp lange Primer entworfen, die etwa 100 AS vor bzw. nach dem zu amplifizierenden Fragment komplementär zum jeweiligen DNA-Strang binden.

Dabei sollten beide Primer einen ähnlichen GC-Gehalt aufweisen, der maßgeblich die Temperatur der Hybridisierung von einsträngiger DNA und Primer (Annealing) beeinflusst.

Die Reaktion wurde mit Hilfe des PCR-Thermocyclers organisiert, durch welchen Temperaturzyklen gesteuert werden können. Dabei wird ein typischer PCR-Zyklus generell in drei Stufen eingeteilt. Der Zyklus beginnt mit der thermischen Spaltung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C (2 min). Die Reduktion der Temperatur auf 53 °C (30 s) begünstigte die Hybridisierung der Primer mit den einzelnen DNA-Strängen (Annealing). In der letzte Phase, der Elongation, werden freie dNTPs an die frei 3'-OH-Gruppe der angelagerten Primer gebunden. Dies passiert bei 72 °C, denn bei dieser Temperatur wird die eingesetzte, hitzestabile *Pfu*-Polymerase aktiv und kann so den neuen Strang in 5' → 3'-Richtung verlängern.

Innerhalb dieser Arbeit wurde diese Methode zur Klonierung der nachfolgenden Plasmide verwendet:

- pcMV6-entry-PPIC-KL-PPIB
- pcMV6-entry-PPIB-KL-PPIC
- pcDNA5-FRT-BiP
- pcDNA5-FRT-BiP-R197H
- pcDNA5-FRT-BiP-L416D
- pcDNA5-FRT-BiP-F549
- pcDNA5-FRT-BiP-N564
- pcDNA5-FRT-Kar2p

Die verwendeten Primersequenzen sind Tabelle 7 zu entnehmen. Gemäß Tabelle 12 wurden Amplifikationsreaktionen vorbereitet. Die zugehörigen PCR-Konditionen für die amplifizierten DNA-Fragmente sowie die dazu verwendeten Templates und Primer sind in Tabelle 13 dargestellt.



**Tabelle 12: Pipettierschema für eine Polymerasekettenreaktion (PCR)**

<u>PCR-Reaktion</u>		
10 µL	PCR-Puffer	10 x
2 µL	dNTPs	10 mM
2 µL	Primer 1	50 pM
2 µL	Primer 2	50 pM
2 µL	DNA Template	0,05 µg/µL
1 µL	Pfu-Polymerase	2,5 U/µL
ad 100 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>	

**Tabelle 13: PCR-Konditionen zur Amplifizierung von Plasmid-DNA**

Dargestellt sind die PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von Plasmid-DNA-Fragmenten ausgehend von der genannten template-DNA sowie den verwendeten Primern in Klammern. **A** Amplifizierung der PPIB-Signalsequenz aus pcMV6-entry-PPIB (RZ696/RZ697), Amplifizierung der PPIC-Signalsequenz aus pcMV6-entry-PPIC (RZ697/RZ700). **B** Amplifizierung der kodierenden Sequenz der jeweiligen BiP-Mutante aus pcAGGSM2-BiP-IRES-GFP (RZ537/RZ538), pcAGGSM2-BiP-R197H-IRES-GFP (RZ537/RZ538), pcAGGSM2-BiP-F549-IRES-GFP (RZ537/RZ539), pcAGGSM2-BiP-N549-IRES-GFP (RZ537/RZ540), pcAGGSM2-BiP-L416D-IRES-GFP (RZ537/RZ538), pcAGGSM2-IRES-GFP-36-Kar2p (RZ541/RZ542). **C** Amplifizierung der kodierenden Sequenz für den reifen Teil von PPIC aus pcMV6-entry-PPIC (RZ694/RZ695), Amplifizierung der kodierenden Sequenz für den reifen Teil von PPIB aus pcMV6-entry-PPIB (RZ701/RZ702)

<b>A</b>	<u>PCR-Bedingung (A)</u>	<b>B</b>	<u>PCR-Bedingung (B)</u>	<b>C</b>	<u>PCR-Bedingung (C)</u>
	95 °C    2,0 min		95 °C    2,0 min		95 °C    2,0 min
	95 °C    0,5 min		95 °C    0,5 min		95 °C    0,5 min
	55 °C    0,5 min		55 °C    0,5 min		55 °C    0,8 min
	72 °C    1,0 min		72 °C    2,2 min		72 °C    8,0 min
	72 °C    2,0 min		72 °C    2,0 min		72 °C    10,0 min
	8 °C        ∞		8 °C        ∞		8 °C        ∞

Zum Überprüfen des PCR-Erfolgs wurden 5 µL des Endprodukts im Agarosegel hinsichtlich der Größe des PCR-Produkts analysiert (2.3.4). Positive PCR-Produkte wurden anschließend mit Restriktionsenzymen zur Generierung von „sticky ends“ verdaut (2.3.3) und so für eine Ligation im korrespondierenden Vektor (2.3.6) vorbereitet.

### 2.3.2.2. Gerichtete in vitro Mutagenese von Plasmid-DNA

Die Methode der PCR eignet sich nicht nur zur reinen Amplifikation von Nukleinsäuren sondern auch zum gezielten Einführen einer Mutation in die Nukleinsäuresequenz. Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingeführten Mutationen handelte es sich um zweierlei Arten der gerichteten Mutagenese

(1) Deletionen kurzer DNA-Sequenzen (Overlap-extension PCR)

Diese Sequenzen wurden durch eine vorhergehende Klonierung in der Plasmid-DNA aktiv erzeugt, um so eine geeignete Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen zu erzeugen. Dieser sogenannte „Linker“ musste jeweils in einer Folgeklonierung durch Mutagenese mittels overlap-extension-PCR entfernt werden. Gemäß Abbildung 15 wurden die Primer hierbei so entworfen, dass sie symmetrisch beidseitig des zu entfernenden Linkers an den jeweiligen DNA-Einzelstrang binden, etwa 20 bp. Im Rahmen der PCR wird somit die zu deletierende DNA-Sequenz nicht vervielfältigt.



**Abbildung 15: Entfernung einer Linkersequenz durch gerichtete in vitro Mutagenese**

Kurze DNA-Sequenzen (grün) wurden durch gerichtete in-vitro Mutagenese mittels overlap-extension-PCR entfernt. Durch den Einsatz von Primern, deren Sequenz so gestaltet ist, dass sie komplementär zur template DNA beidseitig symmetrisch der zu entfernenden DNA-Sequenz binden (Zyklus 1), wird diese kurze Sequenz nicht amplifiziert (Zyklus 2).

(2) Einbringen von Punktmutationen (Quick-change PCR)

Zur funktionellen Untersuchung bestimmter Aminosäuresequenzmotiven (3.6.3) wurde die dafür kodierende Plasmid-DNA-Sequenz punktuell mutiert. Dabei wurden kurze DNA-Sequenzen (6 bp) mittels quick-change PCR ausgetauscht. Gemäß Abbildung 16 wurden die Primer hierbei so entworfen, dass sie symmetrisch beidseitig der zu ändernden Sequenz an den jeweiligen DNA-Einzelstrang binden, etwa 20 bp. Die Sequenz der Mutation wird über die Primer in die PCR eingebracht und somit nur diese vervielfältigt.

**Template**     **ATCGAGGGGATGAGGGCAAGCTTGATGAGAAGAAGATGC**  
**TAGCTCCCTA CTCCCGTTCGAACTACTCTTCTTCTACG**

**1. Zyklus**

**ATCGAGGGGATGAGGGCAAGCTTGATGAGAAGAAGATGC**  
                   **CCCTACTCCCGCGATCGCTACTCTTCTTC**     →  
                   ← **GGGATGAGGGCGCTAGCGATGAGAAGAAG**  
**TAGCTCCCTA CTCCCGTTCGAACTACTCTTCTTCTACG**

**2. Zyklus**

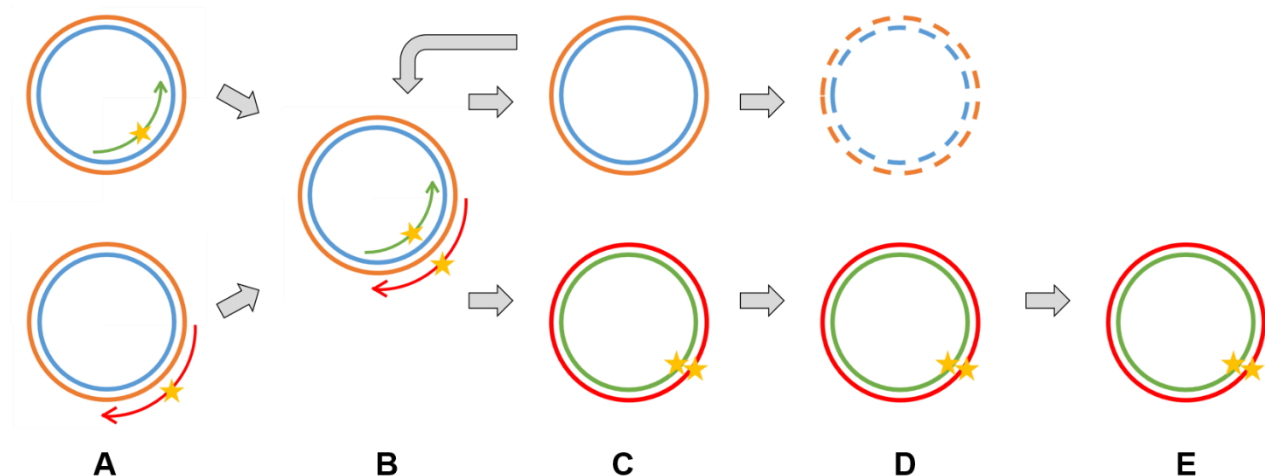
**GGGATGAGGGCGCTAGCGATGAGAAGAAG**     →  
**CCCTACTCCCGCGATCGCTACTCTTCTTC**  
  
**GGGATGAGGGCGCTAGCGATGAGAAGAAG**  
                   ← **CCCTACTCCCGCGATCGCTACTCTTCTTC**

**Abbildung 16: Einführen von Punktmutationen mittels Quick-Change PCR**

Kurze DNA-Sequenzen (grün) wurden durch gerichtete in-vitro Mutagenese mittels Quick-change-PCR ausgetauscht. Durch den Einsatz von Primern, deren Sequenz so gestaltet ist, dass sie komplementär zur template DNA beidseitig symmetrisch der zu ändernden DNA-Sequenz binden (blau, Zyklus 1), wird das diese kurze Sequenz durch die mittels Primer vorgegebene Sequenz (gelb) ersetzt (Zyklus 2).

Für beide Zwecke ist der Ablauf der PCR gleichwertig und in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Das Pipettierschema ist Abbildung 18 zu entnehmen. Die zugehörigen PCR-Konditionen sind in Tabelle 14 aufgelistet. Zunächst wurden fünf Zyklen mit jeweils nur einem der beiden nötigen Primer durchlaufen, um zuerst je einen Strang zu amplifizieren. Anschließend wurden die beiden PCR-Produkte vereinigt und weitere 18 Zyklen amplifiziert.

Die eingesetzte *Pfu*-Polymerase wirkt dabei nicht nur als DNA-Polymerase sondern auch als Exonuklease. Die Polymerase erkennt dabei Replikationsfehler und bessert diese insofern aus, als dass unpassende Nukleotide entfernt und durch passende ersetzt werden. Zum Abschluss wurde das Reaktionsprodukt mit 0,5 µL DpnI versetzt und bei 37 °C zum Restriktionsverdau inkubiert. Dies diente der Degradation noch intakter template-DNA, da das Enzym DpnI spezifisch methylierte DNA-Sequenzen erkennt und schneidet. Dadurch sollte ausschließlich mutierte cDNA erhalten bleiben.



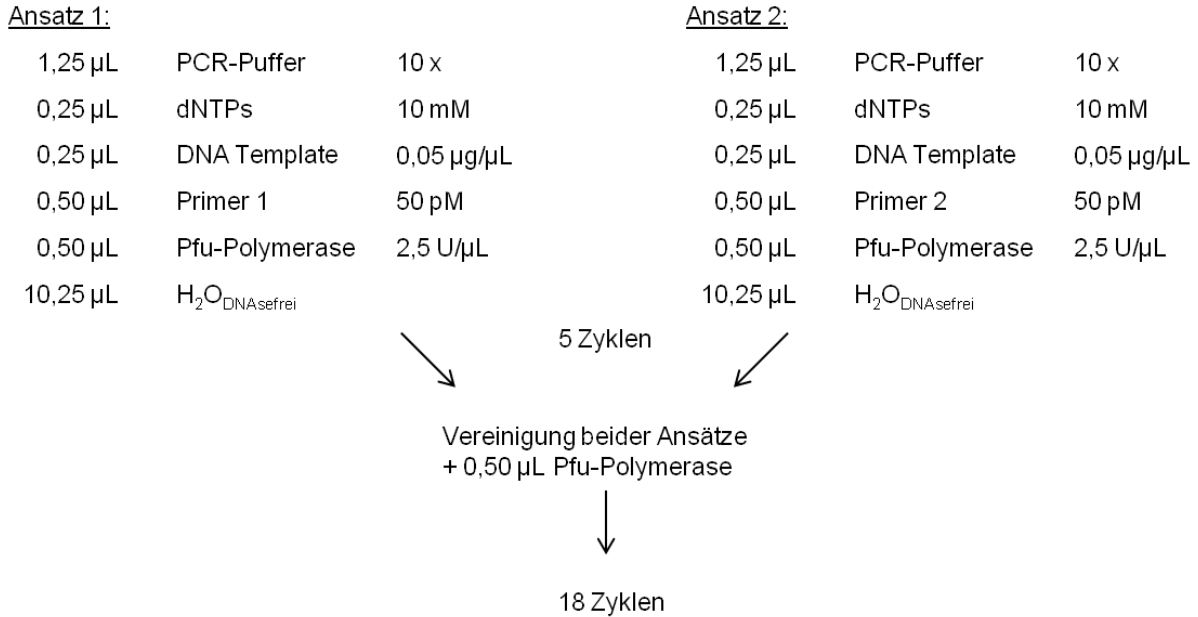
**Abbildung 17: Ablauf der gerichteten in vitro Mutagenese von Plasmid-DNA**

Zunächst wurden fünf Zyklen mit jeweils nur einem der beiden nötigen Primer durchlaufen, um zuerst je einen Strang zu amplifizieren (A). Anschließend wurden die beiden PCR-Produkte vereinigt (B) und weitere 18 Zyklen amplifiziert (C). Durch den Einsatz des Enzyms DpnI wurde methylierte DNA abgebaut (D). D.h. in der Reaktion vorhandene template DNA wurde degradiert, effizient mutierte, noch nicht methylierte DNA war dagegen resistent und als ging als Produkt der PCR hervor (E).

Innerhalb dieser Arbeit wurde diese Methode zur Klonierung folgender Plasmide verwendet:

- pcMV6-entry-PPIC-PPIB
- pcMV6-entry-PPIC-PPIC
- pcMV6-entry-mut-PPIB
- pcMV6-entry-mut-TMED5

Die verwendeten Primersequenzen sind Tabelle 7 zu entnehmen.



**Abbildung 18: Pipettierschema zur Mutagenese**

Beide Ansätze wurden zunächst separat vorbereitet und durchliefen 5 Zyklen der PCR gemäß Tabelle 14. Anschließend wurden beide Ansätze für die nächsten 18 Zyklen unter Zugabe von *Pfu*-Polymerase vereinigt. Zum Abschluss wurde die methylierte Original-DNA mittels DpnI-Restriktionsbehandlung degradiert.

**Tabelle 14: PCR-Bedingungen für Mutagenese von Plasmid-DNA**

Dargestellt sind die PCR-Bedingungen zur gezielten Mutagenese von Plasmid-DNA ausgehend von der genannten template-DNA sowie den verwendeten Primern in Klammern: pcMV6-entry-PPIC-KL-PPiB (RZ703/RZ704), pcMV6-entry-PPiB-KL-PPiC (RZ696/RZ699), mut-TMED5 (RZ725/RZ726), mut-PPiB (RZ729/RZ730 & RZ731/RZ732).

PCR-Bedingung (Mutagenese)

95 °C	2,0 min	
95 °C	0,5 min	} 5 x + 18 x
55 °C	0,8 min	
72 °C	8,0 min	
72 °C	10,0 min	
8 °C	∞	

Das PCR-Produkt wird anschließend mit der Restriktionsendonuklease DpnI behandelt. Das Enzym DpnI erkennt methylierte DNA und baut diese ab. Innerhalb einer PCR wird das Produkt nicht methyliert, was zur Folge hat, dass durch den Einsatz von DpnI nur die Template-DNA ohne durch die Mutagenese eingeführte Mutation abgebaut wird.

### 2.3.2.3. Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Diese Technik wird dazu genutzt die Wirksamkeit von siRNAs zu beurteilen. Durch die Applikation einer spezifischen siRNA wird gemäß Kapitel 2.4.4.1 die mRNA eines bestimmten Gens abgebaut. In dieser Arbeit wurde die Methode dazu verwendet um zum einen die Depletionseffizienz der gegen *TRAPB*-gerichteten siRNAs zu bewerten.

Zum anderen wurde überprüft, ob der Einsatz der gegen *TRAPB* gerichteten siRNA zu Sekundäreffekten bei anderen mRNAs führt. Um diese Fragen zu beantworten, wurden HeLa Zellen zunächst mit siRNA behandelt (2.4.4.1). Aus 5 Mio. Zellen wurde anschließend durch Anwendung des QIAmp RNA Blood Mini Kit die gesamte RNA isoliert und DNA durch Verdau mit DNaseI abgebaut. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA wurde mittels NanoDrop durchgeführt. Die Ausbeute der RNA liegt bei dieser Ausgangsmenge an HeLa-Zellen etwa bei 500 – 1000 ng/µL. Im nachfolgenden Schritt wird die RNA mit Hilfe des SuperScript VILO cDNA Synthese Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt bevor auch die neu gewonnene cDNA im NanoDrop auf Konzentration und Reinheit überprüft wurde. Zur qRT-PCR werden je 50 ng cDNA in ein Well einer MicroAMP Fast 96 Well Reaction Plate, 10 µL des TaqMan Gene Expression Mastermix sowie 1 µL Expression Assay, d.h. qRT-PCR-Primerpaare für das zu quantifizierende Gen, gegeben. In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit (2.3.2.3) wurden je verwendeter cDNA, die mittels einer siRNA manipuliert wurde, die relevanten Gene in drei technischen Replikaten in einem Experiment untersucht, einzelne Experimente zu drei biologischen Replikaten wiederholt. Im StepOnePlus Real-Time PCR System von Thermo Fisher Scientific lief anschließend die qRT-PCR für ca. zwei Stunden gemäß den Bedingungen in Tabelle 15 ab.

**Tabelle 15: Bedingungen der qRT-PCR:**

Zur qRT-PCR werden je 50 ng cDNA in ein Well einer MicroAMP Fast 96 Well Reaction Plate, 10 µL des TaqMan Gene Expression Mastermix sowie 1 µL Expression Assay gegeben. Im StepOnePlus Real-Time PCR System von Thermo Fisher Scientific lief die qRT-PCR gemäß den dargestellten Temperaturzyklen ab.

qRT-PCR-Bedingung	
50 °C	2,0 min
95 °C	10,0 min
95 °C	0,5 min
60 °C	1,0 min

} 40 x

Nach Aufschmelzen der doppelsträngigen cDNA in Einzelstränge binden die für ein zu quantifizierendes Gen spezifisch zur komplementären DNA-Sequenz. Ebenfalls bindet die TaqMan-Sonde, an welche am 5'-Ende ein Fluorophor und am 3'-Ende ein Quenchermolekül gekoppelt ist. Dabei unterbindet der Quencher durch die räumliche Nähe die Fluoreszenz des Fluorophors. Aufgrund der Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase, die ausgehend von einem Primer mit der Doppelstrangsynthese beginnt, werden Fluorophor und Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal generiert, welches als Messgröße der qRT-PCR dient. Aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der PCR-Zyklen ergibt sich einer Kurve aus welcher man „*cycle threshold*“ (ct)-Werte ermitteln kann. Diese beschreiben den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Kurve.

*ACTB* diente als Standard bei der Kalkulation der  $\Delta$ ct-Werte betreffend dem zu quantifizierenden Gen. Diese Werte wurden anschließend jeweils auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisiert, woraus sich  $\Delta\Delta$ ct-Werte ergeben. Die relative Quantität der mRNA ergibt sich aus der Kalkulation von  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . Das bedeutet, je niedriger der ct-Wert der Kurve (Fluoreszenz / Anzahl PCR-Zyklen) ist, desto mehr mRNA war im Ausgangsmaterial vorhanden.

### 2.3.3. Restriktionsanalyse von Nukleinsäuren

Grundlage für diese Methode der Analyse von Nukleinsäuren ist die Aktivität von bakteriellen Restriktionsendonukleasen. Diese haben die Fähigkeit doppelsträngige DNA an für jedes Enzym spezifischen, meist palindromischen 4-8 bp kurzen DNA-Sequenzen zu erkennen und Phosphordiesterbindungen zwischen den Nukleotiden hydrolytisch zu trennen. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um DNA durch die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen in Fragmente definierter Länge zu spalten und mittels Agarosegelelektrophorese (2.3.4) zu beurteilen. Durch den Verdau mit bestimmten Restriktionsenzymen ergeben sich kohäsive Enden, einsträngige, kurze Überhänge, die dazu genutzt werden um gleichartige sogenannte „sticky ends“ gerichtet wieder zusammenzuführen. Zur Klonierung der innerhalb dieser Arbeit hergestellten Plasmide (Tabelle 9) wurde der DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme für folgende Zwecke verwendet. Zum einen wurden Plasmide und darin zu integrierende PCR-Produkte mit Enzymen behandelt um an den Enden spezifische Schnittstellen zu erzeugen, welche im Rahmen einer Ligation zusammengefügt werden sollten (2.3.6). Dies wurde im präparativen Maßstab gemäß Tabelle 16 durchgeführt.

**Tabelle 16: Pipettierschema zum präparativen Verdau von Nukleinsäuren**

Generieren von sticky-ends für die Klonierung der Plasmide **A** pcDNA5-FRT-BiP, pcDNA5-FRT-BiP-R197H, pcDNA5-FRT-BiP-L416D, pcDNA5-FRT-BiP-F549, pcDNA5-FRT-BiP-N564, pcDNA5-FRT-Kar2p **B** pcMV6-PPIB-KL-PPIC, pcMV6-PPIC-KL-PPIB

<b>A</b>	<u>Präparativer Verdau mit BamHI / XhoI</u>	<b>B</b>	<u>Präparativer Verdau mit HindIII / BglII</u>
20,0 µL	Gereinigte PCR (Insert)	20,0 µL	Gereinigte PCR (Insert)
bzw.	bzw.	bzw.	bzw.
4,0 µg	Plasmid DNA (Vektor)	4,0 µg	Plasmid DNA (Vektor)
4,0 µL	Puffer G	4,0 µL	Puffer R
4,0 µL	BSA	4,0 µL	BSA
0,8 µL	BamHI	0,8 µL	HindIII
1,6 µL	XhoI	1,6 µL	BglII
ad 40,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>	ad 40,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

Zum anderen wurden Restriktionsnukleasen dazu verwendet, um DNA hinsichtlich Vorhandensein einer bestimmten Sequenz zu beurteilen (2.3.1). Dieser Umstand wurde im Rahmen der Klonierung der Konstrukte genutzt um zu evaluieren, ob ein bestimmtes DNA-Fragment in den Vektor eingebaut wurde oder ob ein DNA-Fragment erfolgreich entfernt wurde. Das Pipettierschema für diesen analytischen Verdau ist in Tabelle 17 gezeigt. Der Verdau erfolgte jeweils bei 37 °C für 1 h.

Vektoren wurden für präparative Zwecke im Hinblick auf eine korrekte Ligation zusätzlich 1 h mit Shrimp Alkaliner Phosphatase (NEB) behandelt.

Für eine Begutachtung der DNA-Fragmente im Agarosegel wurden für analytische Zwecke noch 2 µL, für präparative Zwecke 8 µL des 6x DNA-Probenpuffers zur Probe hinzu pipettiert.



**Tabelle 17: Pipettierschema zum analytischen Verdau von Nukleinsäuren**

Überprüfen des Erfolg der Klonierung folgender Plasmide: **A** pcDNA5-FRT-BiP, pcDNA5-FRT-BiP-R197H, pcDNA5-FRT-BiP-F549, pcDNA5-FRT-BiP-N564. **B** pcDNA5-FRT-BiP-L416D. **C** pcMV6-PPIB-KL-PPIC, pcMV6-PPIC-KL-PPIB. **D** pcDNA5-FRT-Kar2p. **E** pcMV6-PPIB-KL-PPIC, pcMV6-PPIC-KL-PPIB, pcMV6-PPIB-PPIC, pcMV6-PPIC-PPIB. **F** pcDNA5-FRT-BiP, pcDNA5-FRT-BiP-R197H, pcDNA5-FRT-BiP-L416D, pcDNA5-FRT-BiP-F549, pcDNA5-FRT-BiP-N564, pcDNA5-FRT-Kar2p

**A** Analytischer Verdau mit BglII

0,4 µg	DNA
1,0 µL	Puffer O
1,0 µL	BSA
0,2 µL	BglII
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

**B** Analytischer Verdau mit KpnI

0,4 µg	DNA
1,0 µL	Puffer KpnI
1,0 µL	BSA
0,2 µL	KpnI
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

**C** Analytischer Verdau mit HindIII / BglII (oder XhoI)

0,4 µg	DNA
1,0 µL	Puffer R
1,0 µL	BSA
0,2 µL	HindIII
0,4 µL	BglII (oder XhoI)
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

**D** Analytischer Verdau mit HindIII

0,4 µg	DNA
1,0 µL	Puffer R
1,0 µL	BSA
0,2 µL	HindIII
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

**E** Analytischer Verdau mit EcoRV / HindIII

0,4 µg	DNA
1,0 µL	Puffer R
1,0 µL	BSA
0,2 µL	HindIII
0,2 µL	EcoRV
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

**F** Analytischer Verdau mit BamHI / XhoI

0,4 µg	DNA
1,0 µL	Puffer G
1,0 µL	BSA
0,2 µL	BamHI
0,4 µL	XhoI
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

**2.3.4. Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäuren wurde in dieser Arbeit die Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt im elektrischen Feld innerhalb eines Agarosegels.

Nukleinsäuren sind aufgrund der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats innerhalb eines großen pH-Bereichs negativ geladen, weshalb der pH-Wert bei der Auftrennung eine verschwindend geringe Rolle spielt.

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt somit maßgeblich von der Molekülgröße ab, welche durch absolute Masse als auch Form (superhelikal, offen, doppel-/einzelsträngig) beeinflusst wird. Die relevanten DNA-Fragmente lagen in einem Größenbereich von 0,1 – 6 kb, daher wurde hier ein 1%iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 1,2 g Agarose mit 120 mL Tris-Acetat (TAE)-Puffer gemischt und zur vollständigen Lösung 2 min bei 800 W aufgekocht.

#### TAE-Puffer

40 mM	Tris
1 mM	EDTA
20 mM	Essigsäure

Zur Detektion der DNA-Fragmente war dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff GelRed®Nucleic acid Gel Stain (1:25.000) zugesetzt. GelRed® ersetzt dabei den ehemals eingesetzten, hoch toxischen und weniger sensitiven Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr). Strukturell sind sich beide sehr ähnlich, besteht GelRed® aus zwei über einen linearen Spacer verbundenen EtBr-Molekülen. Dadurch kann der Farbstoff mit DNA interkalieren, ist jedoch nicht membrangängig und wirkt nicht mutagen. Die Lösung wurde in die abgedichtete, horizontale Gelkammer gegossen, ein entsprechender Kamm zur Aussparung der Auftragstaschen ergänzt und ca. eine Stunde UV-geschützt aushärten gelassen. Anschließend wurde die Gelkammer in die Elektrophoresekammer gelegt, und mit TAE-Puffer vollständig bedeckt. Nach Zugabe des 6x DNA-Probenpuffers zu den DNA-Proben im Verhältnis 1:6 wurden diese in die Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 5 µL des DNA-Standards „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei 200 V ca. 2 h. Die Emission der Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe wurde im „ImageMaster®VDS“ dokumentiert. Für analytische Zwecke wurden 5 µL einer PCR-Reaktion (2.3.2.1) oder 0,4 µg Plasmid-DNA verwendet (2.3.3), für präparative Zwecke 4 µg Plasmid-DNA (2.3.3). Letztere wurde anschließend aus dem Agarosegel extrahiert und für eine Ligation der präparierten DNA-Fragmente vorbereitet.

#### **2.3.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Fällung**

Um DNA-Fragmente, welche durch Behandlung mit Restriktionsendonucleasen behandelt wurden, zu verbinden, mussten die Fragmente zunächst präparativ aufgereinigt werden. Dazu wurde DNA gemäß Kapitel 2.3.3 fragmentiert und einer Agarose-Gelelektrophorese 2.3.4 unterzogen.

Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht begutachtet und die relevante Bande mit einer sterilen Rasierklinge aus dem Gel in ein Reaktionsgefäß mit Sterilfiltereinsatz (0,22 µm) überführt. Nach Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm) wurde der Überstand gemessen und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (96 %) und 1/10 NaOAc (3 M, pH 5,2) versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -80 °C für 30 min. Bei 4°C wurde die gefällte DNA folgend für 10 min abzentrifugiert, im Vakuumkonzentrator SpeedVac getrocknet und in 10 µL TE-Puffer aufgenommen.

**Tabelle 18: Puffer zur DNA-Fällung und Lagerung nach Extraktion aus Agarosegelen**

Mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigte DNA wurde nach dem Ausschneiden aus dem Gel durch Zentrifugation in die wässrige Phase überführt. Aus dieser wurde die DNA gemäß beschriebener Zusammensetzung mit dem Puffer zur DNA-Fällung gemischt und bei -80 °C 30 min gelagert. Nach anschließender Zentrifugation und Trocknung der DNA wurde diese in TE-Puffer aufgenommen.

<u>DNA-Fällung</u>		<u>TE-Puffer</u>	
x µL	Volumen Überstand nach Zentrifugation	10 mM	Tris / HCl (pH 8)
2,5 x µL	Ethanol (96 %)	1 mM	EDTA
0,1 x µL	NaAc (3 M, pH 5,2)		

### 2.3.6. Ligation von fragmentierter DNA

Um fragmentierte DNA z.B. im natürlichen Prozess der DNA-Replikation oder DNA-Reparatur zu verknüpfen nutzt die Zelle DNA-Ligasen. Mit Hilfe dieser Enzyme werden unter ATP-Verbrauch Esterbindungen zwischen 5'-Phosphatrest und der 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers benachbarter Nukleotide ausgebildet. Diesen Mechanismus macht man sich in der gerichteten Synthese eines Zucker-Phosphat-Rückgrats zu Nutzen. Mittels rekombinant hergestellter Ligasen, in diesem Fall der T4-DNA-Ligase (Qiagen), welche von Enterobakterienphagen-T4 gebildet wird, werden mit Restriktionsendonucleasen behandelte DNA-Fragmente vereinigt. Der zur Klonierung verwendete Vektor wurde dabei zunächst mit Shrimp Alkaliner Phosphatase (NEB) behandelt, um einer Re-Ligation mit sich selbst zu vermeiden (37 °C, 1 h). Das in dieser Arbeit verwendete Pipettierschema ist Tabelle 19 zu entnehmen.

Die Proben wurden dabei auf Eis vorbereitet und anschließend zum Ablauf der Ligation über Nacht bei 20 °C gelagert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in *E. coli* Zellen transformiert (2.3.8).

**Tabelle 19: Pipettierschema zur Ligation mit Restriktionsendonucleasen behandelter DNA**

<u>Ligation</u>	
3,0 µL	Insert
0,5 µL	Vektor
1,0 µL	T4-Ligasepuffer (10x)
0,4 µL	T4-Ligase
ad 10,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>DNAsefrei</sub>

### 2.3.7. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen

Die Fähigkeit von Bakterien fremde DNA aus freier Lösung aufzunehmen nennt man Transformationskompetenz. Die Kompetenz ist unter natürlichen Bedingungen nur gering effizient für die in 2.1.8 dargestellten Bakterienstämme. Durch das folgende Prozedere wurden die Bakterien dahingehend behandelt, die Permeabilität ihrer Zellmembran zu erhöhen und damit die Transformationseffizienz erheblich zu steigern. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist Tabelle 20 zu entnehmen, beide werden steril filtriert.

**Tabelle 20: Puffer zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen**

<u>Puffer 1</u>		<u>Puffer 2</u>	
30 mM	KOAc	10 mM	MOPS (freie Säure)
100 mM	RbCl <sub>2</sub>	10 mM	RbCl <sub>2</sub>
10 mM	CaCl <sub>2</sub>	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 mM	MnCl <sub>2</sub>	15 % (v/v)	Glycerin
15 % (v/v)	Glycerin		
ad 800 mL	H <sub>2</sub> O	ad 100 mL	H <sub>2</sub> O
pH 5,8	Essigsäure	pH 6,5	KOH

Diese enthalten CaCl<sub>2</sub>, dem für die Kompetenzsteigerung entscheidenden Reagenz nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Zunächst wurde zur Selektion einer Einzelkolonie ein Verdünnungsausstrich von *E. coli* Zellen auf einer LB-Platte durchgeführt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Eine Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und zur weiteren Kultivierung in 10 mL LB-Medium in einem 100 mL Kolben überführt, erneut bei 37 °C über Nacht im Rotationsschüttler inkubiert. 2 mL dieser Vorkultur wurden in 200 mL LB-Medium bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 - 0,7 kultiviert. Nach Zentrifugation bei 4 °C / 5 min / 6000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 80 mL des vorgekühlten Puffer 1 resuspendiert.

Nach 5 min Inkubationszeit folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt gemäß dem vorherigen. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 8 mL des Puffers 2 resuspendiert und anschließend in Ansätze à 100 µL – 500 µL aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zum Test der Transformationseffizienz wurden 100 µL der neu kultivierten Bakterienzellen sowie 10 pg Bluescript Plasmid-DNA (Resistenzmarker: Amp) zur Transformation gemäß 2.3.8 verwendet. Dieser Ansatz wurde auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert, über Nacht bei 37 °C gelagert und anschließend die sich auf der Platte befindlichen Einzelkolonien gezählt, welche in Relation zur zu transformierenden DNA gesetzt wurden.

### **2.3.8. Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA**

Zur Vervielfältigung z.B. der durch PCR mutagenisierte 2.3.2.2 oder durch Ligation verbundene 2.3.6 Plasmid-DNA nutzt man die Fähigkeit von sich schnell teilenden Bakterien neben ihrer eigenen DNA auch eingeführte Fremd-DNA zu replizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene *E. coli* Stämme verwendet (2.1.8), welche bei -80°C gelagert wurden. Die Stämme JM101 und DH5α wurden zu je 100 µL auf Eis aufgetaut und entweder mit 5 µL Ligationsansatz, 5 µL einer PCR oder 0,5 µg DNA versetzt. Vom *E. coli* Stamm XL1-Blue wurden je 50 µL auf Eis aufgetaut, mit 0,88 µL β-Mercaptoethanol versetzt und im Abstand von 2 min fünfmal neu durchmischt bevor DNA hinzugegeben wurde. Die Zellen hatten nun 30 min Zeit die Fremd DNA aufzunehmen. Durch den anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 s bei XL1-Blue-Zellen für 90 s bei JM101 bzw. DH5α-Zellen sollte diese Kompetenz erhöht werden.

Die Zellen wurden danach zwei Minuten auf Eis gehalten bevor sie eine Stunde in 500 µL in geeignetem Medium bei 37 °C unter Rotation inkubierten. Für JM101 und DH5α-Zellen ist dabei LB-Medium geeignet, XL1-Blue-Zellen werden zunächst in SOC-Medium kultiviert. Die weitere Kultivierung ist in 2.3.9 beschrieben.

### **2.3.9. Kultivierung von *E. coli* Zellen**

Zur Selektion der Zellen, die erfolgreich die mit Fremd-DNA manipuliert wurden (2.3.8), wurde der jeweilige Transformationsansatz, auf einer LB-Platte ausgestrichen. Diese Platte wurde zusätzlich mit dem Antibiotikum versetzt, für welches ein Resistenzmarker in der zu replizierenden dem Bakterium fremden DNA kodiert.

Anschließend wurden die Platten bei Verwendung des Bakterienstamms JM101 für 16 h, bei DH5 $\alpha$  und XL1-Blue für mindestens 24 h bei 37 °C gelagert. Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in 2 mL TB-Medium + Antibiotikum (100  $\mu$ g/mL) für den Bakterienstamm passenden Zeitraum bei 37 °C im Rotationsschüttler inkubiert und so für eine Präparation im kleinen Maßstab (2.3.10.1) vorbereitet.

Zur Vorbereitung auf eine Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen im mittleren Maßstab (2.3.10.2) werden die in 2.3.8 transformierten Zellen unabhängig vom verwendeten Bakterienstamm, in einen 100 mL gefülltem LB-Medium 1 L Kolben überführt und in diesem unter Verwendung von JM101 über Nacht, von DH5 $\alpha$  und XL1-Blue für 24 h bei 37 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Das Medium wurde zusätzlich mit dem im Plasmid kodierten Resistenzmarker entsprechenden Antibiotikum (100  $\mu$ g/mL) versetzt.

### **2.3.10. Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen**

Um im Zuge einer Klonierung mittels Restriktionsfragmentanalyse zu überprüfen, ob eine Kolonie korrekte DNA enthält, musste zunächst im kleinen Maßstab durch eine DNA-Minipräparation die in den Bakterienzellen enthaltene DNA isoliert werden (2.3.10.1).

Plasmid-DNA, die im mittleren Maßstab amplifiziert werden sollte, wurde durch eine DNA-Midipräparation aus den Bakterienzellen gereinigt.

#### **2.3.10.1. DNA-Minipräparation**

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen im kleinen Maßstab lief wie folgt ab. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist Tabelle 21 zu entnehmen. Zunächst wurde die 2 mL Kultur geerntet durch Zentrifugation für 45 s bei 13.200 rpm, nach Verwerfen des Überstands das Pellet in 100  $\mu$ L GTE-Puffer aufgenommen und durch vortexen resuspendiert. Dadurch wurden bivalente Kationen gebunden und die Zellmembran verlor an Stabilität. Durch die alkalische Lyse, d.h. der Zugabe von 200  $\mu$ L SDS / NaOH-Puffer wurden Phospholipid und Proteinkomponenten der Zellmembran gelöst und sowohl Plasmid-DNA als auch chromosomale DNA durch Lösen der Wasserstoffbrücken in Einzelstränge aufgespalten. Der anschließende Zusatz von 150  $\mu$ L NaOAc (3 M) führte zur Neutralisation des pH-Werts und dadurch zu einer irreversiblen Denaturierung der chromosomalen DNA, wobei die Plasmid DNA ihre Fähigkeit zur Renaturierung behielt. Diese wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion (400  $\mu$ L) gereinigt.

Dabei wurden nach ausreichender Durchmischung und anschließender Zentrifugation (2 min, 14.000 rpm) Proteine von Nukleinsäuren abgetrennt. Letztere gingen in die obere, wässrige Phase über, welche abgenommen und in absoluten Ethanol zur Fällung überführt wurde. Nach der Zentrifugation (2 min, 14.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen, das Nukleinsäurepellet getrocknet und in 50 µL des TE-RNase-Puffers aufgenommen. Durch Behandlung der Mischung bei 56 °C für 3 min wurde das Pellet gelöst und die vorhandene RNA durch Inkubation für 30 min bei 37 °C abgebaut. Anschließend konnte die DNA gemäß 2.3.3 zur Restriktionsanalyse verwendet werden.

**Tabelle 21: Puffer zur DNA-Minipräparation**

<u>GTE-Puffer</u>		<u>Lysepuffer</u>		<u>TE-RNase-Puffer</u>	
50 mM	Glucose	1 % (v/v)	SDS	10 mM	Tris / HCl (pH 8)
10 mM	EDTA	0,2 M	NaOH	1 mM	EDTA
25 mM	Tris / HCl (pH 8)			70 nM	RNaseA

### 2.3.10.2. DNA-Midipräparation

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurde mit Hilfe des Jetstar Midi Preparation Kit (Genomed) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Vorgehensweise gleicht dem der DNA-Minipräparation (2.3.10.1), Ernte und alkalische Lyse der Zellen läuft in gleichem Schema ab. Die DNA wird danach jedoch auf einer Säule nach Prinzip des Anionenaustauschers gereinigt und mit einem Puffer mit hohem Salzgehalt kompetitiv eluiert.

### 2.3.11. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Isolierte DNA wurde nach der präparativer Isolation aus *E. coli* Zellen in Konzentration und Reinheit überprüft. Genauso dienten im Zuge der qRT-PCR-Experimente RNA sowie cDNA als zu analysierende Proben. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000, einem küvettenfreien UV-VIS-Spektrometer durchgeführt. Dabei sind Probenvolumina von 1-2 µL zur Analyse ausreichend. Im Spektrometer wird die Extinktion im Spektrum von 220 nm – 350 nm aufgenommen. Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm auf.

Zur Beurteilung der Reinheit der DNA wird der Quotient der Extinktion bei 260 und 280 nm und damit das Extinktionsverhältnis gebildet. Bei reiner DNA liegt das Extinktionsverhältnis  $E_{260/280}$  im Bereich von 1,7 – 1,9, Werte darunter weisen auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen bzw. Phenol hin. Ein Extinktionsverhältnis  $E_{260/280}$  von ca. 2,0 weist eine reine RNA-Probe nach. Ebenso lässt sich mit Hilfe der Extinktionsmessung über das Lambert-Beer'sche Gesetz die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmen.

### **2.3.12. Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Zur finalen Kontrolle einer Klonierung oder genereller Sequenzüberprüfung für weitere Experimente einzusetzender Plasmid-DNA wurden die selbigen einer Sequenzierung unterzogen. Zu diesem Zweck wurden 1 µg der zu sequenzierenden DNA an MWG Eurofins gesendet zusammen mit den in Tabelle 7 gelisteten Sequenzierprimern.



## 2.4. Zellkulturmethoden

Um Prozesse, die in einem Organismus ablaufen gezielt in geeignetem Maßstab untersuchen zu können, werden Zellen eines Gewebes isoliert aufgearbeitet und in Kultur gehalten. Dadurch können sie in Zellkulturexperimenten verwendet werden, um als Modell für den jeweiligen Organismus dienen oder auch zur Herstellung von therapeutischen Proteinen. In dieser Arbeit wurde mit HeLa-Zellen gearbeitet. Bei diesen handelt es sich um Zelllinien ausgehend von Zellen des Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks aus dem Jahre 1952. Diese sind weniger anspruchsvoll was die Kultivierungsbedingungen angeht im Vergleich zu primären Zellen, weisen jedoch nicht eine genaue in-vivo Abbildung auf. Dennoch eignen sich diese Zelllinien sehr gut um unter standardisierten Bedingungen Prozesse innerhalb der humanen Zelle zu untersuchen um dadurch grundlegende molekulare Mechanismen besser zu verstehen und aufzuklären.

### 2.4.1. Kultivierung von Säugerzellen

In dieser Arbeit wurden verschiedene adhärente Säugerzellen zur Charakterisierung molekularer Prozesse des ER verwendet (2.1.9). Alle Zellen wurden bei 37 °C in einer humiden Umgebung mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, in für jede Zellart spezifischen Medien. Zum einen wurden HeLa-Zellen (DSM Nr. ACC 57) genutzt, um genetische Manipulation insofern durchzuführen, als dass die Expression bestimmter Gene mittels RNAi reduziert wurde, durch Transfektion mit Plasmid-DNA selbige Expression erhöht bzw. das Protein BiP durch Toxinapplikation gespalten wurden. Die Zellen wurden im Vorfeld in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (GE Healthcare) kultiviert.

DMEM diente ebenfalls als Medium für die zum anderen verwendeten primären Fibroblasten von CDG-Patienten. Diesem wurde neben 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (GE Healthcare) zugesetzt und enthielt darüber hinaus noch Glucose (1 g/L), L-Glutamin und Natrium-Pyruvat (HyClone, GE Healthcare). Diese Zellen wurden genutzt um die Effekte der chronischen Depletion von TRAP-Untereinheiten mit denen Effekten zu vergleichen, welche aufgrund der Manipulation mit gegen *TRAPB* gerichteter siRNA hervorgerufen wurden.

Zur Selektion der Zellen, die erfolgreich die Sequenz der jeweiligen Mutante für BiP mittels Flp-In-System in das eigene Genom integriert haben, musste das DMEM-Medium neben 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin auch mit Hygromycin versetzt werden.

Dies diente als Selektionsantibiotikum, für welches im Rekombinationsplasmid ein Selektionsmarker kodierte. Die Manipulation der stabilen Flp-In-Zelllinien ist in 2.5.1 genauer erläutert.

Mit Konfluenz bezeichnet man die als dichtest mögliche Anordnung von adhärenenten Zell an der Oberfläche eines Kulturgefäßes. Dies möchte man weitestgehend vermeiden, da die Zellen durch diese enge Anordnung keinen Zugang zu den lebensnotwendigen Nährstoffen, die sich im Medium befinden, erhalten. Aus diesem Grund und wegen der Halbwertszeit der Antibiotika wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert und in frischem Medium weiter kultiviert. Dabei wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen und Trypsin/EDTA hinzugegeben. Bei 37 °C konnte das Enzym aktiv werden und die Zellverbindungen zum Kulturgefäß lösen.

EDTA wirkt dabei unterstützend, chelatiert  $\text{Ca}^{2+}$  welches als Stabilisator der Adhäsionsproteine, den Cadherinen, dient, und somit die Proteolyse durch Trypsin effizienter gestaltet. Nach 5 min Inkubation wurden die abgelösten Zellen im Medium resuspendiert, ein bestimmtes Volumen der Zellsuspension zurück in das Kulturgefäß gegeben und frisches Medium hinzugefügt. Das Volumen der Zellsuspension war abhängig vom gewünschten Splitverhältnis, welches bei einfacher Kultivierung der Zellen bei 1:10 liegt. Bereitete man für den Folgetag den Beginn eines funktionellen Assays vor, bei welchem beispielsweise Proteine mittels siRNA-Behandlung depletiert werden sollten, war es gewünscht, dass die Zellen subkonfluent und dabei metabolisch hochaktiv in der exponentiellen Wachstumsphase vorliegen. Zu diesem Zweck wurde bei der Passagierung am Tag zuvor ca. die Hälfte der Zellen subkultiviert.

### **2.4.2. Zellernte und Zellzählung**

Die Quantifizierung der Zellen war innerhalb dieser Arbeit aus mehreren Gründen wichtig. Da für die Durchführung der funktionellen Assays immer mit der gleichen Menge an Zellen begonnen wurde, musste das auszusäende Zellsuspensionsvolumen zunächst bestimmt werden. Zur weiteren Beurteilung der Zellproliferation und Viabilität nach Abschluss des Versuchs, wurde auch die Anzahl lebender Zellen zum Versuchsende dokumentiert. Die Anzahl geernteter Zellen war auch für das einzusetzende Volumen des Zellaufschlusspuffers determinierend. Durch diesen wurde die Zellkonzentration immer auf gleiche Art und Weise eingestellt, sodass auch folgende Analysen, wie z.B. die Auftrennung mittels SDS-PAGE bzw. Western Blot unter standardisierten Bedingungen abliefen.

Zur Ernte der Zellen wurden diese wie in 2.4.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Zellen, welche in einer 6 cm Schale kultiviert wurden, wurden in einem mL DMEM resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Bei Ernten einer gesamten Kultur einer 75 cm<sup>2</sup>-Flasche, wurden die Zellen in 10 mL DMEM resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Um nun die Zellanzahl pro Volumen zu bestimmen, wurden 10 µL der Zellsuspension entnommen und 1:1 mit einer Trypanblaulösung gemischt. Trypanblau ist ein zytotoxischer Farbstoff, der in perforierte Zellen eindringt und diese Zellen dadurch blau färbt. Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen. Die Trypanblau/Zellsuspensionsmischung wurde anschließend in einem zum Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific) passenden Objektträger überführt. Mit Hilfe dieses elektronischen Zellzählgeräts wurde die Probe hinsichtlich Zellgröße, Helligkeit und Kreisförmigkeit analysiert. Die Zellzählung basiert dabei auf dem Prinzip der Neubauer Zählkammer. Für jeden Zelltyp wurden Toleranzbereiche dieser Größen im Vorfeld festgelegt, wodurch die Bewertung durch das Gerät automatisiert ablaufen konnte. Nach der Quantifizierung wurden die Zellen entweder im definierten Maßstab für Zellkulturexperimente neu ausgesät (2.4.4) oder in Hinblick auf Quantifizierung bestimmte Proteine (2.2) bzw. Nukleinsäuren (2.3.2.3) vorbereitet.

### **2.4.3. Kryokonservierung von Säugerzellen**

Um Zellen über einen langen Zeitraum zu konservieren, bedient man sich der Methode der Kryokonservierung. Darunter versteht man die Lagerung von Zellen in speziellen Kryotubes in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden Zellen gemäß 2.4.2 geerntet und gezählt. Je 4 Mio. Zellen wurden pelletiert und in einem eiskaltem Puffer aus DMEM und 40 % FCS (750 µL) in einem vorgekühlten Kryotube resuspendiert. Unter ständigem Schwenken wurden weitere 750 µL des Puffers aus DMEM und 20 % DMSO hinzu pipettiert. DMSO wirkt dabei als Gefrierschutz für die Zellen. Das Einfrieren der Zellen muss sehr langsam erfolgen, da man sonst Eiskristallbildung provoziert, die zur irreversiblen Schädigung der Zellen führt. Dies kann entweder in evaporierendem Stickstoff erfolgen, in welcher es zur Abkühlung um 1 °C pro Minute kommt. Eine andere Möglichkeit ist die Lagerung der Kryotubes in einer speziellen Einfrierbox, welche in eine -80 °C Tiefkühltruhe platziert wird und somit dadurch der Temperaturunterschied gepuffert wird. Unabhängig von Methode werden die Kryotubes nach 2 h in die Stammsammlung des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie überführt und im flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Das Auftauen musste im Gegensatz zum Einfrieren sehr schnell erfolgen. Dazu wurde eine Kryokultur aus der Kollektion entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Dieser Vorgang dauerte nur wenige Minuten.

Die Zellsuspension wurde nun schnell in vorgewärmtes Medium überführt und die verdünnte Suspension zentrifugiert. Das Medium, welches noch DMSO enthielt, wurde abgenommen, das Zellpellet in frischem DMSO-freiem Medium resuspendiert und in einer geeigneten Zellkulturflasche kultiviert.

#### **2.4.4. Zellmanipulation**

Zur Untersuchung der in dieser Arbeit adressierten Fragestellungen, war es nötig die zur Verfügung stehenden Zellen als Modellorganismus in verschiedener Art und Weise zu manipulieren um die daraus resultierenden Effekte zu analysieren. Die Methoden, mit welchen die Zellen manipuliert wurden, sind im folgenden Kapitel näher erläutert.

##### **2.4.4.1. Zellmanipulation mittels siRNA**

Durch posttranslationale Modifikationen nach dem Muster der RNA-Interferenz wird die Expression bestimmter Gene gezielt sequenzspezifisch reduziert (Fire, Mello, 1998). Zur gezielten mRNA-Reduktion und folglich zur Depletion bestimmter Proteine wurden innerhalb dieser Arbeit „small interfering“ RNAs (siRNAs) verwendet. Diese werden dadurch gebildet, dass zunächst lange, doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) mit Hilfe eines Transfektionsreagenzes in die Zelle eingebracht werden. Durch Aktivität einer RNase, dem sogenannten Dicer, werden ca. 21 bp lange doppelsträngige, nichtkodierende RNA -Fragmente mit kurzem 3'-Überhang erzeugt, die als siRNA bezeichnet werden. Im Folgenden erfüllt nur einer der beiden Stränge eine Funktion: Unter Verlust des ersten Strangs erfolgt der Einbau des zweiten Sequenzstrangs der siRNA in einen Proteinkomplex, wodurch der sogenannte „RNA-induced silencing complex (RISC)“ ausgebildet wird. Der gebundene siRNA-Strang leitet den gesamten Komplex zur Ziel-mRNA und hybridisiert mit der komplementären Sequenz durch passende Basenpaarung. In diesem Komplex ist eine Endonuclease enthalten, welche zur Spaltung der mRNA und folgend zum Abbau durch zelluläre RNAsen führt. Nach Dissoziation des mRNA-Antisensestrangs und dem RISC ist letzterer wieder fähig mit einer weiteren Ziel-mRNA zu interagieren.

Durch Einsatz dieser Methode der RNA-Interferenz ist es möglich gezielt einzelne Genfunktionen zu analysieren und somit auf eine aufwendige Etablierung von möglicherweise letalen Knock-out-Zelllinien zu verzichten.

Zu beachten ist jedoch, dass es durch Manipulation der Genexpression mittels siRNA lediglich zur Degradation der entsprechenden mRNA kommt, was aufgrund der Halbwertszeit der siRNA wieder revidiert werden kann. Daher ist eine zeitliche Überwachung der resultierenden Proteinmenge zur Validierung einzelner siRNAs im Vorfeld unabdingbar um einen möglichst effizienten Depletion zu gewährleisten. Um den induzierten Knock-down nachweisen und quantifizieren zu können wurden jeweils auch Zellen gleichermaßen mit Kontroll-siRNA transfiziert. Diese siRNA weist keine bekannte Homologie zu humanen Sequenzen auf und wird daher als Negativkontrolle verwendet.

Zur gezielten Proteindepletion wurden zunächst subkonfluente HeLa-Zellen aus den Zellkulturflaschen geerntet und gezählt (2.4.2). Das Volumen an Zellsuspension in welchem sich 520.000 Zellen befanden wurde in eine 6 cm Zellkulturschale überführt und mit vorgewärmtem Medium auf 4 mL aufgefüllt. Pro Schale wurde ein separater Transfektions-Ansatz vorbereitet, der folgendermaßen pipettiert wurde:

### Transfektion mit siRNA

100 µL	OptiMEM
10 – 35 nM	siRNA
20 µL	HiPerfect

Nach mischen und 10 minütiger Inkubation, wurde der Ansatz zu den in die Zellkulturschale vorgelegten Zellen getropft. Nach 24 h Kultivierung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und ein gleichermaßen vorbereiteter Transfektions-Ansatz zu den Zellen gegeben („Nachsilencing“). Der Transfektionszeitraum wurde im Vorfeld für jede siRNA passend determiniert. Nach gewöhnlich 96 h erfolgte die Zellernte, Zählung und Weiterverarbeitung des Zellpellets gemäß der folgenden Anwendung (2.3.2.3, 2.4.5). Um den Transport von Polypeptiden in das ER zu untersuchen (2.4.6), welcher potentiell von der Komponente abhängig ist, die mittels RNAi gehemmt wurde, erfolgte im Zeitraum zwischen Nachsilencing und Ernte eine Zellmanipulation mittels für das Polypeptid kodierende Plasmid-DNA (2.4.4.3).

#### 2.4.4.2. Zellmanipulation mittels Toxin

Bei der Betrachtung der Funktion des Hsp70-Chaperons BiP ergeben sich verschiedene Punkte, die es zu beachten gilt (1.3.5.1). Durch den Einsatz von siRNA für mehr als 48 h kann es aufgrund des eingesetzten Transfektionsreagenz oder der aufgrund reduzierten Genexpression mittels RNAi verminderten Komponenten in der Zelle zur Stressantwort der Zellen (UPR) kommen. Innerhalb dieser spielt BiP eine entscheidende Rolle und wird vermehrt exprimiert. Durch diese Gegenregulation ist der Einsatz von siRNA zur Depletion von BiP schwieriger als zur Depletion anderer Proteine. Schäuble (2013) zeigte, dass der Gehalt an BiP in der Zelle nach einer Depletionszeit von 72 h wieder ansteigt und der Proteingehalt auf maximal 25 % reduziert werden kann. Eine sehr viel schnellere und effizientere Möglichkeit den BiP-Gehalt zu reduzieren ist durch die Anwendung des AB<sub>5</sub> Subtilase Cytotoxins (SubAB). Die Reduktion passiert hierbei nicht auf posttranskriptionaler Ebene, sondern auf Proteinebene. AB<sub>5</sub>-Toxine werden von pathogene *E. coli* Bakterien produziert. Die Gruppe der Shigatoxin produzierenden *E. coli* (STEC) kann ernste gastrointestinale Krankheiten auslösen, wie z.B. das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) (Paton, et al., 2006). Das Cytotoxin SubAB besteht aus der katalytischen Untereinheit A und einem pentameren Ring der B-Untereinheiten, zuständig für die Substratbindung. Die Untereinheit A ist eine Serinprotease, die spezifisch das Protein BiP an Position 416 schneidet und dadurch inaktiviert. Durch die Punktmutation innerhalb der Aminosäuresequenz der katalytischen Untereinheit an Position 272 von Serin zu Alanin wird die Wirkung des SubAB-Toxins aufgehoben (SubA<sub>A272</sub>B). Andererseits erwirkt die Mutation an Position 416 von Leucin zu Asparaginsäure der BiP-Aminosäuresequenz eine Resistenz gegen die Spaltung durch SubAB (Paton & Paton, 2010). Zur Inaktivierung von BiP durch Anwendung des SubAB-Toxins wurde wie folgt vorgegangen: HeLa Zellen wurden zunächst in einer 6 cm Schale kultiviert. Im Rahmen eines Transportexperiments (2.4.6) wurden 15 h nach der Plasmidtransfektion der Zellen die 4 mL Medium abgenommen und durch 1,6 mL frisches Medium ersetzt. 1,8 µL der SubAB-Stammlösung (10 mg/mL) wurden in 200 µL DMEM vorverdünnt und zu den zu manipulierenden Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden (2.5.3) oder neun Stunden, sofern die Applikation des Toxins im Rahmen eines Transportexperiments (2.4.6) erfolgte. Die Arbeiten unter Verwendung des Toxins erfolgten immer unter strenger Beachtung der relevanten Sicherheitsaspekte. Dazu zählten die Verwendung doppelter Handschuhe, arbeiten ausschließlich in einem speziell für diese Anwendung bestimmten Bereich, separate Entsorgung aller Materialien die mit den behandelten Zellen in Kontakt kamen.

### 2.4.4.3. Zellmanipulation mittels Plasmid-DNA

Das Einbringen von Plasmid-DNA war in dieser Arbeit aus mehreren Gründen notwendig: Zum einen für sogenannte Rescue-Experimente. Dabei wurde zunächst ein bestimmtes Protein depletiert durch Transfektion der Zellen mit einer geeigneten siRNA, welche komplementär zu einer Sequenz im untranslatierten Bereich war. Dadurch wurde der Gehalt des durch das Gen kodierten Proteins drastisch reduziert. Um diesen Effekt zu retten wurden die Zellen zusätzlich mit einer plasmidkodierten cDNA transfiziert, welche den kodierenden Bereich des depletierten Proteins unter Zugabe des Transfektionsreagenz FuGeneHD in die Zelle einschleuste. Da diese cDNA keine für die siRNA zugängliche Sequenz aufwies, konnten beide Manipulationen unabhängig voneinander durchgeführt werden. Oftmals war im Plasmid zusätzlich ein C-terminal zum Gen anhängender Tag kodiert, sodass eine direkte Unterscheidung zwischen endogen und plasmidkodiertem Protein auf Western Blot Ebene möglich und die Überexpression quantifizierbar war.

Eine andere Anwendung der Zellmanipulation mit Plasmid-DNA war im Rahmen der Translokationsstudien aus Kapitel 2.4.6. In diesem Fall kodierte die eingebrachte plasmidgetriebene cDNA für ein Polypeptid, welches zur vollständigen Prozessierung im ER abhängig von bestimmten Komponenten der Translokase war. Diese Polypeptide wurden dabei als Modellsubstrate der jeweiligen Translokasebestandteile verwendet. Im Zuge der Transportstudien wurden dazu betreffende Komponenten der Translokase unter Einsatz von siRNA depletiert oder SubtilaseAB-Toxin im Falle der Depletion des Hsp70-Chaperons BiP.

Im Anschluss an die siRNA vermittelte Proteindepletion wurden die zu transportierenden Substrate über Plasmid-DNA Transfektion mit der dafür kodierenden cDNA in die Zelle eingebracht und die Prozessierung auf Western Blot Ebene weiter untersucht.

Zur Transfektion der HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz FuGeneHD (Promega) eingesetzt. Im Vorfeld wurden Zellen in 6 cm Zellkulturschalen kultiviert und gegebenenfalls mittels siRNA oder Toxin manipuliert (2.4.4.1, 2.4.4.2). Sofern darauf verzichtet wurde, wurden  $1 \cdot 10^6$  ausgesät und nach 24 h ein Mediumwechsel vorgenommen. Letzterer erfolgte routinemäßig vor jeder Plasmid-Transfektion. Dabei wurde pro mit Transfektionsansatz zu versetzender Schale ein eigener Ansatz vorbereitet:

#### Transfektion mit Plasmid

230 $\mu$ L	OptiMEM
4 $\mu$ g	Plasmid-DNA
16 $\mu$ L	FuGeneHD

Die Komplexierung der cDNA und des Transfektionsreagenz erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz zu den Zellen der sich in der Kulturschale befindlichen Zellen getropft und die Zellen weiter kultiviert.

Die Expressionszeit sowie das Verhältnis von Plasmid-DNA zu Transfektionsreagenz wurden im Vorfeld für jedes Substrat validiert. Dabei zeigte sich eine Expressionszeit von 24 h – 48 h sowie ein generelles Verhältnis von Plasmid-DNA zu FuGeneHD von 1 µg : 4µL als sinnvoll.

#### 2.4.5. Präparation des geernteten Zelllysats

Um nun die Effekte, welche die Manipulation der Zellen erwirkte, zu analysieren und dazu mittels Western Blot und immunologischer Detektion von Proteinen selbige quantifizieren zu können, mussten die manipulierten Zellen zunächst aus dem Zellkulturgefäß geerntet werden (2.4.2). Die Zellen wurden zur Behandlung mit beeinflussenden Reagenzien (2.4.4) im 6 cm Maßstab kultiviert, in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß geerntet und mit Hilfe des „Countess Automated Cell Counter (Invitrogen)“ gezählt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (2 min, 3000 rpm) pelletiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, die Zentrifugation wiederholt. An dieser Stelle konnten die Pellets entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

Bei direkter Weiterverarbeitung der Probe, wurde das Zellpellet folgendermaßen aufgearbeitet. Der Zellaufschluss und Abbau der DNA wurde zunächst durch Resuspendieren des Pellets im Lysepuffer und Inkubation unter Rotation (600 rpm) bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf) durchgeführt. Das zugesetzte Volumen war dabei abhängig von der geernteten Zellzahl. Das Endvolumen der Probe sollte eine Konzentration von 10.000 Zellen/µL aufweisen. Dazu wurde die Probe 80 % des nötigen Endvolumens an Lysepuffer versetzt, die restlichen 20 % wurden durch 5x Lämmli aufgefüllt und bei 56 °C für 15 min gekocht. In Folge dieser Präparation war die Probe für die SDS-PAGE (2.2.1) einsetzbar.

<u>Lysepuffer</u>	<u>PLAC</u>
100 mM NaCl	3 mg/mL Pepstatin A
100 mM Tris (pH 8,0)	3 mg/mL Leupeptin
30 mM MgCl <sub>2</sub>	3 mg/mL Antipain
5 % (v/v) Nonident P-40	3 mg/mL Chymostatin
1:1000 PLAC	in DMSO
0,1 mM PMSF	
0,1 mg/mL DNAse	
in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	



#### 2.4.6. Untersuchung des Transports von Polypeptiden in intakten Zellen

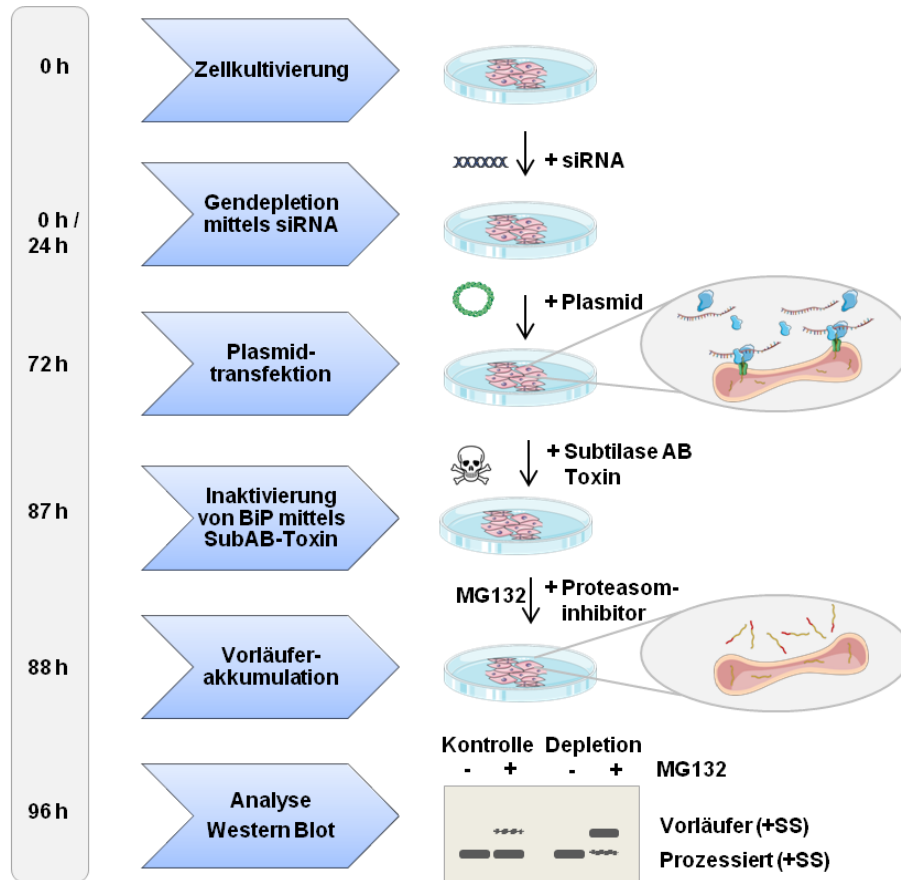
Um die Abhängigkeit von einzelnen ER-Komponenten zum Transport bestimmter Polypeptide durch die ER-Membran und der folgenden Prozessierung zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Transportstudien in intakten HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei bediente man sich den in 2.4.4 erläuterten Methoden der Zellmanipulation. Im Hinblick auf die Fragestellung, ob ein bestimmtes ER-Protein für den Transport oder die weitere Prozessierung nötig ist, wurde mittels siRNA die entsprechende mRNA, welche für das zu untersuchende Protein kodiert, depletiert.

Im Spezialfall des Hsp70-Chaperons BiP, wurde die Depletion durch das SubtilaseAB Toxin hervorgerufen. Neben der Involvierung von BiP in den Transport einzelner Substrate sollte vor allem die Funktion des TRAP-Komplexes untersucht werden. Durch die Depletion der *TRAPB*-Untereinheit des Komplexes konnte eine Degradation des gesamten Komplexes nachgewiesen werden, wobei die *TRAP $\alpha$* -Untereinheit noch einen Restgehalt von ca. 30 – 40 % aufwies. Daher wurden auch eine Kombination aus einer gegen *TRAPB* und *TRAPA* gerichteten Depletion angewendet.

Ausgehend von den Ergebnissen der Cryo-EM-Studien sowie der Proteomanalyse, gab es Hinweise darauf, dass der TRAP-Komplex am Gating von Sec61 $\alpha$  in ähnlicher Weise beteiligt ist, wie es für BiP nachgewiesen wurde. Möglicherweise können beide für bestimmte Substrate füreinander kompensieren. Um dies zu untersuchen wurden auch Experimente durchgeführt, in welchen sowohl die TRAP-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  durch siRNA-Applikation depletiert wurden als auch SubtilaseAB-Toxin vermittelt BiP.

Gemäß Abbildung 19 ist die zeitliche Abfolge innerhalb eines Transportexperiments wie folgt: HeLa Zellen wurden vorbereitend zur ersten Behandlung mit siRNA im 6 cm Maßstab ausgesät (2.4.4.1). Nach 24 h wurde die Manipulation mit siRNA wiederholt.

Die Zellen wurden nach 72 h mit dem Plasmid transfiziert, welches für das Vorläufer-Polypeptid des zu untersuchenden Substrats kodiert (2.4.4.3). Zur Inaktivierung des ER-luminalen Chaperons BiP wurden die Zellen 9 h vor Ernte mit dem Cytotoxin SubAB versetzt (2.4.4.2). Zur Akkumulation des Vorläufers Polypeptids im Cytosol wurde gemäß 2.4.6.1 der Proteasominhibitor MG132 verwendet. Nach 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung für weiterführende Untersuchungen (2.4.2).



**Abbildung 19: Transportassay in intakten Zellen**

Transportstudien in intakten HeLa-Zellen wurden durchgeführt um die Abhängigkeit von einzelnen ER-Komponenten zum Transport bestimmter Polypeptide durch die ER-Membran und der folgenden Prozessierung zu untersuchen. HeLa Zellen wurden vorbereitend zur ersten Behandlung mit siRNA im 6 cm Maßstab ausgesät. Nach 24 h wurde die Manipulation mit siRNA wiederholt. Die Zellen wurden nach 72 h mit dem Plasmid transfiziert, welches für das Vorläufer-Polypeptid des zu untersuchenden Substrats kodiert. Zur Inaktivierung des ER-luminalen Chaperons BiP wurden die Zellen 9 h vor Ernte mit den Cytotoxin SubAB versetzt. Zur Akkumulation des Vorläufers Polypeptids im Cytosol wurde der Proteasominhibitor MG132 verwendet. Nach 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung für weiterführende Untersuchungen (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

#### 2.4.6.1. Inhibition des Proteasoms mittels MG132

Um weiterhin zu unterscheiden, ob ein Translokations- oder Glykosylierungsdefekt der glykosylierten Modellsubstrate vorliegt, wurde in den letzten 8 h vor Ernte der Zellen der reversible Proteasominhibitor MG132 appliziert.

Der Proteasominhibitor MG132 ist ein Peptid-Aldehyd (Carbobenzoxyl-L-Leu-L-Leu-L-Leucinal). Durch die kovalente Bindung an die beta-Untereinheit des 20S Proteasom wird dessen Aktivität inhibiert und dadurch die proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms geblockt. Dadurch wurden fertig synthetisierte Vorläuferpolypeptide, d.h. Polypeptide mit Signalsequenz, vor einem Abbau durch das Proteasom geschützt und somit im Cytosol akkumuliert.

Methodisch wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: HeLa-Zellen wurden gemäß 2.4.1 kultiviert und ggf. nach 2.4.4 manipuliert. Bei einer Gesamtexpression des Modellsubstrats von 24 h, wurde 16 h nach Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA MG132 appliziert. Dabei wurde so vorgegangen, dass zunächst ein Aliquot der bei -80 °C gelagerten MG132 Stammlösung (10 mg/mL) aufgetaut und im Verhältnis 1:4 in DMSO verdünnt wurde. Je Probe wurden 8 µL der MG132-Lösung in DMEM vorverdünnt und zu den Zellen getropft (Endkonzentration MG132: 10 µM). Da MG132 die Aktivität des 26S-Proteasoms reversibel inhibiert, erfolgte die Zellernte nach Inkubation mit Trypsin auf Eis.

### **2.4.6.2. Identifizierung von Prozessierungsstufen plasmidkodierter Polypeptide**

Um die Effekte, welche durch die Depletion von TRAP oder BiP hervorgerufen wurden zu untersuchen, mussten die Modellsubstrate im Vorfeld charakterisiert werden. Die Charakterisierung erfolgte insofern, als dass gemäß 2.4.4.3 passende Expressionszeit und Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz evaluiert wurde um Signale des durch die cDNA kodierten Proteins auf Western Blot Ebene zu detektieren. Im Folgeschritt wurden die Zellen nach der Transfektion mit Plasmid DNA folgendermaßen manipuliert. Zum einen wurde gemäß 2.4.6.1 die Aktivität des Proteasoms durch Zugabe des Inhibitors MG132 gehemmt. Dadurch wurde das Polypeptid des zu transportierenden Substrats mit intakter Signalsequenz vor dem Abbau durch das Proteasom geschützt und im Cytosol akkumuliert. Zum anderen wurde durch Applikation von Tunicamycin die N-Glykosylierung im ER unterbunden. Diese Behandlung hat zur Folge, dass nach Import der Polypeptidkette in das ER die Signalsequenz mittels Signalpeptidase-Komplex abgespalten wird, das Polypeptid jedoch nicht posttranslational in Form von Glykosylierungen modifiziert wird. Tunicamycin gehört zur Klasse der Nukleosidantibiotika. Während Tunicamycin letal auf gram-positive Bakterien, Viren, Hefen und Pilze wirkt, blockt das Antibiotikum in Eukaryoten den Transfer von GlcNAc-1-P von UDP-GlcNAc zum Dolichol-Anker, ein Vorgang, der durch Glc-NAc-Phosphotransferase katalysiert wird. Es handelt sich dabei um eine kompetitive Inhibition, vermutlich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Tunicamycin und dem zu übertragenden Zuckerrest (Esko et al., 2017). Eine Stunde nach der Transfektion mit Plasmid-DNA wurden die Zellen mit Tunicamycin behandelt. Dazu wurden je Probe 0,8 µL der Stocklösung 10 mg/mL in DMEM vorverdünnt und zu den Zellen gegeben (Endkonzentration Tunicamycin: 2 µg/mL). Diese wurden maximal für weitere 24 h bei 37 °C kultiviert.

Nach Ernte der Zellen und Aufbereitung wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Um einzelne Prozessierungsstufen voneinander unterscheiden zu können, war meist der Einsatz großer Polyacrylamidgelen mit einer Trennstrecke von etwa 20 cm und einer erheblich gesteigerten Auflösung im Vergleich zu den routinemäßig eingesetzten kleinen Polyacrylamidgelen notwendig. Da die kodierende Sequenz der zu validierenden Modellsubstrate fast ausschließlich im pcMV6-entry-Vektor vorlag, erhielten diese Substrate einen *Myc*-DDK-Tag. Durch immunologische Detektion mit primärem Antikörper, der das Epitop des Tags erkannte, war es so möglich ausschließlich die einzelnen Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Formen des relevanten Substrats zu untersuchen.

### 2.4.6.3. Quantitative Beurteilung der Prozessierungsstufen eines Modellsubstrats

Um die Abhängigkeit eines Modellproteins in Bezug auf den ER-Import und weiterer Prozessierung z.B. in Form von Glykosylierung zu untersuchen, wurden Transportstudien nach der in 2.4.6 beschriebenen Methode durchgeführt. Durch Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 konnten nicht in das ER transportierte Vorläuferpolypeptide im Cytosol akkumuliert und vom Abbau durch das Proteasom geschützt werden (2.4.6.1). In Kapitel 2.4.6.2 wurde dargelegt, wie einzelne Prozessierungsstufen von Modellproteinen mittels Western Blot charakterisiert werden. Unter Idealbedingungen lässt sich mittels Western Blot lediglich die Bande des Proteins visualisieren, welche vollständig, unter Abspaltung der z.T. vorhandenen Signalsequenz, in das ER transportiert, sowie ggf. glykosyliert wurde. Da es sich bei der Prozessierung um einen dynamischen, immer wiederkehrenden Ablauf handelt, werden jedoch meist mehrere Banden sichtbar, die zu unterschiedlichen Stadien der Proteinprozessierung gehören. Diese einzelnen Banden werden quantifiziert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dazu wurde der Faktor R eingeführt (Schorr, 2014):

$$R = \frac{\text{Reife Form}}{\text{Vorläufer} + \text{Reife Form}}$$

Unter Idealbedingungen liegt der Wert für R bei 1. Liegt nun ein Transportdefekt vor, nimmt der Wert R durch die Vergrößerung des Divisors einen kleineren Wert an.

Es ist zu beachten, dass die Transfektionseffizienz der Zellen mit dem Plasmid, welches für das Substrat kodiert, sowie die resultierende Expression von Probe zu Probe schwanken. Absolute Werte quantifizierter Signale zwischen verschiedenen Proben zu vergleichen, ist aus diesem Grund nicht zulässig.

Daher werden in dieser Arbeit lediglich die Verhältnisse innerhalb einer Probe zueinander ins Verhältnis gesetzt. Der relative Anteil einzelner Banden wird anschließend als Maß dafür genutzt potentielle Defekte nach Manipulation der Zellen gemäß 2.4.4.1 und 2.4.4.2 zu detektieren.

## 2.5. Analyse der substratspezifischen Eigenschaften von BiP mittels HeLa Flp-In System

### 2.5.1. Gentechnische Herstellung stabiler HeLa-Flp-In-Zelllinien

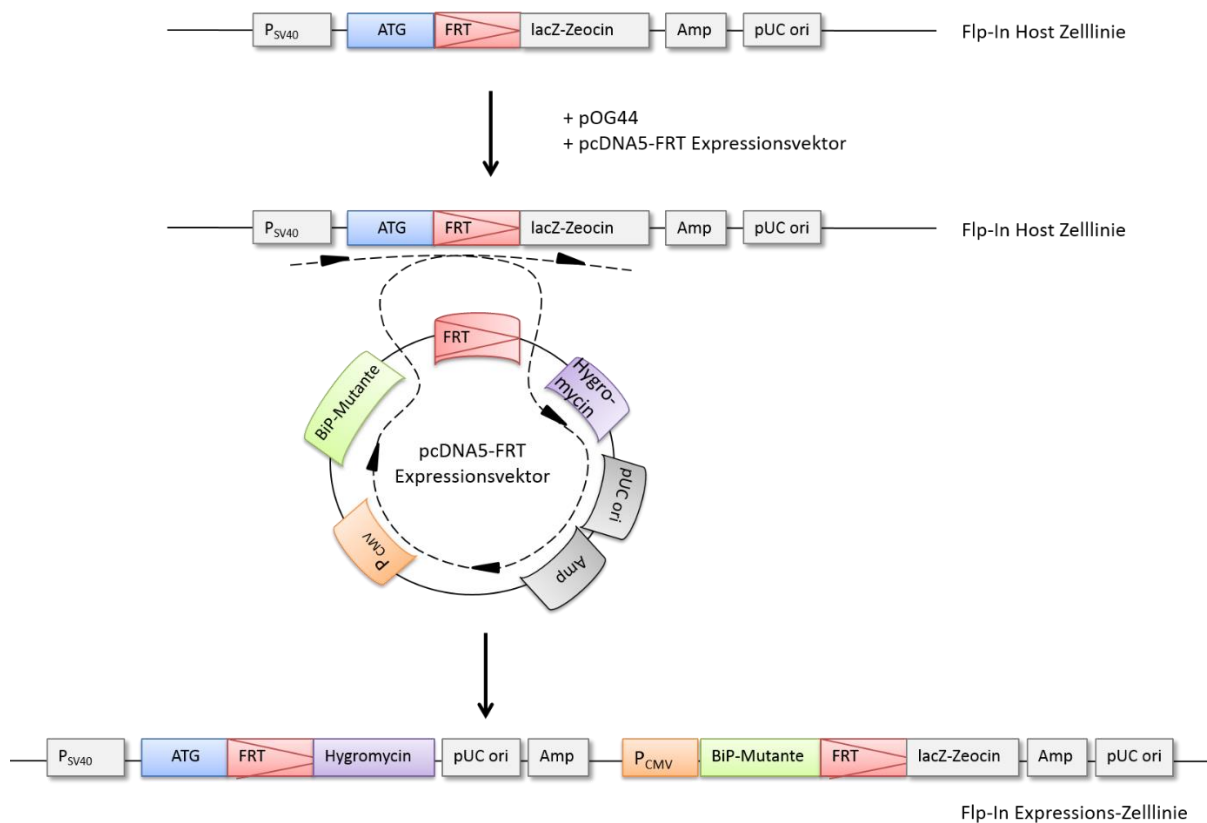
Zur gentechnischen Herstellung stabiler HeLa-Flp-In-Zelllinien wurde das Flp-In™ System von Invitrogen verwendet. Dieses System basiert darauf über ortsspezifische Rekombination (*site-specific recombination*, SSR) plasmidkodierte Gene in das Genom der Zelllinie stabil zu integrieren. Die Rekombination findet über *Flp Recombinase Target* (FRT) Sites statt. Zur Etablierung der Flp-In-Host-Zelllinie muss im ersten Schritt eine Säugerzelllinie so manipuliert werden, dass es zur Expression des LacZ-Zeocin Fusionsgen kommt. Zeocin dient anschließend als Resistenzmarker über welchen erfolgreich transfizierte Zellen selektiert werden. Dieser Schritt wurde in der AG Förster in München durchgeführt und die fertigen Host-Zelllinie zur weiteren Nutzung dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie zur Verfügung gestellt. Das stabil in das Genom der Hostzelllinie zu integrierende Gen musste in den zur weiteren Rekombination fähige pcDNA5-FRT-Vektor kloniert werden (2.3.1). Mit diesem Plasmid wurde die Hostzelllinie transfiziert (2.4.4.3). Gleichzeitig erfolgte die Co-Transfektion mit dem Plasmid pOG44, welches unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors für die Flp-Rekombinase kodiert (2.4.4.3). Dadurch konnte die Rekombination zwischen FRT-sites ablaufen. Eine FRT-site dient dabei als Binde- und Startpunkt der Flp-Rekombinase. Das Expressionsplasmid kodiert zudem auch für ein Antibiotikum-Resistenzgen. Über Hygromycin wurden demnach solche Zellen selektiert, bei welchen es zur erfolgreichen Rekombination und damit Integration des zu untersuchenden Gens kam. Die Zusammensetzung der Transfektionsansätze sind Tabelle 22 zu entnehmen.

**Tabelle 22: Transfektionsansätze zur genetischen Herstellung stabiler HeLa Flp-In-Zellen**

<u>Transfektion mit Expressionsplasmid</u>		<u>Transfektion mit Flpase-Plasmid</u>	
230 µL	OptiMEM	230 µL	OptiMEM
4 µg	pcDNA5-FRT-GOI	4 µg	pOG44
16 µL	FuGeneHD	16 µL	FuGeneHD

Die mit dem Expressionsvektor sowie mit dem für die Flp-Rekombinase kodierenden Plasmid transfizierten Zellen wurden nach 96 h geerntet und je 250.000 Zellen in DMEM mit 150 - 300 µg/mL Hygromycin B (Invitrogen) in humider Umgebung bei 37 °C subkultiviert, weiterhin in 6 cm Schalen. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Zur Kontrolle wurden Zellen kultiviert, die gleichermaßen mit dem Expressionsvektor für das zu untersuchende Gen transfiziert wurden, jedoch nicht mit dem pOG44-Plasmid. Ohne letzteren sollte keine Rekombination möglich sein, die Zellen demnach auch keine Resistenz gegen Hygromycin aufweisen. Diese Zellen sollten zusätzlich dazu dienen, zu beurteilen, ob eine erfolgreiche Rekombination in der mit beiden Plasmiden transfizierten Kultur stattfand.

Zur weiteren Selektion von Einzelzellkulturen, wurden die Mischkulturen zunächst im 6 cm Maßstab durch das Hygromycin B-haltige Medium vorselektiert. Nach 10 Tagen wurden die verbleibenden Zellen geerntet, und auf 1 Zelle / 100 µL verdünnt. Je 100 µL dieser Zellsuspension wurden in 1 Well einer 96 Well-Platte überführt und kultiviert. Durch tägliche Begutachtung wurden Kulturen, welche nachweislich aus einer Zelle entstanden sind, aus der 96-well-Platte geerntet und in größeren Zellkulturgefäßen in Vorbereitung auf funktionelle Assays kultiviert.



### **Abbildung 20: HeLa Flp-In™ System**

Zur gentechnischen Herstellung stabiler HeLa-Flp-In-Zelllinien wurde das Flp-In™ System von Invitrogen verwendet. Mittels ortsspezifischer Rekombination über Flp Recombinase Target (FRT) Sites wird die stabile Integration plasmidkodierter Gene in das Genom der Zelllinie vermittelt. Dazu wurde die Host-Zelllinie sowohl mit einem pcDNA5-FRT Expressionsplasmid, welches für das zu integrierende Gen kodiert, als auch mit dem Plasmid pOG44, welches unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors für die Flp-Rekombinase kodiert, transfiziert. Dadurch konnte die Rekombination zwischen FRT-sites ablaufen, welche als Binde- und Startpunkt der Flp-Rekombinase dienen. Das Expressionsplasmid kodiert zudem auch für ein Antibiotikum-Resistenzgen, wodurch die Selektion der Zellen gesteuert wird, bei welchen es zur erfolgreichen Rekombination und damit Integration des zu untersuchenden Gens kam.

In 1.3.5.1 wurde gezeigt, dass BiP multiple Funktionen im Transport von Polypeptiden in das ER-Lumen erfüllt. Es erleichtert die Sec61-Kanalöffnung im Falle bestimmter Vorläuferpolypeptide. Darüber hinaus bindet BiP die entstehende Kette und fungiert als molekulare Ratsche, um den unidirektionalen Transport zu gewährleisten. Es bleibt zu untersuchen, ob BiP zuerst an Sec61 und anschließend an die ankommende Vorläuferpolypeptidkette binden kann. Nach Translokation in das ER-Lumen werden die Polypeptidketten verarbeitet, gefaltet und schließlich durch vesikulären Transport an ihren Bestimmungsort gebracht. Untersuchungen zur Translokationsmaschinerie umfassen die strukturelle Aufklärung des Translokationskomplexes sowie die funktionelle Charakterisierung von Transportkomponenten. Zwecks Untersuchung des Substratspektrums von BiP und deren determinierenden strukturellen Eigenschaften, erfolgte eine Proteomanalyse (3.8) nach siRNA vermittelter BiP Depletion.

Die identifizierten BiP-Substrate sollten in unabhängigen Silencing-Experimenten validiert werden, u.a. durch Transportassays in lebenden Zellen. Um die substratspezifischen Eigenschaften von BiP näher zu untersuchen, wurde das HeLa-Flp-In System verwendet. Das Flp-In-System wird verwendet, um stabile Säugetier-Expressionszelllinien, wie HeLa-Zellen, zu erzeugen. Das System verwendet die Rekombinase Flp und ortsspezifische Rekombination, um das Gen von Interesse in eine spezifische Stelle im Genom zu integrieren und zu exprimieren (2.5.1). Die Transportassays sollten in HeLa Flp-In-Zellen durchgeführt werden, die mit mehreren BiP-Mutanten manipuliert wurden. Diese Mutanten könnten einen Einfluss auf den Transport von Substratpolypeptiden haben.

### **2.5.2. Charakteristika der BiP-Mutanten**

Zusammenfassend sind die Charakteristika der verwendeten BiP-Mutanten in Abbildung 21 dargestellt. Die BiP-R197H-Mutante ist nicht in der Lage, mit Hsp40-Co-Chaperonen zu interagieren, was notwendig ist, um den ATPase-Zyklus zu stimulieren.

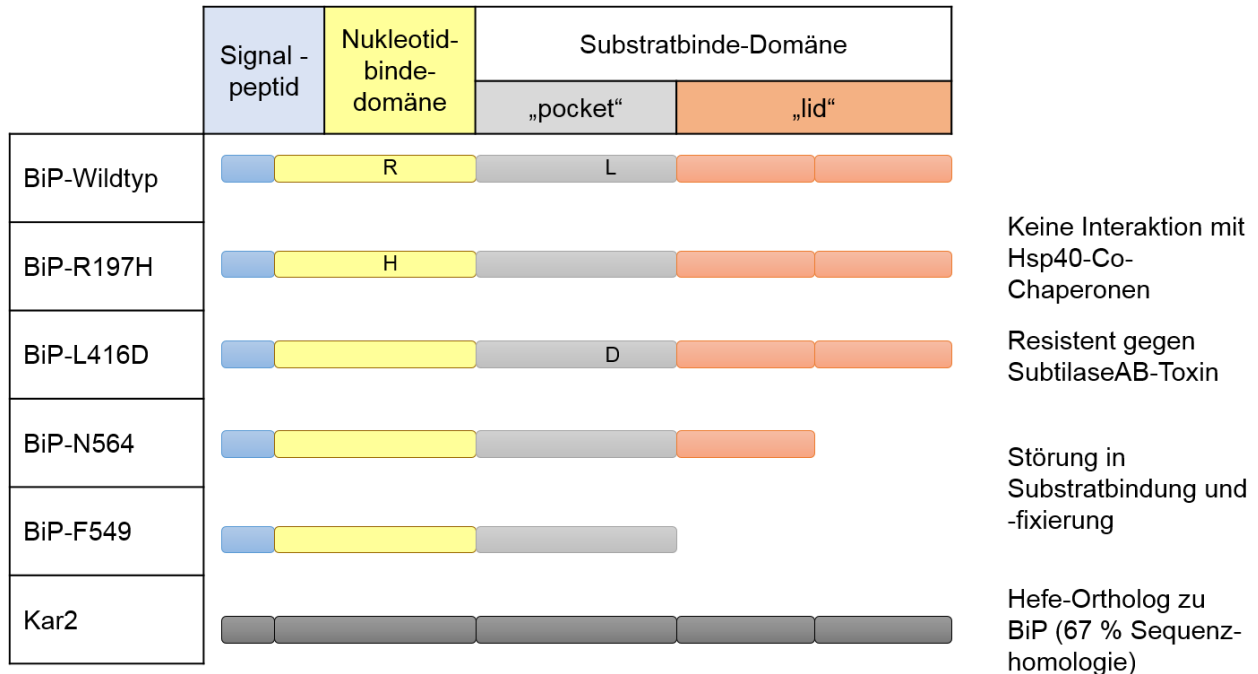
Als Konsequenz bleibt die Affinität für Substrate niedrig und es wird erwartet, dass sie das Sec61-Gating nicht unterstützen kann. Mit Hilfe dieser Mutante gilt es zu untersuchen, ob das BiP-ADP, das die teilweise translozierte Polypeptidkette bindet, dasselbe ist, das an Sec61 $\alpha$  bindet, um die Kanalöffnung zu erleichtern. Zusätzlich soll untersucht werden, ob das Hsp40 Co-Chaperon Sec63 an beiden Aktivitäten beteiligt ist.

Zwei Trunktionsmutanten haben einen verkürzten lid (BiP-N564 (C $\Delta$ 77)) oder sind vollständig lidlos (BiP-F549 (C $\Delta$ 92)). Dies führt zu einer gestörten Substratbindung und -fixierung.

Die Abreicherung von BiP ist nicht nur durch die reduzierte Genexpression mittels RNAi möglich, sondern auch durch Subtilase AB-Toxin-vermittelte proteolytische Inaktivierung. Die Mutante BiP-L416D ist proteolytisch resistent gegen das Subtilase-AB-Toxin. Zunächst galt es zu klären, ob die Zelle mit der Mutante BiP-L416D lebensfähig ist. Sofern dies positiv nachweisbar war, sollten Doppelmutanten kloniert werden. Diese enthalten sowohl die L416D-Mutation als auch je eine der oben genannten (WT, R197H, N564, F549), und würden als Negativkontrolle im Fall der Anwendung von Subtilase AB verwendet werden.

Zusätzlich wurde das Gen des Hefe-Orthologs Kar2p in das Genom der HeLa Flp-In Zellen integriert. Damit soll die Frage beantwortet werden, ob Kar2p Sec61 in den offenen Zustand versetzen kann. Wenn ja, galt es zu untersuchen welche Hsp40-Co-Chaperone das Hefe-Ortholog von BiP stimulieren.



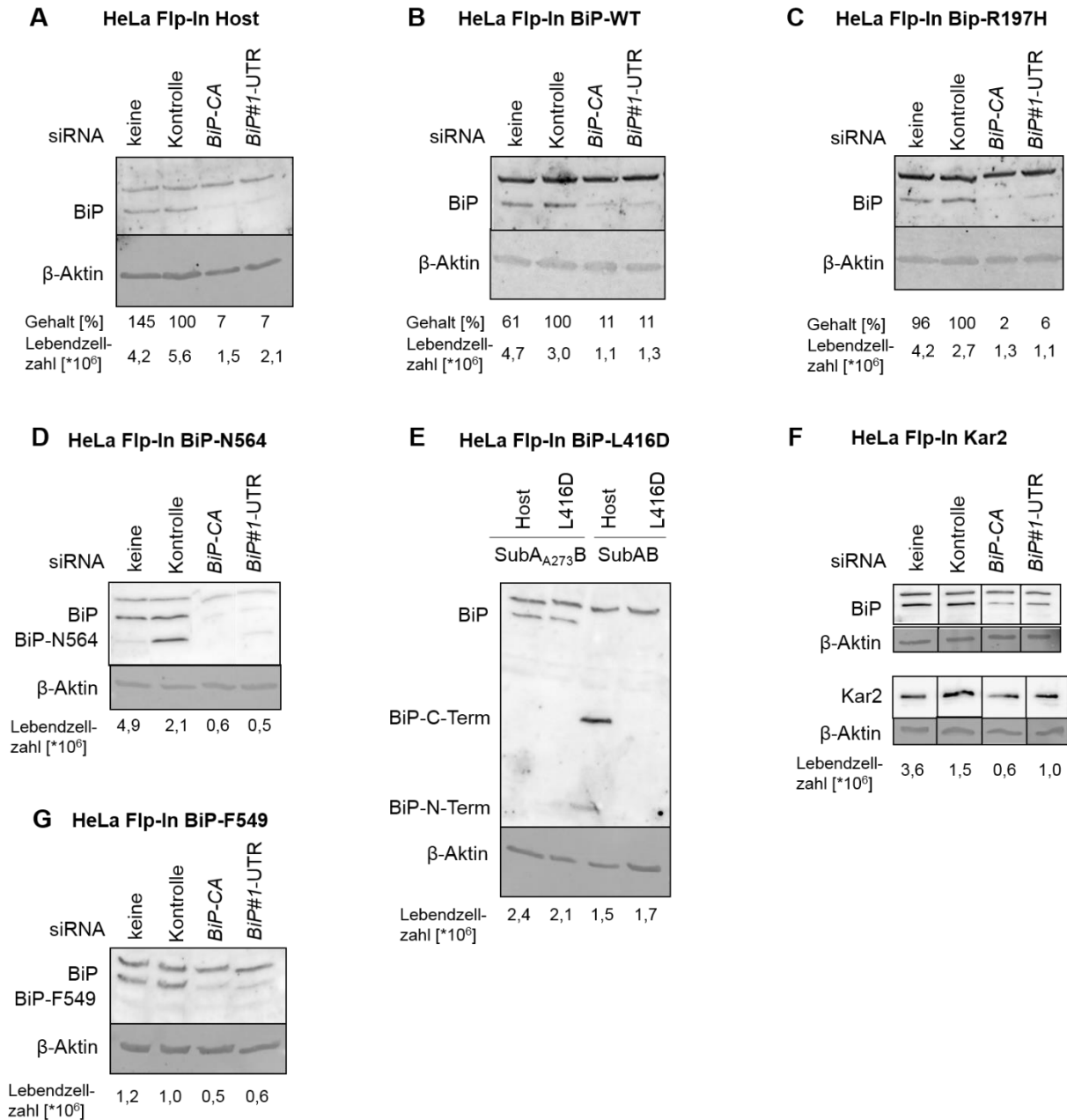


**Abbildung 21: Charakteristika der stabil in das Genom von HeLa Flp-In Zellen zu integrierenden BiP-Mutanten**  
Um die substratspezifischen Eigenschaften von BiP näher zu untersuchen, wurde das HeLa-Flp-In System verwendet. Transportassays sollten in HeLa Flp-In-Zellen durchgeführt werden, die mit mehreren BiP-Mutanten manipuliert wurden. Diese Mutanten könnten einen Einfluss auf den Transport von Substratpolypeptiden haben. Neben dem BiP-Wildtyp wird die Mutante BiP-R197H verwendet. Diese ist nicht in der Lage mit Hsp40-Co-Chaperonen zu interagieren, was notwendig ist, um den ATPase-Zyklus zu stimulieren. Zwei Trunktionsmutanten haben einen verkürzten lid (BiP-N564 (CΔ77)) oder sind vollständig lidlos (BiP-F549 (CΔ92)). Dies führt zu einer gestörten Substratbindung und -fixierung. Die Mutante BiP-L416D ist proteolytisch resistent gegen das Subtilase-AB-Toxin. Kar2p ist das Hefe-Ortholog zu BiP.

### 2.5.3. Generierung stabiler HeLa Flp-In Zellen manipuliert mit BiP-Mutanten

Das genaue Prozedere im Umgang mit HeLa Flp-In Zellen zur gerichteten, stabilen Integration von Genen in das Genom der Flp-In Zellen ist Kapitel 2.5.1 zu entnehmen. Somit wurden die Mutterzellen simultan mit dem Plasmid, welches für die zur Rekombination nötige Flipase kodiert, und mit einem für eine BiP-Mutante kodierendes Plasmid transfiziert. Letzteres kodiert ebenfalls für das Antibiotikaresistenzgen Hygromycin, welches als Selektionsmarker fungiert. 24 h nach der Transfektion startete die Selektion der positiv transfizierten Zellen. Zunächst wurde auf Einzelzellselektion verzichtet. Die resultierend kultivierten Mischkulturen wurden nach einer Selektionsperiode von 30 Tagen Experimenten zur Reduktion der Genexpression mittels RNAi unterzogen, der Proteingehalt durch Western Blot Analyse visualisiert. Die Zellen wurden dabei mit je einer von zwei verschiedenen gegen HSPA5 (BiP) gerichteten siRNAs oder einer Kontroll-siRNA behandelt, oder blieben komplett unbehandelt.

Mit letzteren wurde die korrekte Expression der BiP-Mutanten überprüft. BiP-CA siRNA ist gegen den kodierenden Bereich von BiP gerichtet und depletiert sowohl endogenes BiP als auch die plasmidkodierte BiP-Mutanten. Letztere sind resistent gegen die BiP#1-UTR siRNA. Die Expression von BiP-L416D wurde durch Applikation des SubtilaseAB-Toxins (2.4.4.2) überprüft. In Abbildung 22 sind exemplarisch Ergebnisse der Expresssionstests der BiP-Mutanten in Mischkultur auf Western Blots Ebene gezeigt. Da nach der Behandlung mit BiP#1-UTR siRNA kein Signal auf Höhe des in der Kontrollspur detektierten BiP nachweisbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass es zu keiner stabilen Integration des BiP-Wildtyps (B) oder der Mutante BiP-R197H (C) gekommen ist. Für die beiden verkürzten Varianten BiP-N564 (D) und BiP-F549 (G) ist bei stabiler Integration der Mutante in das Genom der HeLa Flp-In Zellen ein Signal wenige kDa unter dem Signal des endogenen BiP zu erwarten. Für BiP-F549 ist dieses Signal jedoch nie nachweisbar, für BiP-N564 nur nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. Lediglich das Hefeortholog Kar2p (F) wird exprimiert.



**Abbildung 22: Test der Expression der BiP-Mutanten in HeLa Flp-In Zellen**

Die kultivierten Mischkulturen wurden nach einer Selektionsperiode von 30 Tagen Experimenten zur Reduktion der Genexpression mittels RNAi unterzogen, der Proteingehalt durch Western Blot Analyse visualisiert. Dabei wurde je  $5,2 \cdot 10^5$  HeLa-Zellen ausgesät entweder keine, Kontroll-, *BiP-UTR* oder *BiP-CA* siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h manipuliert. Mit letzteren wurde die korrekte Expression des BiP-Wildtyps (**B**) sowie der BiP-Mutanten R197H (**C**), BiP-N564 (**D**), BiP-F549 (**G**) sowie des Hefeorthologs Kar2p (**F**) überprüft. BiP#-CA siRNA ist gegen den kodierenden Bereich von BiP gerichtet und depletiert sowohl endogenes BiP als auch die plasmidkodierte BiP-Mutanten. Letztere sind resistent gegen die BiP#1-UTR siRNA. Die Expression von BiP-L416D (**E**) wurde durch Applikation des SubtilaseAB-Toxins (2.4.4.2) überprüft. Nach 72 h Transfektion mit siRNA oder zweistündiger Manipulation mit Toxin erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von BiP erfolgte über einen Kaninchen-anti-BiP-Antikörper. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt.

Da an dieser Stelle keine stabile Integration der BiP-Mutanten in einer Mischpopulation nachgewiesen werden konnte, wurde die Transfektion der Mutterzelllinie wiederholt und positiv transfizierte Einzelklone im 96-Well-Maßstab selektiert. Für jede Mutante konnten wenigstens drei Populationen aus Einzelzellkulturen kultiviert werden. Innerhalb von Zellkulturexperimenten ist es wichtig möglichst immer mit der gleichen Charge Zellen zu arbeiten. Diese werden dazu aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. So auch die unter Selektionsdruck gehaltenen Einzelzellkulturen. Nach erneutem Auftauen wurden diese weiteren Expressionstests unterzogen. Die Ergebnisse decken sich mit den in Abbildung 22 gezeigten. Dementsprechend kann auch nach Einzelzellselektion keine stabile Integration der Mutanten sowie deren Expression auf Western Blot Ebene nachgewiesen werden.

## 2.6. Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der humanen Zellen wurde im Max-Planck-Institut für Biochemie von Dr. Nagarjuna Nagaraj in Martinsried durchgeführt. Dazu wurden die von Monika Lerner am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Homburg geernteten Zellen mit PBS gewaschen und mittels Lysepuffer aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und zehnmal für 30 s im Ultraschallbad bei maximaler Stärke behandelt. Dieser Vorgang wurde danach noch einmal wiederholt bevor die lysierte Probe 1:10 im Puffer, in welchem anschließend der proteolytische Verdau ablief, verdünnt wurde.

<u>Lysepuffer</u>		<u>Puffer für proteolytischen Verdau</u>	
40 mM	CAA	25 mM	Tris (pH 8,0)
100 mM	Tris (pH 8,0)	10 % (v/v)	Acetonitril
6 M	GnHCl		
20 mM	TCEP		

Dabei wurde der Proteinextrakt zunächst mit der Endoproteinase Lys-C in einem Zeitraum von 4 h behandelt. Dieses Enzym schneidet Polypeptidketten C-terminal von Lysinresten. Die anschließende Behandlung des Gemischs mit der Serinprotease Trypsin läuft über Nacht ab. Dabei werden die Peptide weiter C-terminal der Aminosäuren Lysin und Arginin gespalten. Um diese Reaktion zu verstärken, wird die Probe am darauffolgenden Tag noch einmal mit Trypsin versetzt. Die Peptide wurden für die massenspektrometrische Analyse mit SDB-RPS Stage Tips aufgereinigt.

Mit Hilfe des Autosamplers des Flüssigchromatographen Thermo Easy nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) wurden die Proben auf eine 50 cm lange gepackte Säule mit 75 µm innerem Durchmesser (Teilchen 1,9 µm dick) Säule geladen.

Die die Säule durchlaufenen Peptide werden mit Hilfe der nano-ESI-Technik ionisiert. Unter Hochspannung wird der Analyt durch die ESI-Nadel geleitet. Im elektrischen Feld werden der Analytlösung durch das Trocknungsgas Lösungsmittelreste entzogen, wodurch ein Ladungsüberschuss entsteht und in eine Coulombexplosion resultiert. Dadurch werden positiv geladene Analytionen generiert, die weiter aus der Ionenquelle in die Massenanalytoreinheit geleitet werden. Dazu wurde ein the benchtop Orbitrap mass spectrometer Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Bei einer Orbitrap handelt es sich im Prinzip um eine elektrostatische Ionenfalle, welche eine spindelförmige Elektrode enthält. Diese führt dazu, dass sich die Ionen auf Kreisbahnen um diese Elektrode herum bewegen. Der Massenscan wurde im Bereich von 300 m/z bis 1700 m/z durchgeführt. Bis zu 15 Vorläufer wurden dabei selektiert und mittels „*higher energy collisional dissociation*“ (HCD) weiter fragmentiert. Durch diesen speziellen Mechanismus der kollisionsinduzierten Fragmentierung im RF-Bereich ist es möglich Ionen geringer molekularer Masse und somit auch Proteinmodifikationen aufzulösen. Die gewonnenen Rohdaten wurden mit der Software MaxQuant ausgewertet. Diese wurden mit humanen Datenbanken von UniProtKB hinsichtlich des Vorläuferproteins und den dazugehörigen Fragmenten mit einer Toleranz von 4,5 ppm. Carbamidomethylierung von Cysteinresten wurde als statische Modifikation, Oxidation und N-terminale Acetylierung von Methionin als variable Modifikation gewertet.

Die Proteine wurden unter Verwendung des markierungsfreien Quantifizierungsalgorithmus „MaxQuant“ als „*label-free quantification*“ (LFQ) Intensitäten quantifiziert. Diese spiegeln keine absoluten Anzahlen von Kopien wider, sondern dienen nur dem Vergleich der Häufigkeiten desselben Proteins in verschiedenen Proben. Grund dafür sind nicht nur die Menge an quantifizierten Peptiden sondern auch die Effizienz mit welcher Peptide ionisiert werden (Cox & Mann, 2008; Cox et al., 2014; Nagaraj et al., 2011; 2012)

Jedes MS Experiment lieferte somit Datenpunkte in Form von LFQ-Intensitäten, jeweils in Triplikaten für eine Kontrollgruppe und mindestens zwei beeinflusste Gruppen. Fehlende Datenpunkte wurden durch zwei unterschiedliche Arten der Imputation generiert: Für vollständig fehlende Proteine, die keine gültigen Datenpunkte aufweisen, wurden imputierte Datenpunkte zufällig im unteren Teil der gesamten Proteomics-Verteilung erzeugt, wobei die Strategie in der Perseus-Software verfolgt wurde (Tyanova et al., 2016)

Für Proteine mit mindestens einem gültigen MS-Datenpunkt wurden fehlende Datenpunkte aus den gültigen Datenpunkten erzeugt, durch Imputation aufgrund lokaler Fehlerquadrate („*local least squares*“, LLS) (Hyunsoo et al., 2005).

## 2.7. Bioinformatische Auswertung & Proteinmengenbestimmung

Die bioinformatische Auswertung der massenspektrometrisch gewonnenen Daten wurde im Zentrum für Bioinformatik von Duy Nguyen unter der Leitung von Prof. Volkhard Helms an der Universität des Saarlandes durchgeführt. Folgend wird die grundlegende Vorgehensweise zusammenfassend erklärt. Eine detaillierte Beschreibung der bioinformatischen Auswertemethode ist diesbezüglich der Dissertation von Duy Nguyen zu entnehmen (Nguyen, 2017).

Zunächst wurde die Gen-basierte Quantilnormalisierung angewendet, um die Häufigkeitsverteilungen jedes Proteins in Bezug auf statistische Eigenschaften zu homogenisieren. Es folgte die Identifizierung der Proteine, welche vom Sec61 $\alpha$ - und TRAP $\beta$ -Knock-down in siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Probe beeinflusst wurden. Dazu wurde das Verhältnis zwischen depletierender und Kontroll-siRNA log<sub>2</sub>-transformiert und anschließend zwei verschiedene t-Tests für jede depletierende siRNA gegen Kontroll-siRNA durchgeführt. Die dadurch erhaltenen P-Werte wurden unter Verwendung von „*false discovery rate* (FDR)“ Tests korrigiert. Sofern der daraus resultierende Q-Wert für ein Protein unter 5 % lag, wurden diese Proteine als signifikant beeinflusst betrachtet, aufgrund der Reduktion der entsprechenden Genexpression mittels RNAi (*TRAPB* oder *SEC61A1*). Proteine, die in der Schnittmenge beider t-Tests als signifikant beeinflusst betrachtet wurden, wurden für weitere Untersuchungen als Substratkandidaten verwendet. Alle statistischen Analysen wurden mit dem R-Paket SAM durchgeführt (Tusher et al., 2001).

Protein-Annotationen von Signalpeptiden, Transmembranregionen und N-Glykosylierungen wurden UniProtKB entnommen unter Verwendung benutzerdefinierter Skripte. Mit Hilfe des „Gorilla Packages“ wurde die Anreicherung funktioneller GO-Annotationen unter den sekundär beeinflussten Proteinen berechnet (Eden et al., 2009). Mittels benutzerdefinierter Skripte wurden sowohl der Gehalt helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin als auch der Hydrophobizitätsscore nach Kyte-Doolittle in Signalsequenzen bestimmt (Kyte & Doolittle, 1982).

## 2.8. Statistische Auswertemethoden

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software Excel 2007 (Microsoft) durchgeführt. Dabei lag jeweils die Fragestellung zugrunde, ob zwei Datensätze signifikant voneinander abweichen. Es wurde dabei der ungepaarte t-Test angewendet und die Wahrscheinlichkeit  $p$  zur Beurteilung der Signifikanzen wie folgt definiert:

$p > 0,050$  (nicht signifikant)

$p \leq 0,050$  (signifikant, \*)

$p \leq 0,010$  (sehr signifikant, \*\*)

$p \leq 0,001$  (hoch signifikant, \*\*\*)

### 3. Ergebnisse

Der TRAP-Komplex formt zusammen mit dem Ribosom-assoziierten Sec61-Komplex einen stabilen Superkomplex (Ménétrez et al., 2008; Pfeffer et al., 2014 & 2017). Während die Funktionen und Eigenschaften des Sec61-Komplexes in der Literatur eingehend beschrieben sind, ist dagegen vergleichsweise wenig über den TRAP-Komplex bekannt. In früheren Studien konnte durch Cross-Linking-Experimente die potentielle Interaktion zwischen dem TRAP-Komplex und naszierenden Polypeptiden während ihrer Translokation in das ER-Lumen gezeigt werden (Wiedmann et al., 1989; Conti et al., 2015). Außerdem wurde publiziert, dass TRAP die Topologie von Transmembranhelices einzelner Proteine beeinflussen kann (Sommer et al., 2013). In-vitro Studien zeigten, dass TRAP die Translokation einzelner Polypeptide unterstützt (Fons et al., 2003). Dies verdeutlicht, dass der TRAP-Komplex in einer noch nicht determinierten Art und Weise am Transport bestimmter Polypeptide beteiligt ist. Gestützt wird diese Beobachtung durch Cryo-Elektronentomografie (CET) Studien, in welchen festgestellt wurde, dass der TRAP-Komplex und der Sec61-Komplex in stöchiometrischen Mengen vorliegen und die  $\gamma$ -Untereinheit des TRAP-Komplex auf cytosolischer Seite durch die direkte räumliche Nähe mit ribosomalen Proteinen interagieren kann (Pfeffer et al., 2017). Aus der Literatur sind des Weiteren einige Patienten bekannt, welche unter einer chronischen Glykosylierungskrankheit (CDG) leiden, die auf Mutationen in der  $\gamma$ - bzw.  $\delta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes zurückgeht. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass der TRAP-Komplex mit dem N-Glykosylierungsprozess in Verbindung steht (Losfeld et al., 2014; Ng et al., 2015).

Welche Proteine jedoch in Abhängigkeit zum TRAP-Komplex innerhalb ihrer Biogenese stehen und auf welchen Eigenschaften beiderseits diese Abhängigkeit beruht, wurde bisher nicht analysiert.

Ziel dieser Arbeit war es, den TRAP-Komplex hinsichtlich seiner substratspezifischen Eigenschaften zu untersuchen und die Funktionsweise des Komplexes näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck bediente man sich einer Strategie, die prinzipiell zwei verschiedene experimentelle Analysen kombiniert.

- A. HeLa-Zellen wurden zunächst mittels siRNA vermittelter Proteindepletion manipuliert.
- B. Das resultierende Proteom wurde massenspektrometrisch quantifiziert und die erhaltenen Daten bioinformatisch ausgewertet. Anhand dieser Proteinmengenbestimmung wurden potentielle TRAP-abhängige Substrate identifiziert.
- C. In unabhängigen Experimenten wurden zum einen die Substrate an sich und zum anderen deren spezifischen Eigenschaften validiert.

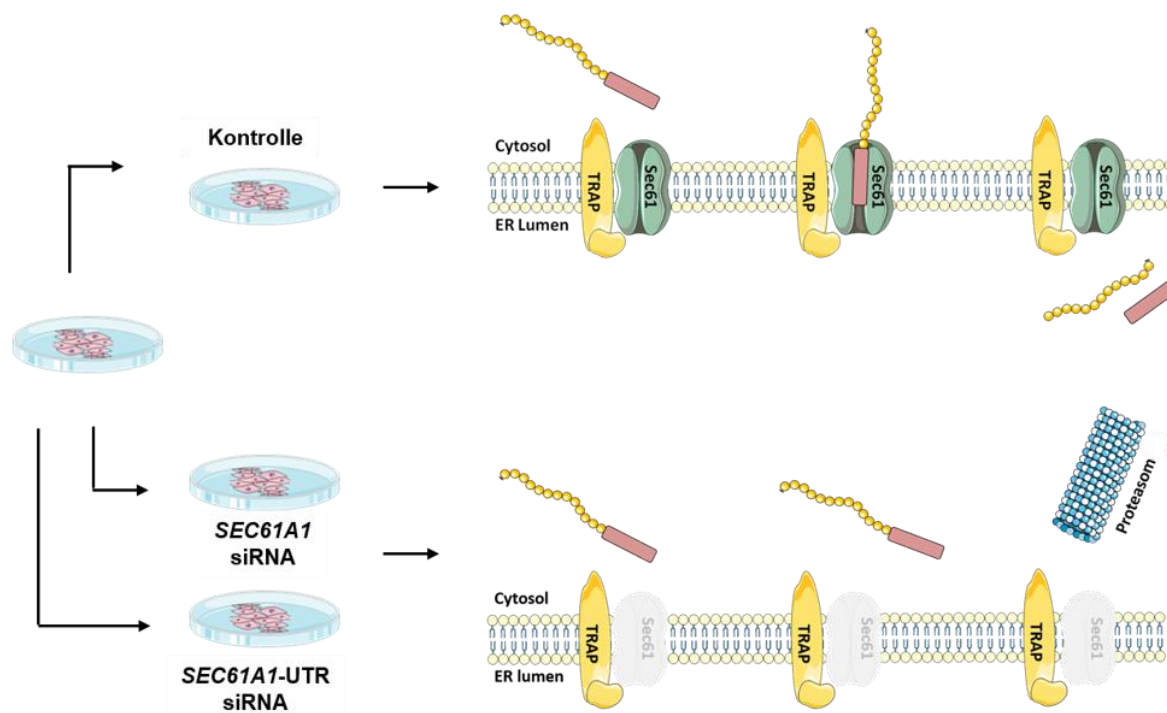


Zusätzlich wurden Fibroblasten von CDG-Patienten zur Verfügung gestellt und zur Validierung hinsichtlich des Proteingehalts der Modellsubstrate ebenfalls analysiert. Die Ergebnisse der genannten Untersuchungen sind im folgenden Kapitel erläutert.

### 3.1. Strategie zur Bestimmung des Substratspektrums von des TRAP-Komplexes in intakten HeLa Zellen

Die folgend beschriebene Strategie zur Identifizierung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes basiert auf folgenden Überlegungen:

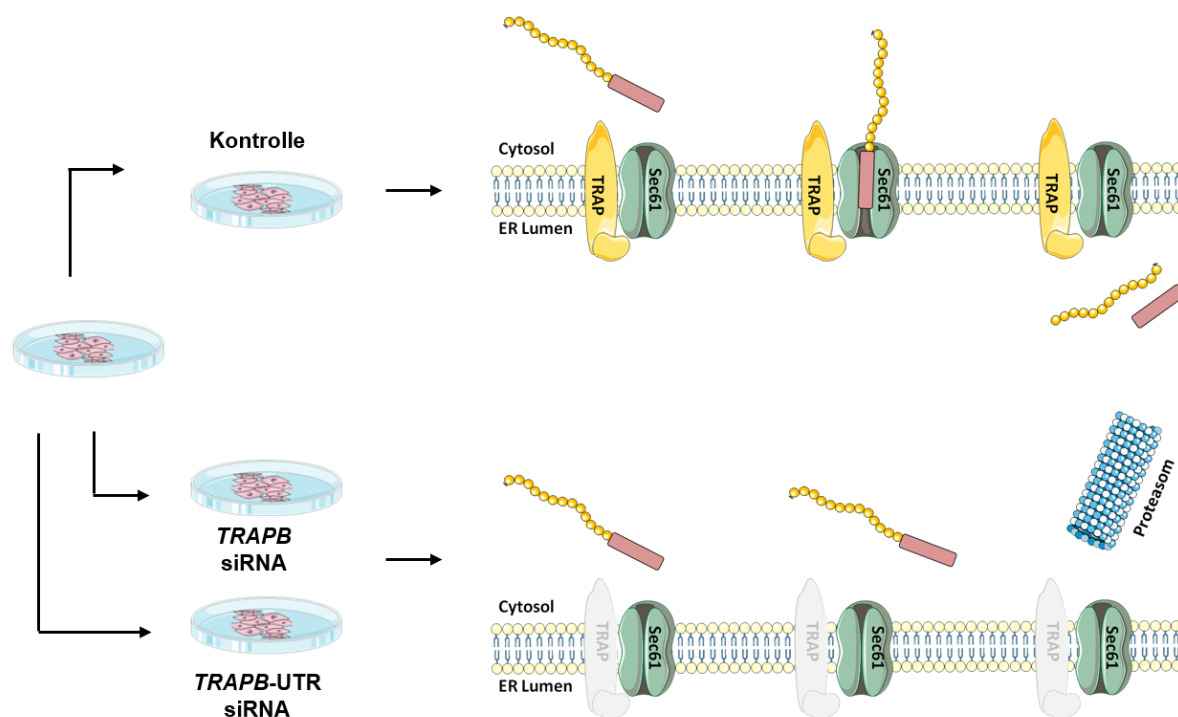
Etwa ein Drittel aller genomisch kodierten Polypeptide müssen durch den Sec61-Kanal in das ER-Lumen transportiert bzw. in die ER-Membran integriert werden (1.1). Diese Proteine sind dem sekretorischen Weg zuzuordnen. Bei einem Fehlen dieses Kanals, z.B. aufgrund der siRNA-basierten Reduktion der Genexpression von *SEC61A1*, können betreffende Polypeptide nicht in das ER-Lumen transportiert werden (Abbildung 23). Es kommt daher zur Akkumulation der nicht-transportierten Polypeptide im Cytosol und deren proteasomalen Abbau (1.5.1, 2.4.6.1). Demnach ist anzunehmen, dass die reduzierte Genexpression von *SEC61A1* bewirkt, dass vor allem Proteine des sekretorischen Wegs innerhalb des massenspektrometrisch quantifizierten Proteoms vermindert nachgewiesen werden.



### Abbildung 23: Identifizierung von Sec61-Substraten und kompensatorischer Mechanismen nach siRNA vermittelter Depletion von *SEC61A1*

Zur Bestimmung des Substratspektrums des Sec61-Komplexes wurde folgendermaßen vorgegangen: In zwei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen jeweils in Triplikaten gemäß Protokoll für 96 h mit *SEC61A1* bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Da diese keine Homologie zu bekannten humanen Sequenzen aufweist, hat die Manipulation der HeLa-Zellen keinen Einfluss auf die Biogenese von Proteinen und dient daher als Negativkontrolle. Die gleichartige Transfektion mit *SEC61A1* siRNA (#4) bzw. *SEC61A1*-UTR siRNA (#5) führt zur Depletion des Sec61-Komplexes. Bei einem Fehlen dieses Kanals können betreffende Polypeptide nicht in das ER-Lumen transportiert werden. Es kommt daher zur Akkumulation der nicht-transportierten Polypeptide im Cytosol und deren proteasomalen Abbau (1.5.1, 2.4.6.1) (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Durch die effiziente Reduktion des TRAP-Komplexes als akzessorische Komponente des Sec61-Komplexes, würde demnach in Analogie zur Depletion von *SEC61A1* analog der eingeschränkte Transport potentieller TRAP-Substrate in das ER-Lumen und eine Akkumulation im Cytosol gefolgt vom proteasomalen Abbau resultieren (1.5.1, 2.4.6.1, Abbildung 24).



### Abbildung 24: Identifizierung von TRAP-Substraten und kompensatorischer Mechanismen nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB*

Zur Bestimmung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes wurde folgendermaßen vorgegangen: In drei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen jeweils in Triplikaten gemäß Protokoll für 96 h zum einen mit Kontroll-siRNA behandelt. Da diese keine Homologie zu bekannten humanen Sequenzen aufweist, hat die Manipulation der HeLa-Zellen keinen Einfluss auf die Biogenese von Proteinen und dient daher als Negativkontrolle. Die gleichartige Transfektion zum anderen mit *TRAPB* siRNA (#3) bzw. *TRAPB*-UTR siRNA (#2) führt zur Depletion des TRAP-Komplexes. Durch die effiziente Reduktion des TRAP-Komplexes als akzessorische Komponente des Sec61-Komplexes, resultiert der eingeschränkte Transport potentieller TRAP-Substrate in das ER-Lumen und eine Akkumulation im Cytosol gefolgt vom proteasomalen Abbau (1.5.1, 2.4.6.1) (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Zur Bestimmung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes erfolgte die Vorgehensweise entsprechend dem Schema in Abbildung 25:

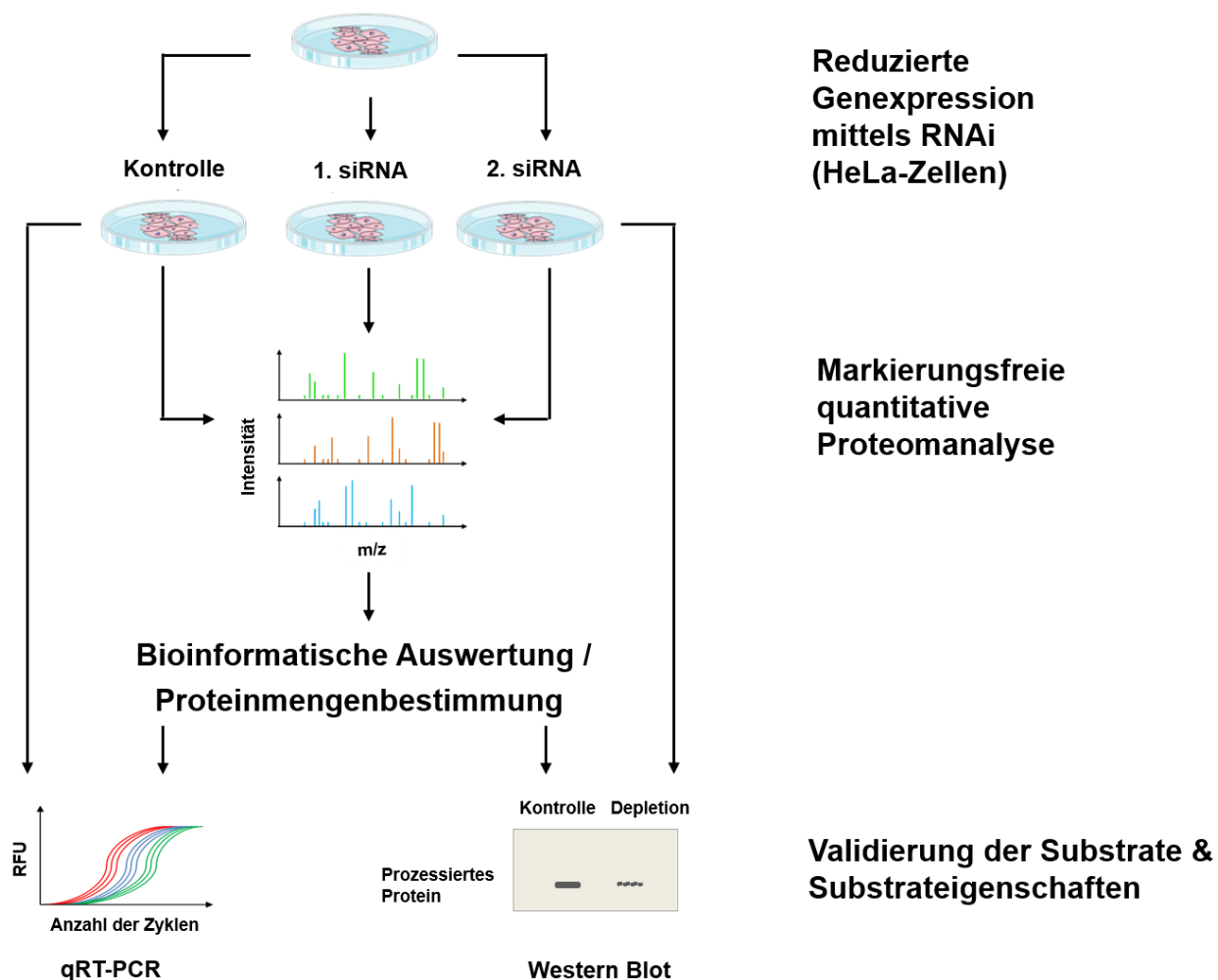
In drei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen jeweils in drei technischen Triplikaten gemäß Protokoll (2.4.4.1) mit zwei verschiedenen gegen *TRAPB* gerichteten siRNAs behandelt. Die RNAi gestützte genetische Manipulation der HeLa-Zellen stellte dabei eine bereits etablierte, reproduzierbare Vorgehensweise dar. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die siRNA vermittelte Depletion der  $\beta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes zu einer Destabilisierung und dadurch zur Degradation des gesamten TRAP-Komplexes führt (Pfeffer et al., 2017). Als Positivkontrolle und damit zur Überprüfung des Konzepts wurden zusätzlich in zwei biologischen Replikaten HeLa-Zellen mittels zwei verschiedener siRNAs *SEC61A1*-depletiert, jeweils ebenfalls in technischen Triplikaten.

Alle Ansätze wurden mit Daten der Zellen verglichen, welche mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Diese Kontroll-siRNA weist keine Homologie zu bekannten humanen Sequenzen auf und führt daher nicht zu einer Änderung des Transkriptoms.

Nach maximaler Reduktion der Genexpression durch RNAi erfolgte die Zellernte und Aufbereitung zur folgenden massenspektrometrischen Untersuchung (2.4.5). Die markierungsfreie Proteomanalyse wurde gemäß Kapitel 2.6 im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Die Datenanalyse und bioinformatische Auswertung erfolgte durch Duy Nguyen unter der Leitung von Prof. Volkhard Helms im Center für Bioinformatik an der Universität des Saarlandes. Im folgenden Teil werden die Ergebnisse dieser Auswertung zusammengefasst. Die detaillierte Vorgehensweise innerhalb der statistischen Auswertung ist in der Dissertation von Duy Nguyen eingehend beschrieben (Nguyen, 2017). Innerhalb dieser Proteinmengenbestimmung wurden Proteine identifiziert, die nach der genetischen Manipulation mittels RNAi signifikant in Quantität gegenüber der Kontrolle verändert waren.

Aus der Gruppe an Proteinen, die sowohl nach Depletion von *TRAPB* als auch *SEC61A1* als quantitativ verändert nachgewiesen wurden, erfolgte eine Auswahl an Modellproteinen zur weiteren Validierung der Substrate selbst und deren Eigenschaften. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen in weiteren unabhängigen Experimenten gemäß 2.4.4.1. für *SEC61A1* bzw. *TRAPB* depletiert. Für letztere folgte die mRNA-Analyse mittels qRT-PCR (2.3.2.3), Quantifizierung des Proteingehalts auf Western Blot Basis (2.2) sowie Rettungsexperimente in Bezug auf die zu validierenden Modellsubstrate.



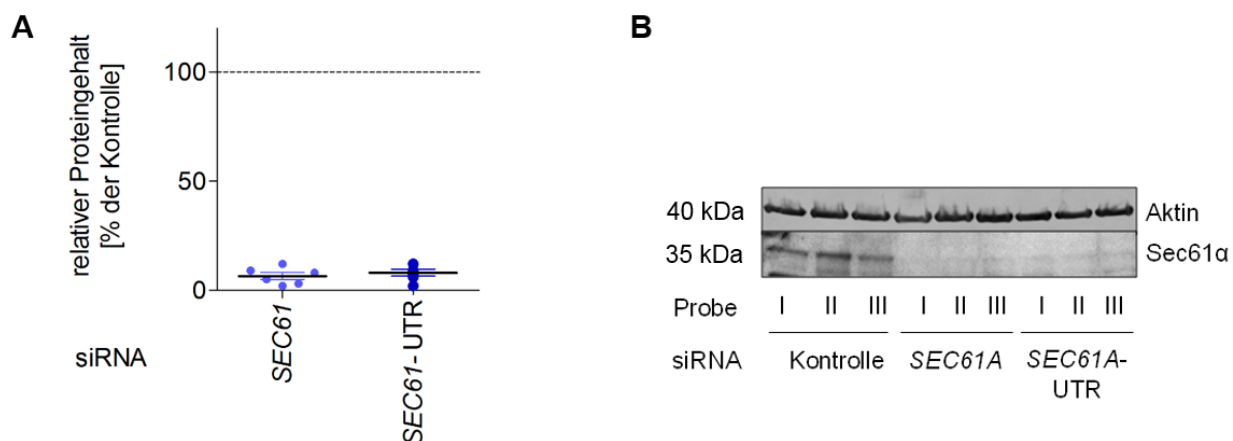
**Abbildung 25: Strategie zur Bestimmung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes in HeLa-Zellen.**

Zur Bestimmung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes wurde folgendermaßen vorgegangen: In drei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen jeweils in Triplikaten gemäß Protokoll für 96 h mit *TRAPB* siRNA (#3), *TRAPB*-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Zur Überprüfung des gesamten Konzepts wurden zusätzlich in zwei Replikaten HeLa-Zellen jeweils in Triplikaten gemäß Protokoll für 96 h mit *SEC61A1* siRNA (#4), *SEC61A1*-UTR siRNA (#5) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Das resultierende Proteom wurde mittels markierungsfreier massenspektrometrischer Analyse gemäß Kapitel 2.6 im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried untersucht. Die Datenanalyse und bioinformatische Auswertung erfolgte durch Duy Nguyen im Center für Bioinformatik an der Universität des Saarlandes. Dabei wurden Proteine identifiziert, die nach der genetischen Manipulation mittels siRNA signifikant in Quantität verändert waren. Aus der Gruppe an Proteinen, die sowohl nach Depletion von *TRAPB* als auch *SEC61A1* als vermindert nachgewiesen wurden, wurden Modellsubstrate zur weiteren Validierung der Substrate an sich und deren Eigenschaften ausgewählt. Die Validierung verlief gestaltete sich folgendermaßen: HeLa-Zellen wurden in weiteren unabhängigen Experimenten gemäß 3.2 für *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* depletiert. Es folgte die mRNA-Analyse mittels qRT-PCR (2.3.2.3) sowie Quantifizierung des Proteingehalts auf Western Blot Basis (2.2.2) für die Modellsubstrate (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Common Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licences/by/3.0/>).

### 3.1.1. Proof of concept: Identifizierung von Sec61-Substraten und kompensatorischer Mechanismen nach siRNA vermittelter Depletion von *SEC61A1*

Um die in 3.1 beschriebene Strategie zur Identifizierung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes zu beurteilen wurde neben *TRAPB* auch die siRNA vermittelte Depletion von *SEC61A1* durchgeführt und das resultierende Proteom massenspektrometrisch analysiert. Lang (2012) etablierte die siRNA-basierte Strategie zur Reduktion der *SEC61A1*-Genexpression. Zur nahezu vollständigen Degradation der entsprechenden mRNA erfolgte die Manipulation der HeLa-Zellen mit 20 nM *SEC61A1* siRNA oder *SEC61A1*-UTR siRNA über einen Zeitraum von 96 h (2.4.4.1). Die Reduktion der  $\alpha$ -Untereinheit führt zu einem Verlust des gesamten Sec61-Komplexes. Zur exakten Auswertung der Resultate hinsichtlich der Reproduzierbarkeit wurden HeLa-Zellen *SEC61A1*-depletiert. Mittels semi-quantitativem Western Blot und densitometrischer Analyse wurde die verringerte Genexpression von *SEC61A1* kontrolliert (2.2.2.2, 2.2.3, 2.2.4). In Abbildung 26 ist das Ergebnis der Untersuchung zur Depletionseffizienz dargestellt.

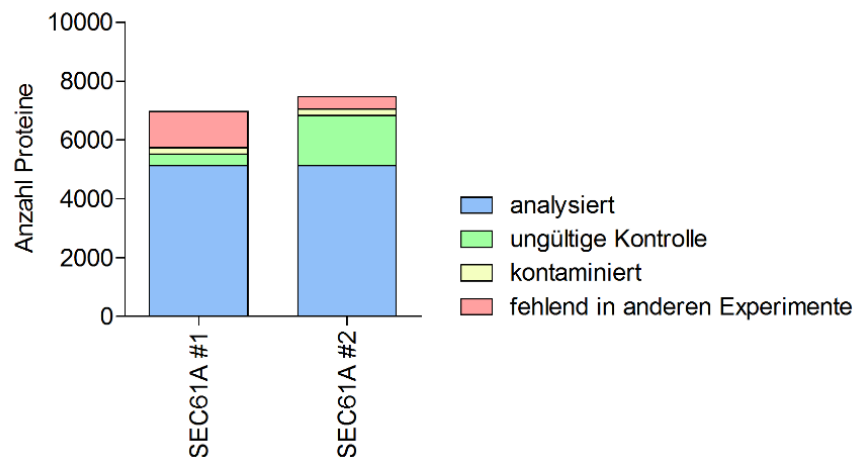
In allen sechs Proben wurde der Sec61 $\alpha$ -Restproteingehalt mit unter 10 % nachgewiesen (A). In B ist ein repräsentativer Western Blot eines Experiments nach immunologischer Detektion von Sec61 $\alpha$  sowie  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle dargestellt.



**Abbildung 26: Überprüfung der Depletionseffizienz von *SEC61A1* mittels Western Blot.**

In zwei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen jeweils in Triplikaten gemäß 2.4.4.1 für 96 h mit *SEC61A1* siRNA (#4), *SEC61A1*-UTR siRNA (#5) bzw. Kontroll-siRNA behandelt und die Depletionseffizienz mittels Western Blot überprüft. **A** zeigt sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweils quantifizierten Restproteingehalts von Sec61 $\alpha$ . Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. **B** zeigt einen repräsentativen Blot eines Experiments mit drei technischen Replikaten. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 20 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Überprüfung der Depletionseffizienz wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12\% / 3 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von Sec61 $\alpha$  erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

In der massenspektrometrischen Analyse konnten  $7212 \pm 356$  Proteine quantitativ charakterisiert werden, was etwa 50 % des gesamten Proteoms der HeLa-Zellen entspricht. Proteine, die keine ausreichende Anzahl an Kontrolldatenpunkten aufwiesen, nicht in allen Proben nachgewiesen wurden sowie Kontaminationen laut MaxQuant Analyse, wurden aus der anschließenden bioinformatischen Untersuchung ausgeschlossen. 5129 Proteine wurden in allen Proben detektiert. Daher wurden diese Proteine nachfolgend einer Proteinmengenbestimmung unterzogen und als „Gesamtproteom“ bezeichnet.

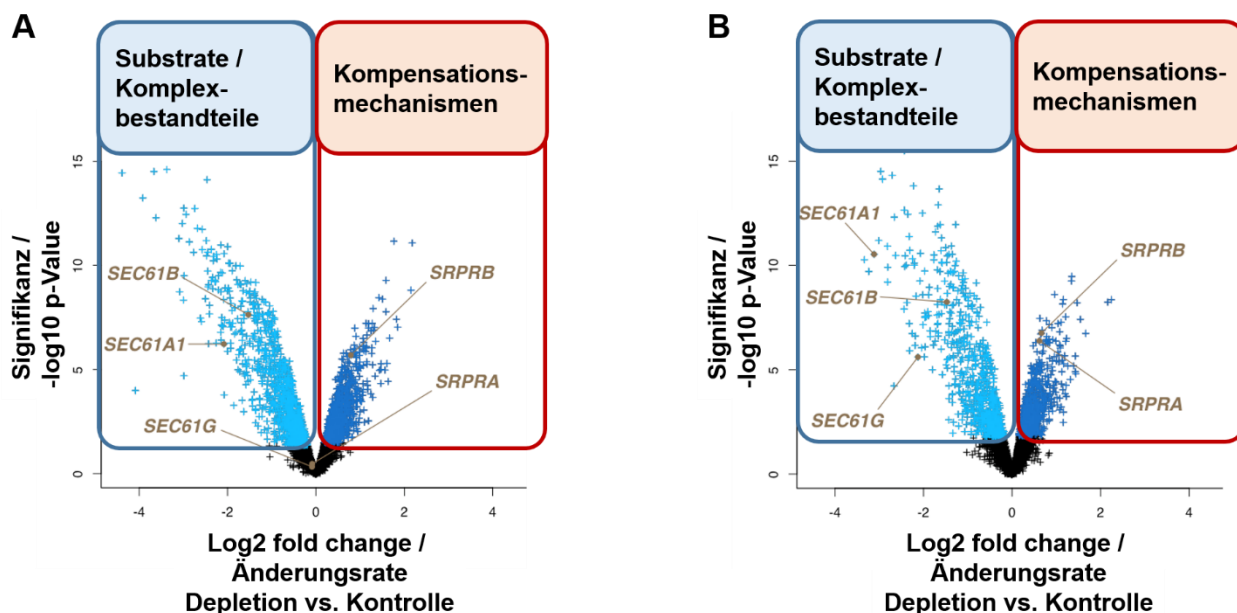


**Abbildung 27: Anzahl der nachgewiesenen Proteine innerhalb der MS-Analyse nach Depletion von *SEC61A1***  
 HeLa-Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit *SEC61A1* siRNA gemäß 2.4.4.1 behandelt. Das resultierende Proteom wurde massenspektrometrisch analysiert. Dargestellt ist die Verteilung der gefundenen Proteine innerhalb der beiden Experimente. Blau: Proteine, die in allen Proben gefunden wurden und weiter analysiert wurden. Grün: Proteine, die keine ausreichende Anzahl an Kontrolldatenpunkten aufweisen. Gelb: Kontaminationen laut MaxQuant Analyse. Rot: Proteine, die nicht in allen Proben gefunden wurden. gesetzt (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Innerhalb der Proteinmengenbestimmung wurden signifikante Veränderungen im Proteingehalt durch die verminderte Genexpression von *SEC61A1* detektiert. Dazu wurden die Daten quantifiziert und statistisch signifikante Veränderungen des Datensatzes der *SEC61A1*-depletierten Zellen gegenüber der Kontrolle aufgezeigt (2.7;  $q < 0,05$ ). Dem Volcano Plot (Abbildung 28) ist die unterschiedliche Beeinflussung der nachgewiesenen Proteine innerhalb der massenspektrometrischen Analyse nach siRNA vermittelter reduzierter Genexpression für eine der beiden siRNAs von *SEC61A1* im Vergleich zur Kontrolle zu entnehmen. „Log2 fold change“ bezeichnet dabei das Maß der Abweichung, „-log10 p-value“ ist das Maß der Signifikanz. Insgesamt wurden 482 Proteine als quantitativ negativ, 342 als quantitativ positiv beeinflusst nachgewiesen.

Die Gruppe der signifikant negativ beeinflussten Proteine umfasst dabei die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  des Sec61-Komplexes sowie von der reduzierten *SEC61A1*-Genexpression sekundär betroffenen Sec61-Substrate.

Im Gegensatz dazu könnte die Gruppe der signifikant positiv beeinflussten Proteine kompensatorisch auf den Verlust des Sec61-Komplexes wirken. So war z.B. der Proteingehalt der beiden Untereinheiten des SRP-Rezeptors quantitativ erhöht.



**Abbildung 28: Volcano Plot zum Experiment nach *SEC61A1* siRNA basierter Proteindepletion**

Die Punkte im Volcano Plot repräsentieren alle massenspektrometrisch quantifizierten Proteine. Diese wurden dabei anhand der unterschiedlichen Beeinflussung nach *SEC61A1* Depletion (**A**: *SEC61A1* siRNA, **B**: *SEC61A1*-UTR siRNA) im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. „Log2 fold change“ bezeichnet das Maß der Abweichung, „-log10 p-value“ ist das Maß der Signifikanz. Positiv beeinflusste Proteine nach *SEC61A1* Depletion sind in dunkelblau, negativ beeinflusste in hellblau dargestellt (veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Die detaillierte Liste der quantifizierten Proteine mit korrespondierenden Gennamen, UniProtKB IDs, und „Log2 fold changes“ sind Nguyen, Stutz et al. (2018) „Supplementary Data 1“ (alle), „Supplementary Data 3“ (negativ beeinflusst), „Supplementary Data 4“ (positiv beeinflusst) und „Supplementary Data 7“ (signifikant beeinflusst) zu entnehmen.

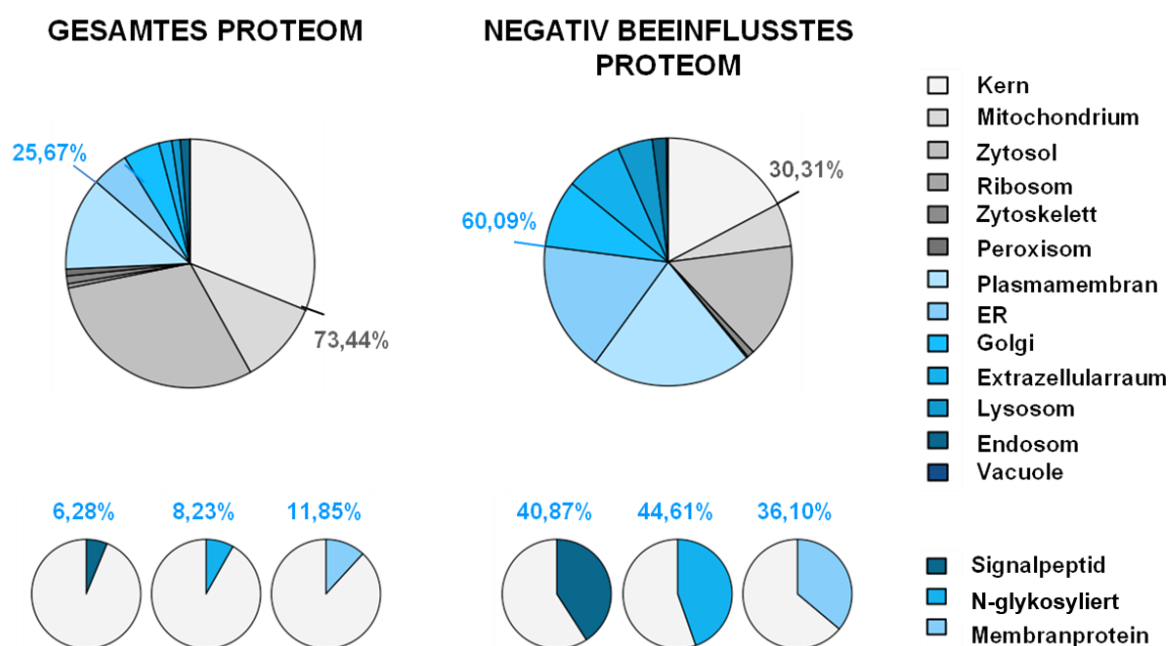
In Abbildung 29 ist die subzelluläre Lokalisation der mittels Proteomanalyse quantifizierten Proteine basierend auf Gene Ontology (GO) Annotationen dargestellt. Innerhalb des gesamten Proteoms wurden 26 % der Proteine dem Endo- und Exozytosewegs zugeordnet. Generell konnten Proteine, mit abspaltbarem Signalpeptid mit 6 % nachgewiesen werden, Glykoproteine mit 8 % und Membranproteine mit 12 %.



Der Anteil der Proteine, die dem sekretorischen Transportweg zugeordnet wurden, erhöhte sich innerhalb der Gruppe negativ beeinflusster Proteine auf 60 %.

Des Weiteren stieg auch der Anteil der Proteine, die ein Signalpeptid aufweisen von 6 % auf 40 %, der Anteil der Glykoproteine von 8 % auf knapp 45 % und der Anteil der Membranproteine von 11 % auf 36 %.

Da vor allem Proteine des sekretorischen Wegs negativ von der Depletion von *SEC61A1* betroffen waren, wurde gemäß der Hypothese in Abbildung 23 angenommen, dass die Vorläuferpolypeptide dieser Gruppe (197 Proteine mit Signalpeptid, 98 Proteine mit Transmembranhelix) Substrate des Sec61-Komplexes sind.



**Abbildung 29: Subzelluläre Lokalisation der Proteine nach *SEC61A1* Depletion.**

Dargestellt ist der Anteil der subzelluläre Lokalisation des gesamten Proteoms sowie des negativ beeinflussten Proteoms nach *SEC61A1* Depletion. In grün sind die Organellen des sekretorischen Transportwegs gekennzeichnet. Zudem wird der Anteil derer Proteine markiert, die innerhalb der Gruppen ein Signalpeptid oder eine N-Glykosylierung aufweisen bzw. es sich um Membranproteine handelt (veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

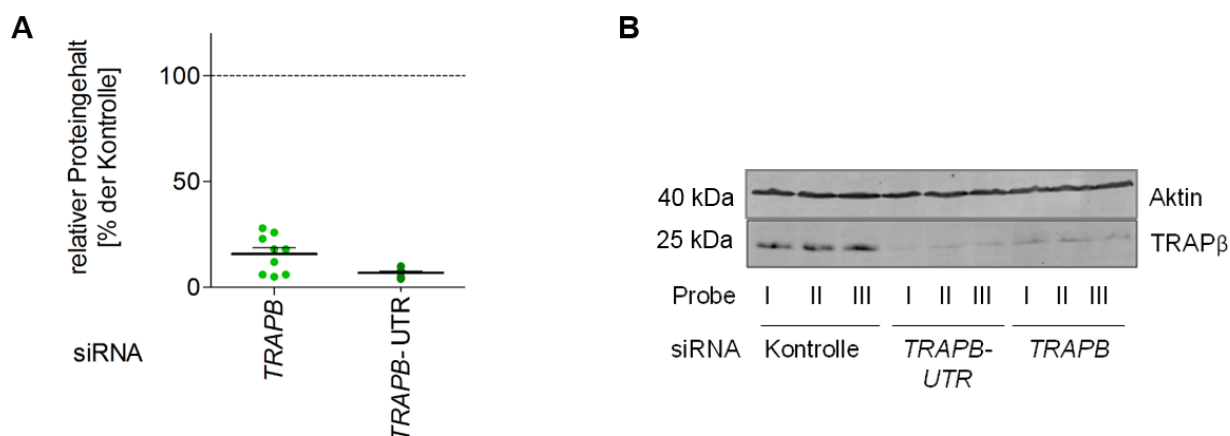
Zusammenfassend kann die experimentelle Strategie der Manipulation humaner Zellen mittels siRNA vermittelter Proteindepletion, markierungsfreier quantitativer Proteomanalyse und der folgenden Proteinmengenbestimmung als erfolgreich dahingehend anerkannt werden, das Substratspektrum des Sec61-Komplexes zu beurteilen.



### 3.1.2. Identifizierung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB*

In 3.1 wurde nachgewiesen, dass durch die massenspektrometrische Analyse mit siRNA manipulierter Zellen Abhängigkeiten zur depletierten Komponente identifiziert werden können. Um nun weiterführend auch Proteine zu identifizieren, die zur korrekten Reifung auf den TRAP-Komplex angewiesen sind, wurden analog HeLa-Zellen durch Anwendung der RNAi-Strategie, die  $\beta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes betreffend, manipuliert. Es folgte die massenspektrometrische, quantitative Analyse des Proteoms sowie die bioinformatische, statistische Auswertung zur weiteren Untersuchung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes gemäß Abbildung 25.

In drei biologischen Replikaten mit je drei technischen Replikaten wurden HeLa-Zellen *TRAPB* depletiert. Dazu wurde gemäß Kapitel 2.4.4.1 vorgegangen und HeLa-Zellen ausgesät, mit 10 nM *TRAPB*- bzw. *TRAPB*-UTR sowie Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Im Anschluss an die Zellernte nach 96 h erfolgte die Aufbereitung der Zellen sowie die semi-quantitative Western Blot Analyse (2.4.5). In Abbildung 30 ist das Ergebnis zur Überprüfung der RNAi vermittelten *TRAPB* Depletionseffizienz mittels semi-quantitivem Western Blot dargestellt. Der TRAP $\beta$ -Restproteingehalt wurde durch Behandlung der HeLa-Zellen mit *TRAPB* siRNA mit unter 25 % nachgewiesen, mit *TRAPB*-UTR siRNA mit unter 10 % (A). B zeigt einen repräsentativen Western Blot eines Experiments nach immunologischer Detektion von TRAP $\beta$  sowie  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle.

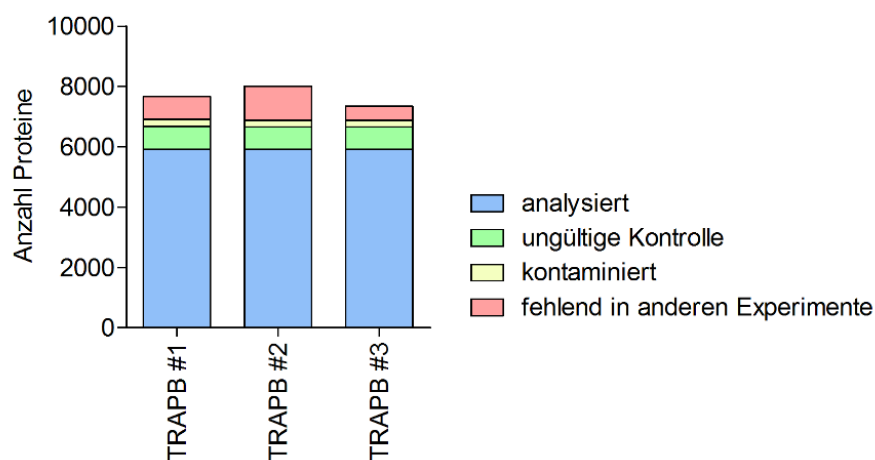


**Abbildung 30: Überprüfen der Depletionseffizienz von *TRAPB* mittels Western Blot**

In drei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen in Triplikaten gemäß 2.4.4.1 für 96 h mit *TRAPB* siRNA (#3), *TRAPB*-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt und die Depletionseffizienz mittels Western Blot überprüft. **A** stellt sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweils quantifizierten Restproteingehalts von TRAP $\beta$  dar. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. **B** zeigt einen repräsentativen Blot eines Experiments.

Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen pro 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Überprüfung der Depletionseffizienz wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12 %,  $3 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von TRAP $\beta$  erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Es wurden innerhalb der quantitativen MS-Analyse  $7670 \pm 332$  Proteine charakterisiert. Proteine, die keine ausreichende Anzahl an Kontrolldatenpunkten aufwiesen, nicht in allen Proben nachgewiesen wurden sowie Kontaminationen laut MaxQuant Analyse, wurden aus anschließenden bioinformatischen Untersuchung ausgeschlossen. 5911 Proteine konnten in allen Proben detektiert werden und wurden folgend der Proteinmengenbestimmung unterzogen (Abbildung 31).

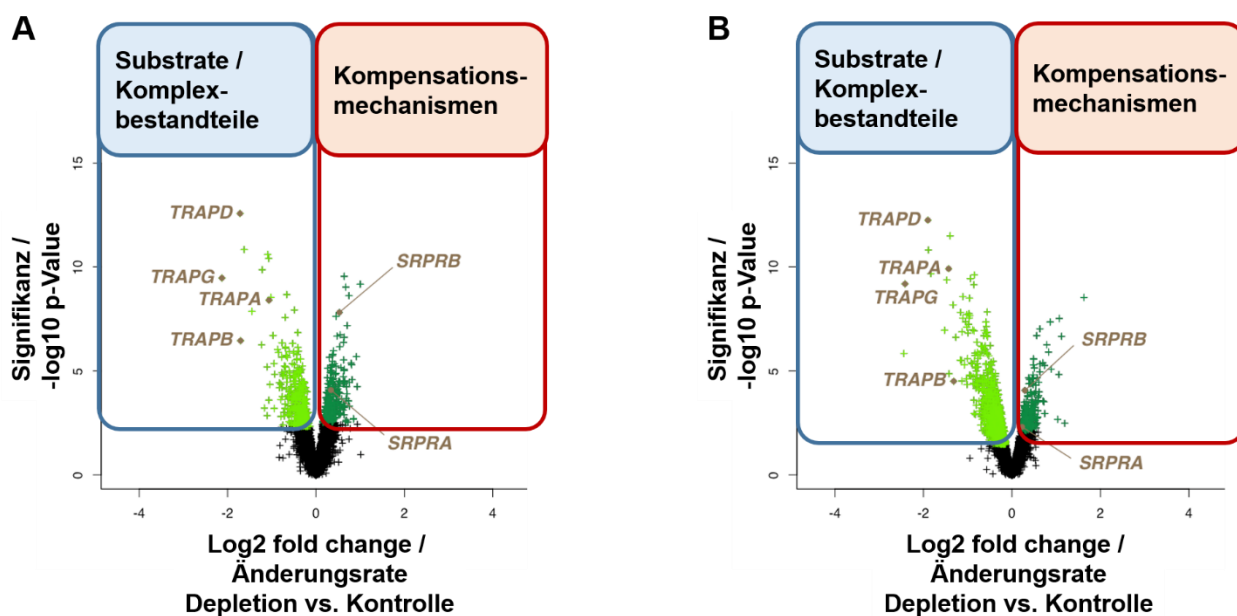


**Abbildung 31: Anzahl der nachgewiesenen Proteine innerhalb der MS-Analyse nach Depletion von TRAPB**  
HeLa-Zellen wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit TRAPB-UTR siRNA gemäß 2.4.4.1 behandelt. Das resultierende Proteom wurde massenspektrometrisch quantitativ analysiert (2.6). Dargestellt ist die Verteilung der gefundenen Proteine innerhalb der beiden Experimente. Blau: Proteine, die in allen Proben gefunden wurden (5911) und weiter analysiert wurden. Grün: Proteine, die keine ausreichende Anzahl an Kontrolldatenpunkten aufwiesen (TRAP#1: 769 / TRAP#2: 739 / TRAP#3: 751). Gelb: Kontaminationen laut MaxQuant Analyse (TRAP#1: 235 / TRAP#2: 224 / TRAP#3: 216). Rot: Proteine, die nicht in allen Proben gefunden wurden (TRAP#1: 744 / TRAP#2: 1133 / TRAP#3: 464).

Innerhalb der Proteinmengenbestimmung wurden signifikante Veränderungen im Proteingehalt durch die verminderte Genexpression von TRAPB detektiert. Dazu wurden die Daten quantifiziert und statistisch signifikante Veränderungen des Datensatzes der TRAPB-depletierten Zellen gegenüber der Kontrolle aufgezeigt (2.7;  $q < 0,05$ ).

Die Daten nach *TRAPB* Depletion sind dabei je Experiment gemittelt aus den Einzeldaten gewonnen nach Zellmanipulation mit *TRAPB* siRNA bzw. mit *TRAPB*-UTR siRNA. Im Volcano Plot (Abbildung 32) ist die unterschiedliche Beeinflussung der nachgewiesenen Proteine innerhalb der massenspektrometrischen Analyse nach siRNA vermittelter reduzierter Expression von *TRAPB* im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Insgesamt wurden 180 Proteine als negativ, 77 als positiv beeinflusst nachgewiesen ( $q < 0,05$ ). Die Gruppe der signifikant negativ beeinflussten Proteine umfasst dabei die Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  des TRAP-Komplexes sowie von der reduzierten *TRAPB*-Genexpression sekundär betroffenen TRAP-Substrate.

Im Gegensatz dazu könnte die Gruppe der signifikant positiv beeinflussten Proteine kompensatorisch auf den Verlust des TRAP-Komplexes wirken. So war z.B. der Proteingehalt der beiden Untereinheiten des SRP-Rezeptors quantitativ erhöht.



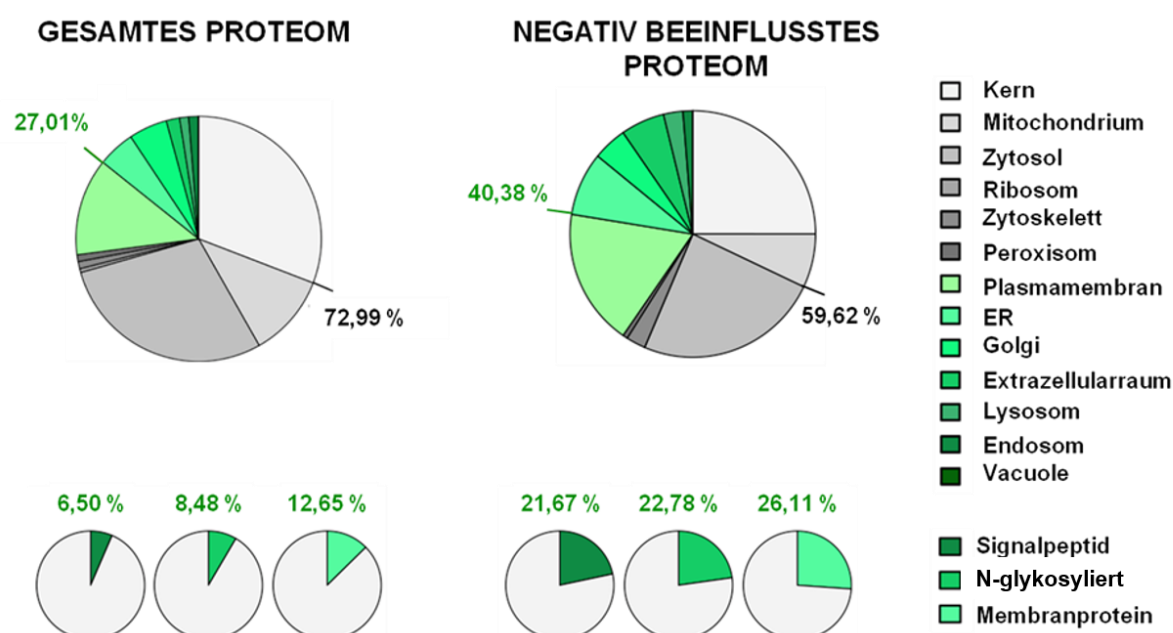
**Abbildung 32: Volcano Plot zum Experiment nach *TRAPB* siRNA basierter Zellmanipulation.**

Die Punkte im Volcano Plot repräsentieren alle massenspektrometrisch quantifizierten Proteine. Diese wurden dabei anhand der unterschiedlichen Beeinflussung nach *TRAPB* Depletion (**A**: *TRAPB* siRNA, **B**: *TRAPB*-UTR siRNA) im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. „ $\log_2$  fold change“ bezeichnet dabei das Maß der Abweichung, „ $-\log_{10} p\text{-value}$ “ ist das Maß der Signifikanz. Positiv beeinflusste Proteine nach *TRAPB* Depletion sind in dunkelgrün, negativ beeinflusste in hellgrün dargestellt (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

In Abbildung 33 ist die subzelluläre Lokalisation der innerhalb der Proteomanalyse quantifizierten Proteine basierend auf Gene Ontology (GO) Annotationen dargestellt. Innerhalb des gesamten Proteoms konnten 27 % der Proteine dem sekretorischen Transportweg zugeordnet werden. Dieser Anteil stieg innerhalb der Gruppe negativ beeinflusster Proteine auf 40 % an.

Des Weiteren erhöhten sich auch der Anteil der Proteine, die ein Signalpeptid besitzen von 6 % auf 21 %, der Anteil der Membranproteine von 12 % auf 26 % und der Anteil der Glykoproteine von 8 % auf 22 %, Membranproteine von 11 % auf 36 %. Da vor allem Proteine des sekretorischen Wegs negativ von der Depletion von *TRAPB* betroffen waren, wurde gemäß der Hypothese in Abbildung 24 angenommen, dass die Vorläuferpolypeptide dieser Gruppe (38 Proteine mit Signalpeptid, 22 Membranproteine) Substrate des TRAP-Komplexes sind.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die Gruppen der quantitativ negativ beeinflussten Proteine, aufgrund der reduzierten Genexpression von *TRAPB* und *SEC61A1* sich zu 40 % überschneiden.



**Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation der massenspektrometrisch quantifizierten Proteine nach siRNA vermittelter *TRAPB* Depletion**

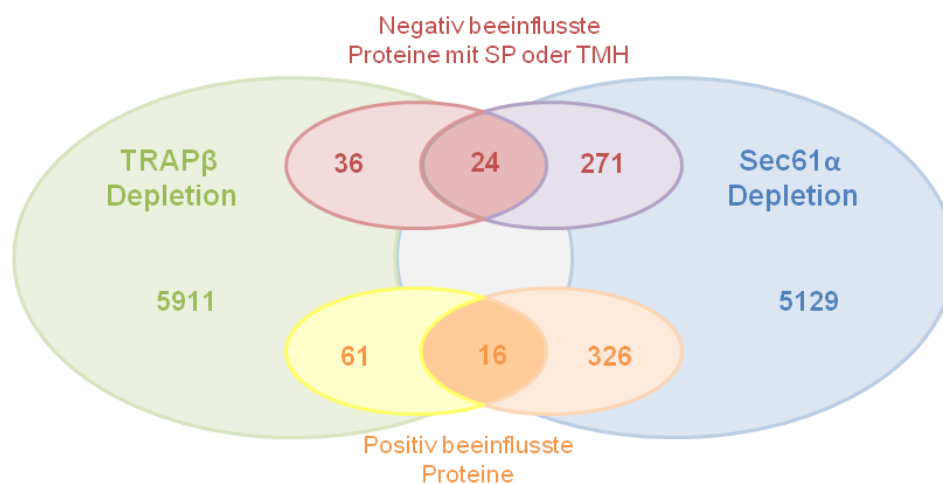
Dargestellt ist der Anteil der subzelluläre Lokalisation des gesamten Proteoms sowie des negativ beeinflussten Proteoms nach *TRAPB* Depletion basierend auf UniProtKB Daten. In grün sind die Organellen des sekretorischen Transportwegs gekennzeichnet. Zudem wird der Anteil derer Proteine markiert, die innerhalb der Gruppen ein Signalpeptid oder eine N-Glykosylierung aufweisen bzw. es sich um Membranproteine handelt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Des Weiteren wurde überprüft, welche Proteine sowohl aufgrund der Genexpressionsminderung von *TRAPB* als auch von *SEC61A1* gleichermaßen betroffen waren (Abbildung 34):

Nach reduzierter Expression von *TRAPB* wurden 5911 Proteine in allen drei biologischen Replikaten nachgewiesen, 5129 nach Depletion von *SEC61A1*.

Vergleichend zur Kontrolle waren nach Transfektion der HeLa-Zellen mit *TRAPB* siRNA 70 Proteine mit Signalpeptid (Tabelle 23) oder N-terminaler Transmembranhelix negativ beeinflusst (Tabelle 24); nach Behandlung mit *SEC61A1* siRNA 295 Proteine. 24 Proteine waren in beiden Gruppen zu finden. Diese Proteine wurden als potentielle TRAP-Substrate identifiziert. In ihrer Quantität positiv beeinflusst wurden nach Depletion von *TRAPB* 76 Proteine, nach verringerter Genexpression von *SEC61A1* 342 Proteine. In beiden Gruppen wurden 16 gleiche Proteine nachgewiesen. Bei diesen Proteinen könnte es sich solche Proteine handeln, welche die verminderte Abundanz des TRAP-Komplexes kompensieren.

Eine Auswahl der potentiellen TRAP-Substrate sowie der kompensatorisch regulierten Proteine wurde zur Validierung der Substrate selbst und deren Eigenschaften in Kapitel 3.2 verwendet.



**Abbildung 34: Quantitative Auswertung der mittels MS detektierten Proteine nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* und *SEC61A1***

Nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* wurden 5911 Proteine in allen drei biologischen Replikaten nachgewiesen, 5129 nach Depletion von *SEC61A1*. Vergleichend zur Kontrolle waren nach Transfektion der HeLa-Zellen mit *TRAPB* siRNA 60 Proteine mit Signalpeptid oder N-terminaler Transmembranhelix negativ beeinflusst; nach Behandlung mit *SEC61A1* siRNA 295 Proteine. 24 Proteine waren in beiden Gruppen zu finden. In ihrer Quantität positiv beeinflusst wurden nach Depletion von *TRAPB* 77 Proteine, nach Depletion von *SEC61A1* 342 Proteine. In beiden Gruppen wurden 16 gleiche Proteine nachgewiesen.

**Tabelle 23: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Proteine mit absaltbarer Signalsequenz nach siRNA vermittelter *TRAPB* Depletion**

Die Aminosäuresequenzen von Signalpeptiden potentieller TRAP-Substrate sind zusammen mit der zugehörigen UniProtKB-ID des Proteins und Gennamen gelistet. Das Vorhandensein einer N-Glykosylierung (N-Glyk) oder Transmembrandomäne (TM) im reifen Teil der Proteine ist angezeigt. Der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin ist angegeben (GP [%]) genauso wie der Hydrophobizitätsscore (Hph) jeweils das Signalpeptid betreffend. Auf Grundlage der Phobius-Vorhersage ([www.phobius.sbc.su.se](http://www.phobius.sbc.su.se)) sind die Aminosäuresequenzen unterteilt in N-terminale, hydrophobe und C-terminale Domänen. Für PPIC zeigt UniProtKB kein Signalpeptid an, dem entgegen steht jedoch die Signalpeptidvorhersage für PPIC durch SignalP 4.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)). Markiert sind außerdem Proteine, die ebenfalls nach Depletion von *SEC61A1* als vermindert nachgewiesen wurden (\*), in 3.2 validierte TRAP-Substrate (\*\*), Untereinheiten des OST-Komplexes (\*\*\*). Sil1 und Calreticulin in Blau, mittels Proteomanalyse nicht zweifelsfrei als TRAP-Substrat identifiziert. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

UniProtKB ID	Gen	Signalpeptid	TM	N-Glyk	GP [%]	Hph
Q9UM22 *	EPDR1	MPGRAPLRTVPGALGAWLLGGLWAWT LCGLCSLGAVG	-	+	29,7	0,727
Q9H6X2 *	ANTXR1	MATAERRALGIGFQWLSLATLVLICAG	+	+	15,6	0,262
Q8IWB1	ITPRIP	MAMGLFRVCLVVVTA	-	+	6,7	1,951
O00622	CYR61	MSSRIARALALVVTLHLTRLALS	-	-	0	1,017
P54802	NAGLU	MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAG	-	+	21,7	1,461
Q9GZX9	TWSG1	MKLHYVAVLTLAILMFLTWLPESLS	-	+	4,0	1,269
Q13454	TUSC3 ***	MGARGAPSRRRQAGRRLRYLPTGSFP FLLLLLLLCIQLGGG	+	-	24,4	-0,01
Q9Y3A6 */**	TMED5	MGDKIWLFPFVLLLAALPPVLLPGAAG	+	-	29,6	1,074
Q9H0U3	MAGT1	MAARWRFWCVSVTMVVALLIVCDVPSA SA	+	+	3,5	1,227
Q13214	SEMA3B	MGRAGAAAVIPGLALLWAVGLGSA	-	+	25,0	1,106
Q9BRR6 *	ADPGK	MALWRGSAYAGFLALAVGCVFL	-	-	13,6	1,356
P02751	FN1	MLRGPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGA	-	+	25,8	0,161
P45877 */**	PPIC	MGPGRLLLPLVLCVGLGALVFSSGAE G	-	+	32,1	1,063
Q9UMX5	NENF	MVGPAPRRRLRPLAALALVLALAPGLPT ARA	-	-	22,6	0,281
O14773	TPP1	MGLQACLLGLFALISGKCSY	-	+	15,8	1,526
P15941 *	MUC1	MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTG	+	+	17,4	1,310
Q15582	TGFBI	MALFVRLLALALALALGPAATLA	-	-	8,7	1,729
O75629	CREG1	MAGLSRGSARALLAALLASTLLALLVSP ARG	-	+	12,9	0,880
Q9ULF5 *	SLC39A10	MKVHMHTKFCLICLLTFIFHHCNHC	+	+	0	0,707
Q08380	LGALS3BP	MTPPRLFVWVLLVAGTQG	-	+	22,2	0,523
P08069 *	IGF1R	MKSGSGGGSP <sup>T</sup> SLWGLLFLSAALSLW PTSG	+	+	26,7	0,404

Tabelle 23 (Fortsetzung): Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Proteine mit abspaltbarer Signalsequenz nach siRNA vermittelter *TRAPB* Depletion

UniProtKB ID	Gen	Signalpeptid	TM	N-Glyk	GP [%]	Hph
P08572 *	COL4A2	MGRDQRAVAGPALRRW <u>LL</u> LGTVTVGF LAQSVLA	-	+	20,0	-0,04
Q8N2U0 *	TMEM256	MAGPAAAFRR <u>LG</u> ALSGAAALGFASYGA HG	+	-	24,1	0,292
Q9UBV2 *	SEL1L	MRVRIGL <u>TL</u> LLCAVLLSLASA	+	+	4,8	1,651
Q969V3	NCLN	MLEEAGEVLENMLKASCLPLGFIVFLPA VLLLVAAPPLPAADA	+	+	16,7	1,038
O14672 *	ADAM10	MVLLRVL <u>IL</u> LLLSWAAGMG	+	+	15,8	1,775
P11117 */**	ACP2	MAGKRSGWSRA <u>ALL</u> QLLLGVNLVVMP PTRA	+	+	16,7	0,304
P06756 *	ITGAV	MAFP <u>RR</u> RLRLGPR <u>GL</u> PLLSGLLLPLC RA	+	+	29,7	0,163
Q12907	LMAN2	MAAEGWIWRWGWRRCLGRPGLLGP GPGPTT <u>PL</u> FLLLLLSVTA	+	+	31,8	0,230
P56937	HSD17B7	MRK <u>V</u> LITGASSIGLALCKRL	+	+	19,1	1,733
P39656 */**	DDOST ***	MGYFRCARAGSFGRRRKMEPSTAARA WALFW <u>LL</u> PLLGAVCA	+	-	14,3	0,115
Q8TB61	SLC35B2	MDARWWAVVVLA <u>AF</u> PSLGAG	+	-	23,8	0,627
Q6PIU2	NCEH1	MRSSC <u>V</u> LLTALVALA	-	+	14,3	1,617
Q5JPE7	NOMO2	MLVGQAG <u>LL</u> GPAVVTA <u>AV</u> LLLSGVG PAHG	+	+	29,0	1,259
P08236	GUSB	MARGSA <u>V</u> A <u>WA</u> ALG <u>PL</u> WGCALG	-	+	22,7	0,883
P00533 *	EGFR	MRPSGT <u>A</u> GA <u>LL</u> L <u>LA</u> ALCPASRA	+	+	16,7	0,634
Q5VW38	GPR107	MAALAPVGSPASRG <u>P</u> RL <u>AA</u> GLRLLPML GLL <u>QL</u> LA <u>E</u> PGLG	-	+	28,2	0,538
QBN129 *	CNPY4	MGPVRL <u>G</u> ILLFL <u>FL</u> AVHEAWA	-	-	14,3	1,312
Q9H173 */**	SII1	MAPQSLPSSRM <u>A</u> PLG <u>ML</u> L <u>G</u> LLMAAC <u>F</u> <u>F</u> CLS	-	+	16,1	0,992
P27797 */**	CALR	<u>ML</u> LSV <u>PL</u> LL <u>G</u> LLGLAVA	-	+	17,6	2,307

**Tabelle 24: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine ohne abspaltbarem Signalpeptid nach siRNA vermittelter TRAPB Depletion**

Die Aminosäuresequenzen von N-terminalen Transmembrandomänen plus benachbarte Regionen potentieller TRAP-Substrate sind zusammen mit der zugehörigen UniProtKB-ID des Proteins und Gennamen gelistet. Das Vorhandensein einer N-Glykosylierung (N-Glyk) ist angezeigt. Der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin ist angegeben (GP [%]) genauso wie der Hydrophobizitätsscore (Hph) jeweils die N-terminale Transmembrandomäne betreffend. Diese wurde mittels TMHMM server 2.0 identifiziert ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)). Markiert sind außerdem Proteine, die ebenfalls nach Depletion von *SEC61A1* als vermindert nachgewiesen wurden (\*), in 3.2 validierte TRAP-Substrate (\*\*), Untereinheiten des OST-Komplexes (\*\*\*). (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

UniProt ID	Gen	<u>N-terminale Transmembranhelix</u>	N-Glyk	GP [%]	Hph
O15121	DEGS1	<u><sup>33</sup>IKSLMKPDPNLIWIIIMMVLTLQLGAFYIVKKDL</u> DWKWWIF	-	9,5	1,801
Q99519 *	NEU1	<u><sup>10</sup>LPDRRWGPRILGFWGGCRVWVFAAIFLLLSL</u> AASWSKAENDFG	+	17,0	0,193
P61803 */**	DAD1 ***	<u><sup>19</sup>STPQRLKLLDAYLLYILLTGALQFGYCLLVGT</u> FPFNSFLSGFI	-	14,3	1,662
P04920 *	SLC4A2	<u><sup>699</sup>DFRDALDPQCLAAVIFIYFAALSPAIFGGLL</u> GEKTQDLIGVS	+	16,7	1,791
P41221	WNT5A	<u><sup>15</sup>GMAGSAMSSKFFLVALAIFFSFAQVVIEANS</u> WWSLGMNPNVQM	+	14,3	1,135
Q68CQ7	GLT8D1	<u><sup>1</sup>MSFRKVNIIILVLAVALFLLVLHHNFLSLSSLLR</u>	+	0	2,386
Q15629	TRAM1	<u><sup>20</sup>LQNHADIVSCVAMVFLGLMFEITAKASIIFVT</u> LQYNVTLPAT	+	4,8	1,888
P55061 *	TMBIM6	<u><sup>20</sup>TPSTQQHLKKVYASFALCMFVAAAGAYVHM</u> VTHFIQAG	-	4,8	1,531
Q5T9L3 *	WLS	<u><sup>3</sup>GAIENMSTKKLCIVGGILLVFQIIAFLVGGLIAP</u> GPTTAVSY	-	19,1	1,230
Q8TCJ2 */**	STT3B ***	<u><sup>55</sup>AGLSGGLSQPAGWQSLLSFTILFLAWLAGFS</u> SRLFAVIRF	+	14,3	1,225
Q6UW68	TMEM205	<u><sup>5</sup>GNLGGLIKMVHLLVLSGAWGMQMWVTFVSG</u> FLFRSLPRHTFG	-	14,3	1,385
Q643R3	LPCAT4	<u><sup>30</sup>HLSRLQRVKFCLL GALLAPIRVLLAFIVLFLW</u> PFAWLQVAGL	+	8,7	2,387
P35610	SOAT1	<u><sup>130</sup>DELLEVDHIRTIIYHMFIALILFILSTLVVDYID</u> EGRLVLEFS	-	0	2,542
Q9UIQ6 *	LNPEP	<u><sup>102</sup>ACSVPSARTMVVCAFVIVVAVSVIMVIYLLP</u> RCTFTKEGC	+	0	3,057
P11166	SLC2A1	<u><sup>2</sup>EPSSKLTGRLMLAVGGAVLGSQFGYNTGV</u> INAPQKVIEEFY	+	22,7	1,196
Q8TCT9	HM13	<u><sup>22</sup>TTRPPSTPEGIALAYGSLLL MALLPIFFGALR</u> SVRCARGKNAS	+	14,3	2,025
Q15005 *	SPCS2	<u><sup>70</sup>EKYKYVENFGLIDGRLTICTISCFFAIVALIWD</u> YMHPFPESKP	-	4,8	1,516
Q8NHP6 *	MOSPD2	<u><sup>483</sup>KLEDQVQRCIWFQQLLSLTMLLLAFVTSFF</u> YLLYS	-	0	2,133



**Tabelle 24 (Fortsetzung): Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine ohne abspaltbarem Signalpeptid nach siRNA vermittelter *TRAPB* Depletion**

UniProt ID	Gen	<u>N-terminale Transmembranhelix</u>	N-Glyk	GP [%]	Hph
Q9NW15	ANO10	<sup>197</sup> IDSIRGYFGETIALYFGFLEYFTFALIPMAVIG LPYYLFWWED	-	9,5	1,736
A0PJW6	TMEM223	<sup>34</sup> VLLFEHDRGRFFLILGLFCAGQGVFWASMA VAAVSRPPVPV	-	14,3	1,531
P08962	CD63	<sup>2</sup> AVEGGMKCVKFLLYVLLLAFCACAVGLIAVG VGAQLVLSQT	+	9,52	2,491
Q9BZH6	WDR11	<sup>1117</sup> CSPQVNQKSKALLVLLSLGCFFSVAETLHS MRYFDRAALFV	-	4,76	1,627

Die detaillierte Liste aller quantifizierten Proteine mit korrespondierenden Gennamen, UniProtKB IDs, und Log2fold changes sind Nguyen, Stutz et al. (2018) „Supplementary Data 2“ (alle), „Supplementary Data 5“ (negativ beeinflusst), „Supplementary Data 6“ (positiv beeinflusst) und „Supplementary Data 7“ (signifikant beeinflusst) zu entnehmen.

### 3.2. Validierung der Ergebnisse der Proteomanalyse

Zur finalen Bestätigung des aus der reduzierten Genexpression von *TRAPB* resultierenden Phänotyps, wurde eine Auswahl der Ergebnisse der Proteomanalyse im nächsten Schritt validiert. Aus der Gruppe derer Proteine, negativ beeinflusst sowohl nach Depletion von *SEC61A1* als auch *TRAPB*, wurden einige Kandidaten ausgewählt und in Folgeuntersuchungen als potentielle TRAP-Substrate verifiziert. Unterstützend erfolgte auch die Untersuchung hinsichtlich solcher Kandidaten, welche nur nach reduzierter Genexpression von *SEC61A1* quantitativ vermindert nachgewiesen wurden. Zudem konnten innerhalb der beiden Proteomanalysen gezeigt werden, dass die Untereinheiten des SRP-Rezeptors quantitativ erhöht waren. Auch dies wurde im Folgenden weitergehend untersucht.

In unabhängigen Experimenten, gleichartig zur Proteomanalyse, wurden dazu HeLa-Zellen mittels siRNA vermittelter Proteindepletion manipuliert (2.4.4.1). Zum einen wurden dazu zwei verschiedene gegen *TRAPB* gerichtete siRNAs verwendet und zum anderen eine Kontroll-siRNA als Negativkontrolle sowie *SEC61A1* siRNA als Positivkontrolle. Die Zellen wurden nach 96-stündiger Manipulation geerntet, anschließend der Gehalt der Proteine von Interesse auf Basis von Western Blots detektiert und mittels Densitometrie quantifiziert (2.2).

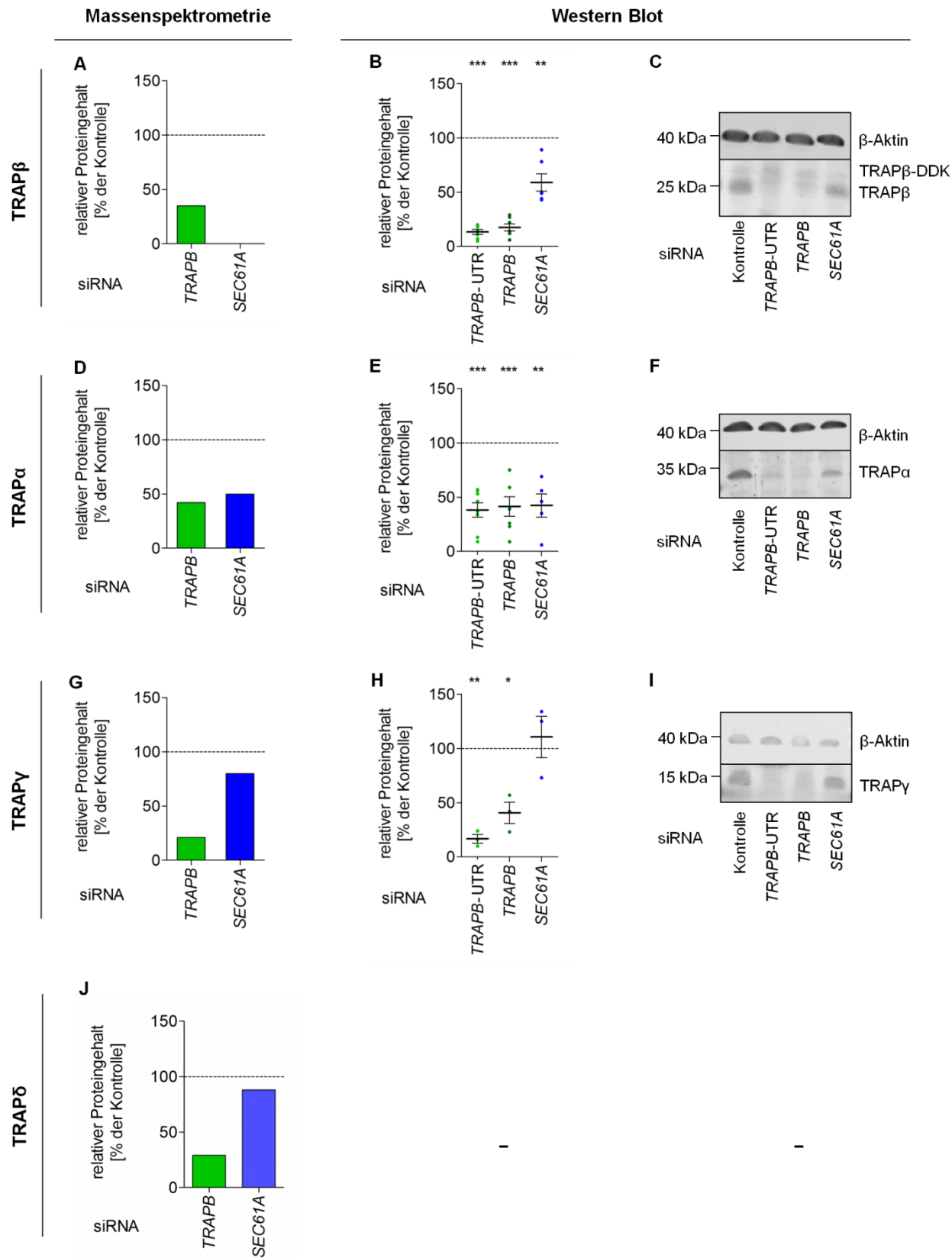
Zur zweifelsfreien Identifizierung der Modellproteine als echte TRAP-Substrate wurden Rettungsexperimente durchgeführt.

Dabei wurde überprüft, ob die sekundären Effekte, resultierend aus der transienten Genexpressionsminderung durch RNAi, aufgehoben werden können. Die Rettung des Phänotyps erfolgte durch Expression eines Plasmids welches für *TRAPB*-cDNA kodiert und resistent gegenüber der gleichzeitig eingesetzten *TRAPB*-UTR siRNA (2.4.4.3) ist. Zusätzlich zur Validierung der einzelnen Substrate auf Proteinebene wurde für einige Modellproteine auch der mRNA-Gehalt mittels qRT-PCR analysiert um potentiell transkriptionelle Effekte auszuschließen (2.3.2.3). Ergänzend erfolgte die massenspektrometrische Analyse der zur Verfügung gestellten CDG-Fibroblasten, chronisch TRAP-depletierter Zellen massenspektrometrisch sowie die Untersuchung auf Western Blot Basis hinsichtlich ihres Proteingehalts der potentiellen TRAP-Substrate.

Eine zusammenfassende Übersicht der Western Blot basierten Ergebnissen im Vergleich zu den Daten der Massenspektrometrie jeweils nach siRNA vermittelter Proteindepletion ist Tabelle 25 zu entnehmen.

### **3.2.1. Der TRAP Komplex wird nach Depletion der beta-Untereinheit degradiert**

Es wurde zunächst untersucht, wie sich die Depletion von *TRAPB* auf die anderen Untereinheiten des TRAP-Komplexes auswirkt (Abbildung 35). Innerhalb der massenspektrometrischen Analyse wurde evaluiert, dass auch die Untereinheiten  $\beta$  (A),  $\alpha$  (D),  $\gamma$  (G) und  $\delta$  (J) in *TRAPB*- bzw. *SEC61A1*-depletierten HeLa-Zellen signifikant in ihrer Quantität vermindert waren. TRAP $\beta$  wurde nach Transfektion der HeLa-Zellen mit *SEC61A1* siRNA nur in einem von zweien Experimenten nachgewiesen und wurde daher an dieser Stelle nicht berücksichtigt. Des Weiteren wurden unabhängige Depletionsexperimente durchgeführt, um den Gehalt der TRAP-Untereinheiten  $\alpha$  (E, F),  $\beta$  (B, C) und  $\gamma$  (H, I) mittels Densitometrie nach Western Blot Analyse zu quantifizieren. Dargestellt sind jeweils die Einzelergebnisse aller durchgeführten Experimente sowie ein repräsentativer Blot eines Experiments. Diese Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass zum einen die hoch signifikante Depletion der  $\beta$ -Untereinheit durch beiden verwendeten siRNAs gewährleistet werden kann und zum anderen auch die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\gamma$  quantitativ signifikant reduziert werden.

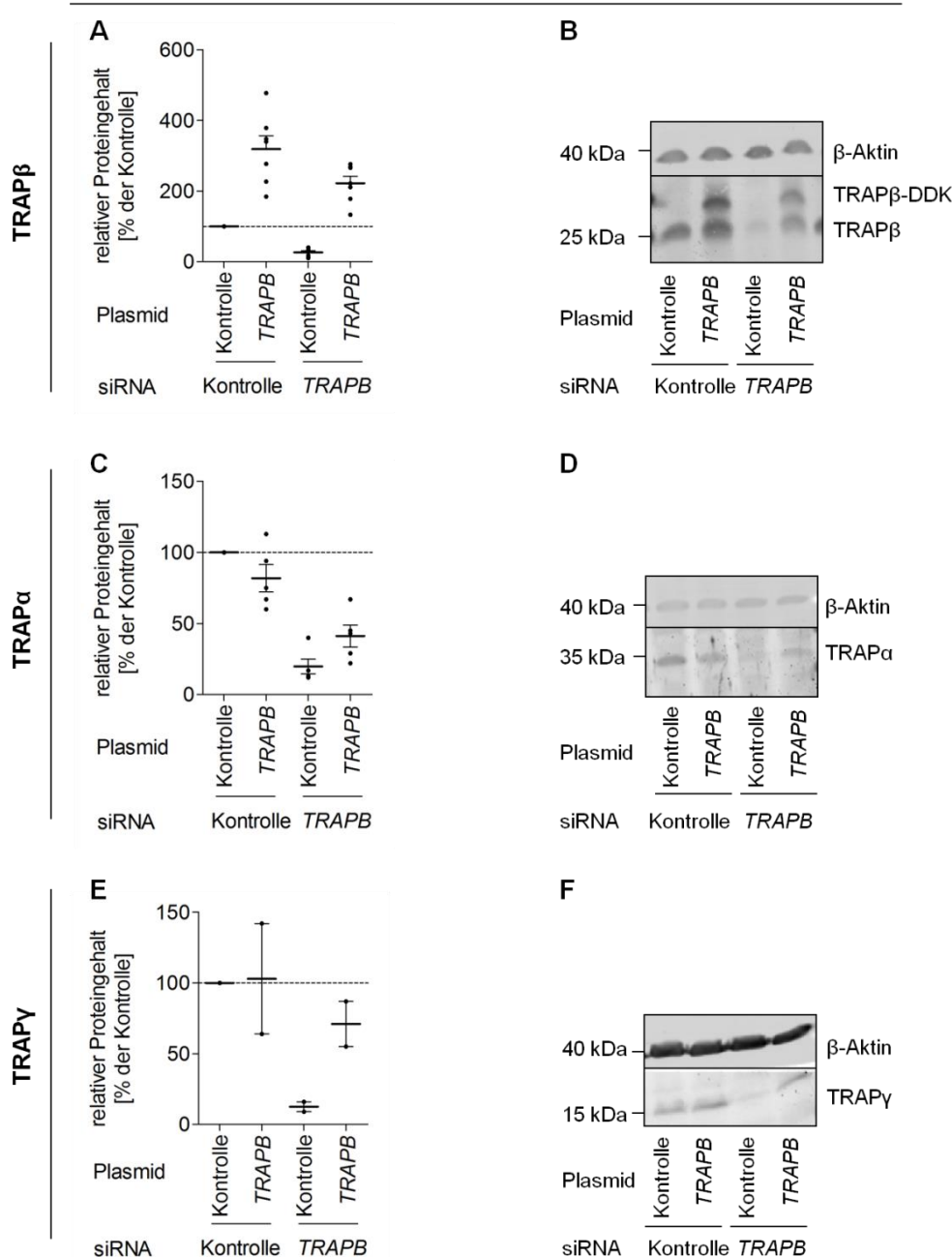


**Abbildung 35: Untersuchung des relativen Proteingehalts der Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion (96 h).**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$  und  $\delta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion für 96 h gemäß 2.6 quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, D, G, J** zeigen die Mittelwerte des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach *TRAPB* Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation der HeLa-Zellen mittels *TRAPB* siRNA und *TRAPB*-UTR siRNA, jeweils  $n = 3$ ) bzw. *SEC61A1* Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation der HeLa-Zellen mittels *SEC61A1* siRNA und *SEC61A1*-UTR siRNA, jeweils  $n = 2$ ) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B, E, H** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA bzw. *SEC61A1* Depletion quantifiziert (**B**:  $n = 10$ , **E**:  $n = 9$ , **H**:  $n = 3$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach siRNA vermittelter Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8). In **C, F, I** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **B, E & H** dargestellt. Zur Bestimmung des Restproteingehalts der TRAP-Komplex-Untereinheiten wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $15\%$ ,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von TRAP $\beta$ , TRAP $\alpha$  und TRAP $\gamma$  erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziegenanti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziegenanti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in  $5\%$  Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich  $100\%$  gesetzt (Daten A – F veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Um zu verifizieren, dass die beobachteten Sekundäreffekte, die quantitative Verminderung des Proteingehalts von TRAP $\alpha$  sowie TRAP $\gamma$ , der verringerten Genexpression von *TRAPB* zugrunde liegen, wurden Rettungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit einer *TRAPB*-UTR siRNA manipuliert, was zur Degradation der *TRAPB* mRNA führt. Durch simultane Transfektion der Zellen mit einem Plasmid, welches für siRNA-resistente *TRAPB*-cDNA mit C-terminalem *Myc*-DDK-Tag kodiert und die UTR-Sequenz nicht enthält, sollte der Phänotyp nach siRNA vermittelter TRAP $\beta$ -Depletion kompensiert werden. Im Western Blot konnte folgend zwischen endogenem und plasmidkodiertem TRAP $\beta$  aufgrund des Massenunterschieds durch den *Myc*-DDK-Tag unterschieden werden. Aus Abbildung 36 wird ersichtlich, dass durch die gleichzeitige Depletion von *TRAPB* und Expression von *TRAPB*-*Myc*-DDK die Proteinlevel der untersuchten TRAP-Komplex-Untereinheiten wiederhergestellt wurden (A: TRAP $\beta$ , B: TRAP $\alpha$ , C: TRAP $\gamma$ ). Dieses Ergebnis bildet die Grundlage dafür, dass durch diese Strategie weitere potentielle TRAP-Substrate spezifisch als solche identifiziert werden konnten.

## Western Blot



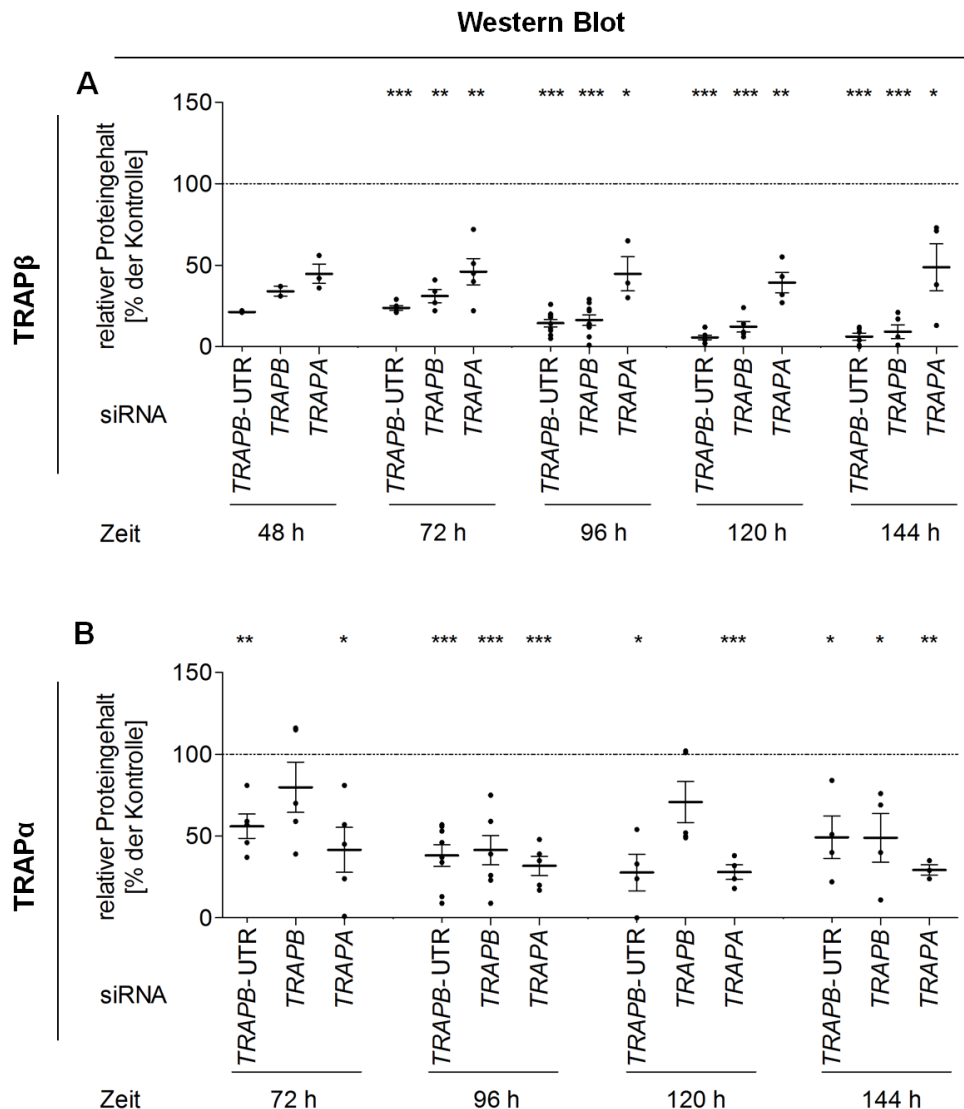
**Abbildung 36: Rettung des Phänotyps für die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach siRNA vermittelter Depletion von TRAPB.**

**A, C, E** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des Proteingehalts des jeweils gekennzeichneten Proteins nach Transfektion mit TRAPB-UTR bzw. Kontroll-siRNA sowie simultaner Expression eines Kontrollplasmids bzw. Plasmids, welches für TRAPB siRNA-resistente TRAPB-cDNA kodiert ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. In **B, D, F** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **A, C, E** dargestellt. HeLa-Zellen wurden gemäß Protokoll für 96 h mit TRAPB-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen nach 30 h entweder mit einem Plasmid transfiziert, welches für siRNA-resistente TRAPB-cDNA mit C-terminalem Myc-DDK-Tag kodiert, oder einem Kontrollplasmid. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet.

Zur Überprüfung des resultierenden Proteingehalts wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine mittels *Semidry*-Blottings auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von TRAP $\alpha$ , TRAP $\beta$  und TRAP $\gamma$  erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A – D veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licences/by/4.0/>).

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Untersuchung hinsichtlich der Korrelation zwischen relativer Restproteinmenge der Untereinheiten  $\alpha$  (B) und  $\beta$  (A) des TRAP-Komplexes und Inkubationszeit der entsprechenden siRNA im Zeitraum von 48 h bis 144 h dargestellt. Dabei wurden die Zellen mit der entsprechenden siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt. Die Quantifizierung basiert auf densitometrischer Untersuchung nach Western Blot Analyse.

Es zeigte sich, dass mit zunehmender Transfektionszeit der Zellen entweder mit *TRAPB*- oder *TRAPB*-UTR siRNA es zu einer stetigen Verringerung der Genexpression von *TRAPB* kam. Bereits nach 72 h nach Erstbehandlung der Zellen mit *TRAPB* siRNA ist auch auf Proteinebene TRAP $\beta$  mit etwa 10 % Restgehalt als hoch signifikant vermindert nachweisbar. Nach der Behandlung mit *TRAPA* siRNA war der TRAP $\beta$ -Gehalt signifikant auf etwa 50 % reduziert. Umgekehrt war der Gehalt von TRAP $\alpha$  nur nach 96-stündiger *TRAPB*- oder *TRAPA* Depletion sehr signifikant auf etwa 40 % Restproteingehalt vermindert. Ein leichter Anstieg war nach 120 h zu verzeichnen, welcher allerdings in den nächsten 24 h erneut rapide abnahm. Im Mittel führte die Manipulation der Zellen mit *TRAPA* siRNA bereits nach 72 h zu einer reduzierten, nachweisbaren Proteinmenge von TRAP $\alpha$ . Dieser Trend setzt sich im Verlauf bis zum Zeitpunkt 144 h stetig fort.

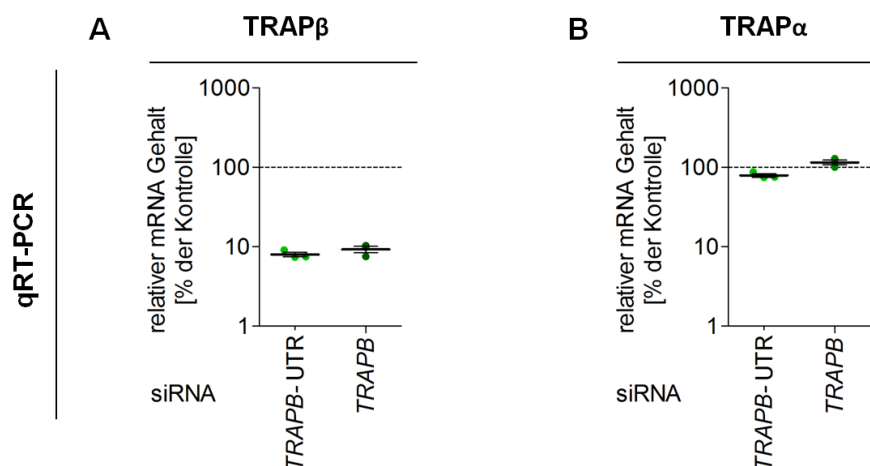


**Abbildung 37: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion (48 h – 144 h).**

Vergleichend dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwert der Proteingehalts von A TRAP $\beta$  und B TRAP $\alpha$  nach *TRAPB* Depletion mittels *TRAPB* siRNA bzw. *TRAPB*-UTR siRNA oder *TRAPB* Depletion für 48 h, 72h, 96 h, 120 h und 144 h. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen depletierenden oder Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt. Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Überprüfung des resultierenden Proteingehalts wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12\%$ ,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine mittels *Semidry*-Blottings auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von TRAP $\alpha$ , TRAP $\beta$  und TRAP $\gamma$  erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8).

Des Weiteren wurde zum einen die Effektivität der verwendeten *TRAPB* siRNAs hinsichtlich der mRNA-Degradation von *TRAPB* überprüft. Im Zuge dessen sollte zum anderen ausgeschlossen werden, dass die mRNA der  $\alpha$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes ebenfalls durch die genetische Manipulation der HeLa-Zellen mit *TRAPB* siRNA degradiert wird. Abbildung 38 zeigt das Ergebnis der qRT-PCR-Analyse der für TRAP $\beta$  (A) und TRAP $\alpha$  (B) kodierenden mRNA nach 96-stündiger Depletion von *TRAPB* mittels zwei verschiedener siRNAs (2.4.4.1) in drei biologischen und je drei technischen Replikaten. Die qRT-PCR-Untersuchung gestaltete sich wie in 2.3.2.3 beschrieben.

Es wurde nachgewiesen, dass der Gehalt der *TRAPB*-mRNA nach 96 h auf etwa 10 % reduziert wurde. Beide verwendeten siRNAs zeigten gleichwertige Funktionalitäten. Im Gegensatz dazu blieb die Menge der *TRAPA*-mRNA nahezu unverändert.



**Abbildung 38: Analyse des relativen mRNA-Gehalts der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach *TRAPB* Depletion (96 h).**

Vergleichend dargestellt ist der Gehalt an mRNA der (B)  $\alpha$ - und (A)  $\beta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes nach *TRAPB* Depletion für 96 h gemäß 2.3.2.3 quantifiziert mittels qRT-PCR. Gekennzeichnet sind sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA (n =3). Zur Bestimmung des mRNA Gehalts wurden die Proben nach 96 stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA in einer qRT-PCR weiter analysiert. Aus 5 Mio. Zellen wurde anschließend durch Anwendung des QIAmp RNA Blood Mini Kit die gesamte RNA isoliert und DNA durch Verdau mit DNaseI abgebaut, die isolierte RNA in Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop beurteilt. Im nachfolgenden Schritt wird die RNA mit Hilfe des SuperScript VILO cDNA Synthese Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt bevor auch die neu gewonnene cDNA im NanoDrop auf Konzentration und Reinheit überprüft wurde. Zur eigentlichen qRT-PCR werden je 50 ng cDNA in ein Well einer MicroAMP Fast 96 Well Reaction Plate, 10  $\mu$ L des TaqMan Gene Expression Mastermix sowie 1  $\mu$ L Expression Assay, d.h. qRT-PCR-Primerpaare für das zu quantifizierende Gen, gegeben. In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit (2.3.2.3) wurden je verwendeter cDNA, die mittels einer siRNA manipuliert wurde, die relevanten Gene in drei technischen Replikaten in einem Experiment untersucht, einzelne Experimente zu drei biologischen Replikaten wiederholt. Im StepOnePlus Real-Time PCR System von Thermo Fisher Scientific lief anschließend die qRT-PCR für ca. zwei Stunden gemäß den Bedingungen in Tabelle 15 ab. Aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der PCR-Zyklen ergab sich eine Kurve aus welcher *cycle threshold* (ct)-Werte ermittelt wurden. ACTB diente als Standard bei der Kalkulation der  $\Delta$ ct-Werte betreffend dem zu quantifizierenden Gen. Diese Werte wurden anschließend jeweils auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisiert. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Durch die Ergebnisse dieses Kapitels konnte Folgendes bestätigt werden:

- Nach der Transfektion der HeLa-Zellen mit gegen *TRAPB*-gerichteter siRNA wurde der Gehalt an *TRAPB*-mRNA drastisch reduziert, was sich resultierend negativ auf die Menge an TRAP $\beta$  auswirkte.
- Da gleichzeitig keine quantitative Beeinflussung der TRAP $\alpha$  mRNA beobachtet wurde, die Proteinmenge jedoch stark vermindert war, kann daraus gefolgert werden, dass es sich dabei um einen Sekundäreffekt der *TRAPB* siRNA auf Proteinebene handelt.
- Dieser Effekt kann durch simultane Expression von *TRAPB*-cDNA gerettet werden.
- Die kinetische Analyse des relativen Proteingehalts nach Verminderung der *TRAPB* Genexpression zeigte, dass die Transfektionsdauer von 96 h zum stärksten Effekt der Depletion der Untereinheiten des TRAP-Komplexes führt.

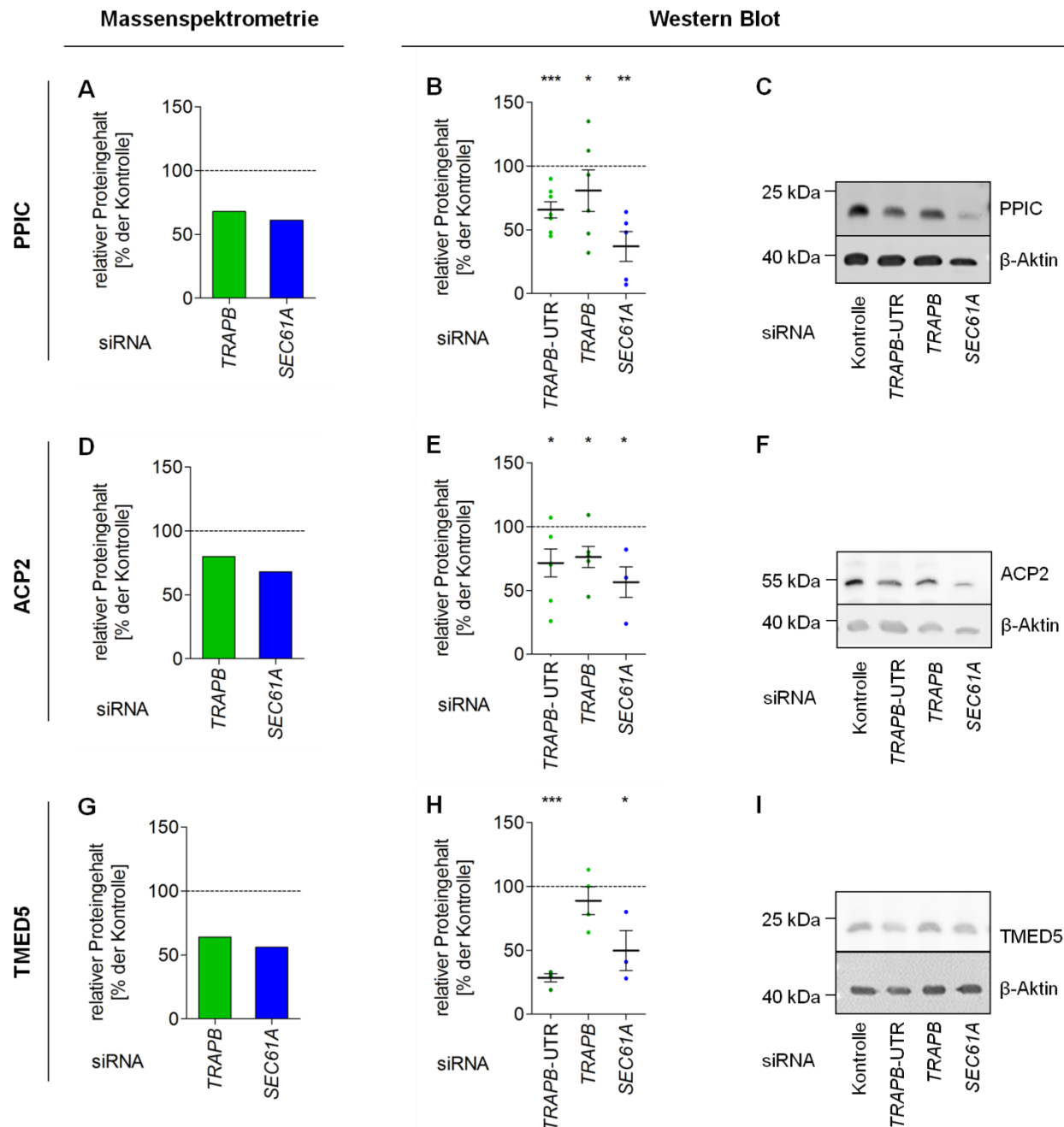
### 3.2.2. Validierung potentieller TRAP-Substrate

Innerhalb die Proteomanalyse wurden die Proteine PPIC, ACP2, TMED5 und Sel1 nach der Depletion von *TRAPB* als mit am stärksten negativ beeinflusst nachgewiesen. Als weitere Modellsubstrate wurden aufgrund des Zusammenhangs zur N-Glykosylierung drei Untereinheiten des OST-Komplexes Stt3b, Ost48 und Dad1 ausgewählt. Calreticulin und Sil1 wurden innerhalb der Proteomanalyse nur nach Behandlung mit einer der beiden verwendeten siRNAs als TRAP-Substrat vorgeschlagen. Aufgrund ihrer bereits bekannten Funktionen in der N-Glykosylierung (Calreticulin) sowie der Regulation des ATPase-Zyklus von BiP (Sil1) erfolgten auch hinsichtlich beider Proteine Validierungsexperimente.

#### 3.2.2.1. Der Gehalt von PPIC, TMED5 und ACP2 ist nach Depletion von *TRAPB* vermindert

In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zum Proteingehalt von PPIC (A, B, C), TMED5 (D, E, F) sowie ACP2 (G, H, I) nach verminderter Genexpression von *TRAPB* und *SEC61A1* dargestellt. Vergleichend gezeigt sind die Proteinlevel quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse (A, D, G) und auf Western Blot Ebene. B, E und H zeigen die Ergebnisse der Einzelerperimente sowie den Mittelwert. In C, F und I ist ein repräsentativer Blot eines Experiments dargestellt.

Der Proteingehalt aller Kandidaten innerhalb der Proteomanalyse ist sowohl nach reduzierter Genexpression von *TRAPB* (n = 3) als auch von *SEC61A1* (n = 2) um 20 – 35 % reduziert. Dieses Ergebnis konnte in den unabhängigen Depletionsexperimenten (n > 6) bestätigt werden. Die Verminderung des Proteingehalts aufgrund der siRNA vermittelten Depletion von *TRAPB* bzw. *SEC61A1* ist jeweils signifikant. Ausnahme bildet *TMED5* nach genomischer Manipulation mit *TRAPB* siRNA.



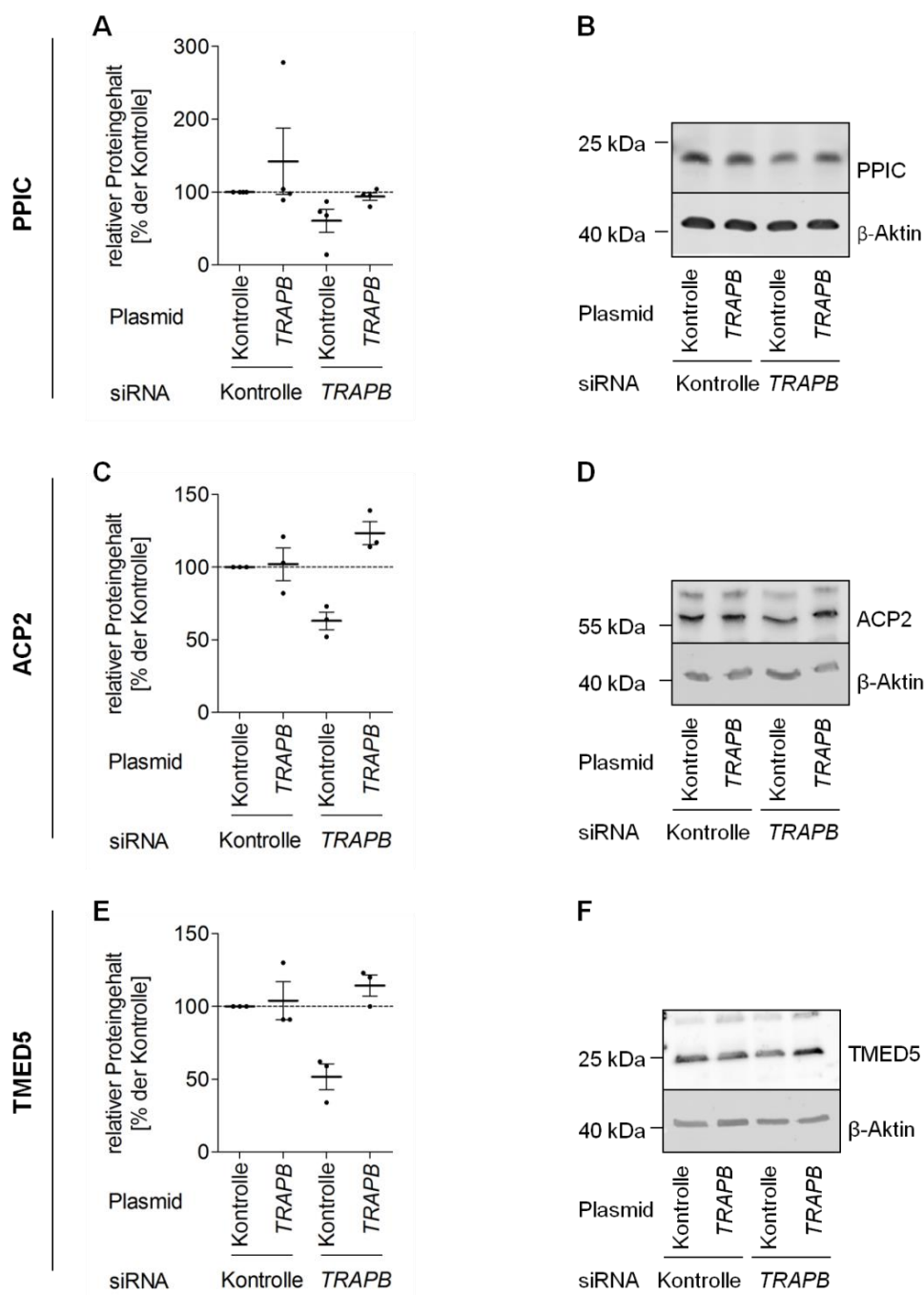
**Abbildung 39: Untersuchung des relativen Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt von PPIC, ACP2 und TMED5 nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion für 96 h gemäß 2.6 quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, D, G** zeigen die Mittelwerte des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Transfektion mit *TRAPB* siRNA (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels *TRAPB* siRNA und *TRAPB*-UTR siRNA, jeweils  $n = 3$ ) bzw. *SEC61A1* siRNA (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels *SEC61A1* siRNA und *SEC61A1*-UTR siRNA, jeweils  $n = 2$ ) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B, E, H** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA bzw. *SEC61A1* Depletion quantifiziert ( $n = 8$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8). In **C, F, I** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **B, E & H** dargestellt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts von PPIC, und ACP2 wurden die Proben nach 96-stündiger, TMED5 nach 72-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %), die Proteine über *Semidry-Blotting* (PPIC; TMED5) bzw. Tank-Blot-Verfahren (ACP2) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von PPIC, ACP2 und TMED5 erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde für PPIC ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für ACP2 und TMED5 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -PPIC in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -ACP2 und  $\alpha$ -TMED5 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anschließend wurde überprüft, ob die reduzierte Proteinmenge der potentiellen TRAP-Substrate auf die verminderten mRNA und Proteinlevel von TRAP $\beta$  zurückzuführen sind. Durch eine Komplementationsanalyse wurde dies verifiziert. Dabei erfolgte die Expression der *TRAPB*-cDNA in Anwesenheit der *TRAPB*-UTR siRNA um den Phänotyp der TRAP $\beta$ -Depletion zu retten. Durch diese simultane Transfektion konnte in Kapitel 3.2.1 gezeigt werden, dass der Proteingehalt von TRAP $\beta$  gerettet, d.h. auf Kontrollniveau angehoben, werden kann. Diese Kompensation sollte für echte TRAP-Substrate auch zur Umkehrung des Phänotyps führen, welcher nach der mRNA-Degradation von *TRAPB* nachgewiesen wurde. In Abbildung 40 ist das Ergebnis der Komplementationsanalyse für PPIC (A), ACP2 (B) und TMED5 (C) dargestellt. Als Kontrolle diente dabei jeweils die Probe, welche mit Kontroll-siRNA und einem Kontrollvektor-Plasmid transfiziert wurden. Durch Transfektion mit *TRAPB*-UTR siRNA und simultaner Expression des Kontrollplasmids wurden die Proteinlevel stark reduziert, was die Ergebnisse aus Abbildung 39 unterstreicht. Durch die gleichzeitige Depletion von *TRAPB* mittels gegen *TRAPB*-UTR gerichteter siRNA und Expression der *TRAPB*-cDNA wurde der Proteingehalt an PPIC, TMED5 und ACP2 auf mindestens 100 % wiederhergestellt.

## Western Blot



**Abbildung 40: Rettung des Phänotyps von PPIC, ACP2 und TMED5 nach siRNA vermittelter Depletion von TRAPB**

A, C, E zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des Proteingehalts des jeweils gekennzeichneten Proteins nach Behandlung mit TRAPB-UTR bzw. Kontroll-siRNA sowie simultaner Expression eines Kontrollplasmids bzw. Plasmids, welches für TRAPB siRNA-resistente TRAPB-cDNA kodiert (n = 3). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. In B, D, F ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in A, C, E dargestellt. HeLa-Zellen wurden gemäß Protokoll für 96 h mit TRAPB-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt.

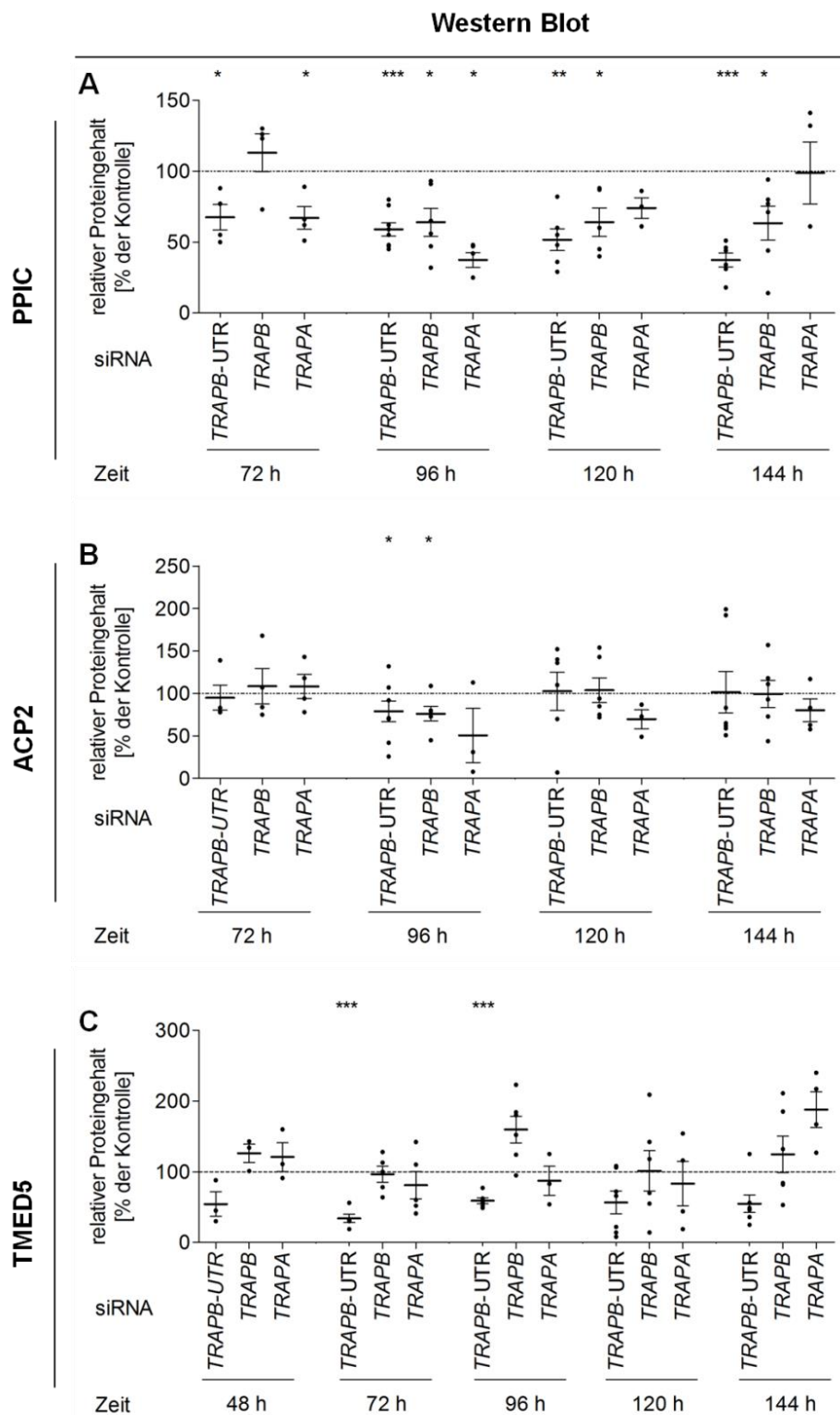
Zusätzlich wurden die Zellen nach 30 h entweder mit einem Plasmid transfiziert, welches für siRNA-resistente *TRAPB*-cDNA mit C-terminalem *Myc*-DDK-Tag kodiert, oder einem Kontrollplasmid. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (PPIC, TMED5) bzw. Tank-Blot-Verfahren (ACP2) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von PPIC, ACP2 und TMED5 erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärintikörper wurde für PPIC ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für ACP2 und TMED5 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärintikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -PPIC in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -ACP2 und  $\alpha$ -TMED5 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Des Weiteren wurde der Gehalt der Proteine PPIC, TMED5 und ACP2 in Abhängigkeit siRNA vermittelter *TRAPB* bzw. *TRAPA* Depletion im Zeitraum von 72 h – 144 h auf Western Blot Ebene untersucht. Die Ergebnisse dieser kinetischen Analyse sind in Abbildung 41 abgebildet.

Bereits nach 72 h zeigte sich der Gehalt von PPIC (A) nach Transfektion mit *TRAPB*-UTR bzw. *TRAPA* siRNA signifikant vermindert. Diese Reduktion verstärkte sich in den folgenden 24 h. Während sich dieser Trend für die genetische Manipulation der Zellen mit *TRAPB*-UTR siRNA bis 144 h fortsetzte, stieg der PPIC Gehalt nach Behandlung mit *TRAPA* siRNA nach 120 h sukzessive an. Nach Transfektion der Zellen mit *TRAPB* siRNA reduzierte sich der Gehalt an PPIC nach 96 h signifikant und zeigte auch in den kommenden 48 h keine weitere Änderung des Proteingehalts.

Bei der Betrachtung des Proteingehalts von ACP2 (B) wird deutlich, dass eine signifikante Verminderung nur nach 96-stündiger Depletion mittels *TRAPB*- oder *TRAPB*-UTR siRNA erreicht wurde. Die Verringerung der Genexpression von *TRAPA* führt zwischen 96 h und 144 h zur Reduktion des ACP2-Gehalts, jedoch nicht statistisch signifikant.

Bereits nach 48 h führte die Behandlung der HeLa-Zellen mit *TRAPB*-UTR siRNA zu einer Halbierung des ursprünglichen TMED5-Gehalts (C). Nach 72 h sowie 96 h war die Reduktion statistisch hoch signifikant. Die Depletion von *TRAPA* führt nach 72 h und 96 h zu einer minimalen Verminderung von des Proteingehalts von TMED5, nach 144 h zu einem erneuten Anstieg. Gleichmaßen war eine Zunahme des TMED5-Gehalts nach 96-stündiger Transfektion mit *TRAPB* siRNA zu verzeichnen, welcher zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten jedoch unverändert zur Kontrolle blieb.

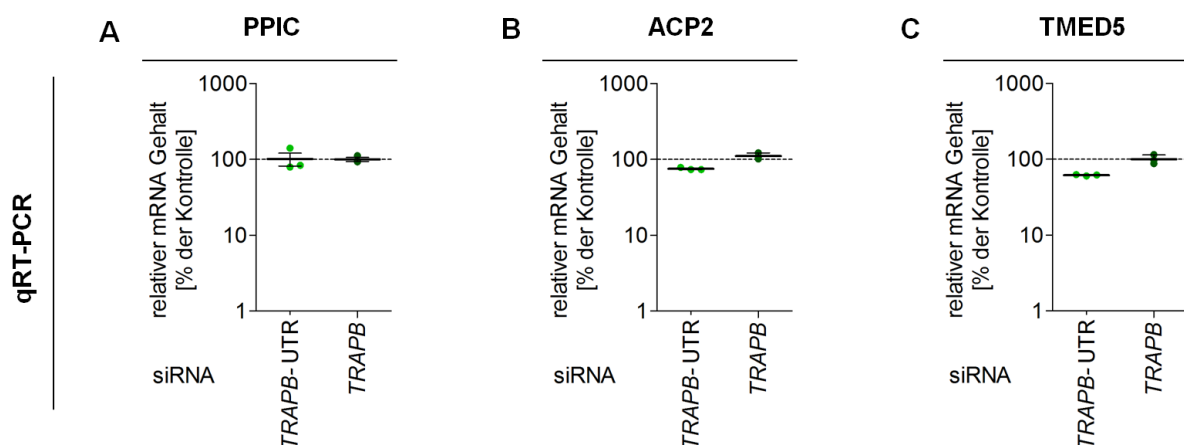


**Abbildung 41: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 nach Depletion von TRAPB (48 h – 144 h)**

Vergleichend dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwert der Proteingehalts von **A** PPIC, **B** ACP2 und **C** TMED5 nach TRAPB Depletion mittels TRAPB siRNA bzw. TRAPB-UTR siRNA oder TRAPB Depletion für 48 h, 72h, 96 h, 120 h und 144 h. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen depletierenden oder Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt.

Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (PPIC; TMED5) bzw. Tank-Blot-Verfahren (ACP2) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von PPIC, ACP2 und TMED5 erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde für PPIC ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für ACP2 und TMED5 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -PPIC in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -ACP2 und  $\alpha$ -TMED5 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8).

Zur finalen Validierung der potentiellen TRAP-Substrate PPIC, ACP2 und TMED5 als echte TRAP-Substrate wurde der Gehalt der jeweiligen mRNA mittels qRT-PCR untersucht. Dies diente dem Ausschluss, dass die verwendeten siRNAs, die zur Degradation des TRAP-Komplexes führen, keine direkte Beeinflussung potentieller TRAP-Substrate auf mRNA-Ebene mit sich bringen. In drei unabhängigen Experimenten wurden HeLa-Zellen mit *TRAPB* bzw. *TRAPB*-UTR siRNA für 96 h behandelt.



**Abbildung 42: Analyse des relativen mRNA-Gehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 nach *TRAPB* Depletion (96 h)**  
Vergleichend dargestellt ist der Gehalt an mRNA der (A) PPIC, (B) ACP2 und (C) TMED5 nach *TRAPB* Depletion für 96 h gemäß 2.3.2.3 quantifiziert mittels qRT-PCR. Gekennzeichnet sind sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA (n =3) Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zur Bestimmung des mRNA Gehalts wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA in einer qRT-PCR weiter analysiert. Aus 5 Mio Zellen wurde anschließend durch Anwendung des QIAmp RNA Blood Mini Kit die gesamte RNA isoliert und DNA durch Verdau mit DNaseI abgebaut, die isolierte RNA in Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop beurteilt. RNA wurde mit Hilfe des SuperScript VIL0 cDNA Synthese Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt bevor auch die neu gewonnene cDNA im NanoDrop auf Konzentration und Reinheit überprüft wurde. 50 ng cDNA in ein Well einer MicroAMP Fast 96 Well Reaction Plate, 10  $\mu$ L des TaqMan Gene Expression Mastermix sowie 1  $\mu$ L Expression Assay, d.h. qRT-PCR-Primerpaare für das zu quantifizierende Gen, gegeben. In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit (2.3.2.3) wurden je verwendeter cDNA, die mittels einer siRNA manipuliert wurde, die relevanten Gene in drei technischen Replikaten in einem Experiment untersucht, einzelne Experimente zu drei biologischen Replikaten wiederholt.



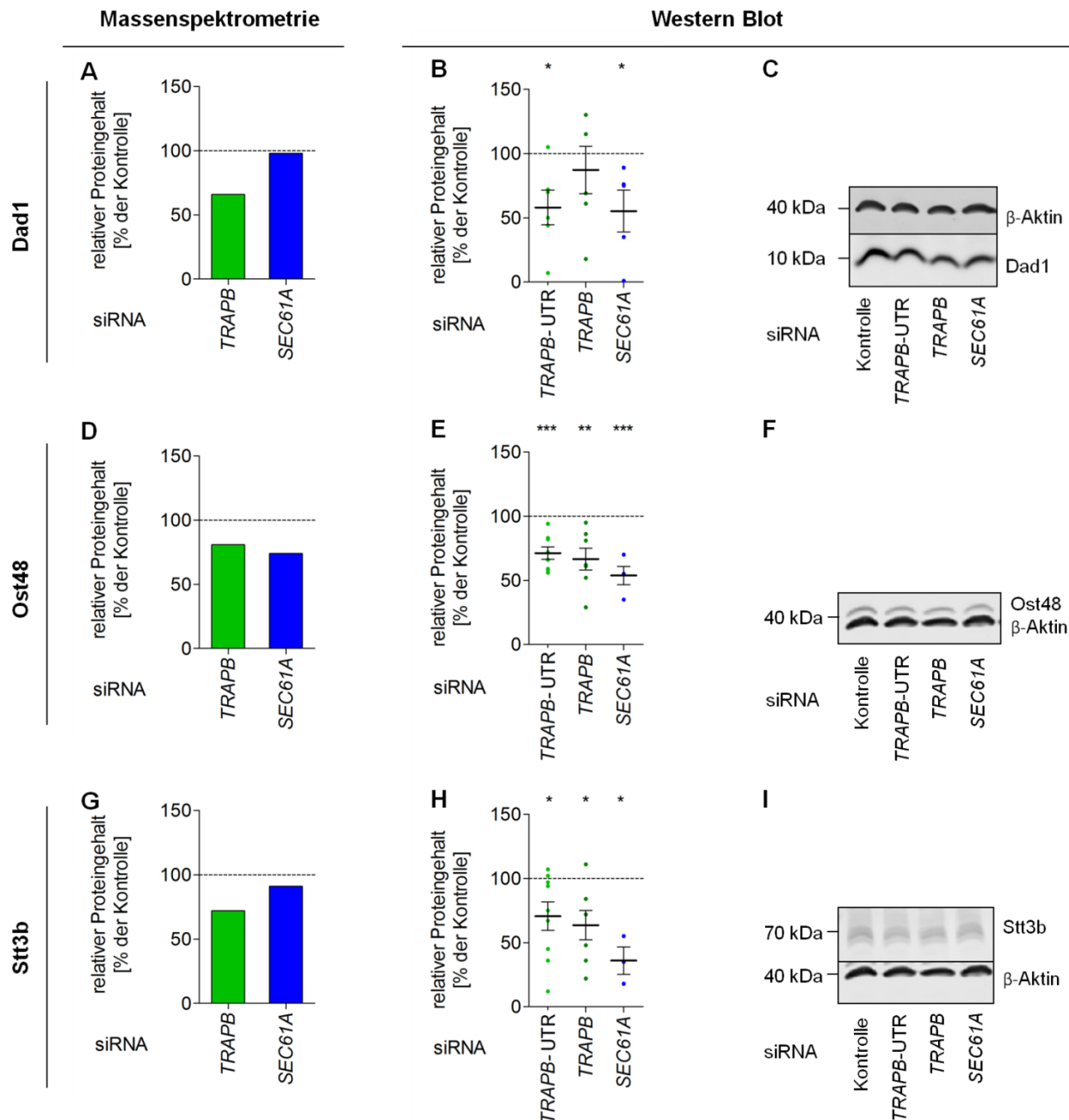
Im StepOnePlus Real-Time PCR System von Thermo Fisher Scientific lief anschließend die qRT-PCR für ca. zwei Stunden gemäß den Bedingungen in Tabelle 15 ab. Aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der PCR-Zyklen ergab sich eine Kurve aus welcher cycle threshold (ct)-Werte ermittelt wurden. ACTB diente als Standard bei der Kalkulation der  $\Delta$ ct-Werte betreffend dem zu quantifizierenden Gen. Diese Werte wurden anschließend jeweils auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisiert. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

In Kapitel 3.2.1 wurde gezeigt, dass die Transfektion mit *TRAPB* oder *TRAPB*-UTR siRNA zur Reduktion des *TRAPB* mRNA-Gehalts auf ca. 10 % führt. Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR nach *TRAPB* Depletion spezifisch für den mRNA-Gehalt von PPIC (A), ACP2 (B) und TMED5 (C). Diese zeigen keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle (100 %).

Die in Kapitel 3.2.2.1 erläuterten Ergebnisse wurden somit als Folge effizienten Reduktion der Genexpression von *TRAPB* mittels RNAi verifiziert und Primäreffekte auf die mRNA der potentiellen TRAP-Substrate werden ausgeschlossen.

### **3.2.2.2. Der Gehalt der OST-Komplex Untereinheiten Ost48, Stt3b und Dad1 ist nach der Depletion von *TRAPB* vermindert**

Als weitere zu validierende TRAP-Kandidaten wurden drei Untereinheiten des OST-Komplexes ausgewählt: Dad1, Ost48 und Stt3b. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse zur Untersuchung des Proteingehalts der drei OST-Untereinheiten gezeigt, nach Depletion von *TRAPB* oder *SEC61A1* auf Basis von massenspektrometrischer oder Western Blot Analyse. Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte die Verminderung des Proteingehalts in Quantität nach *TRAPB* Depletion. Nach reduzierter Genexpression von *SEC61A1* war die signifikant quantitative Reduktion der drei OST-Komplex-Untereinheiten mittels Western Blot nachweisbar und fiel somit wesentlich deutlicher als nach der massenspektrometrischen Quantifizierung aus. Für alle drei untersuchten potentiell TRAP-abhängigen Kandidaten Dad1, Ost48 und Stt3b konnten die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse mittels Western Blot nach *TRAPB* Depletion bestätigt werden. Vor allem die genetische Manipulation der HeLa-Zellen mit der *TRAPB*-UTR siRNA resultierte in einer signifikanten Reduktion des Proteingehalts nach 96 h.



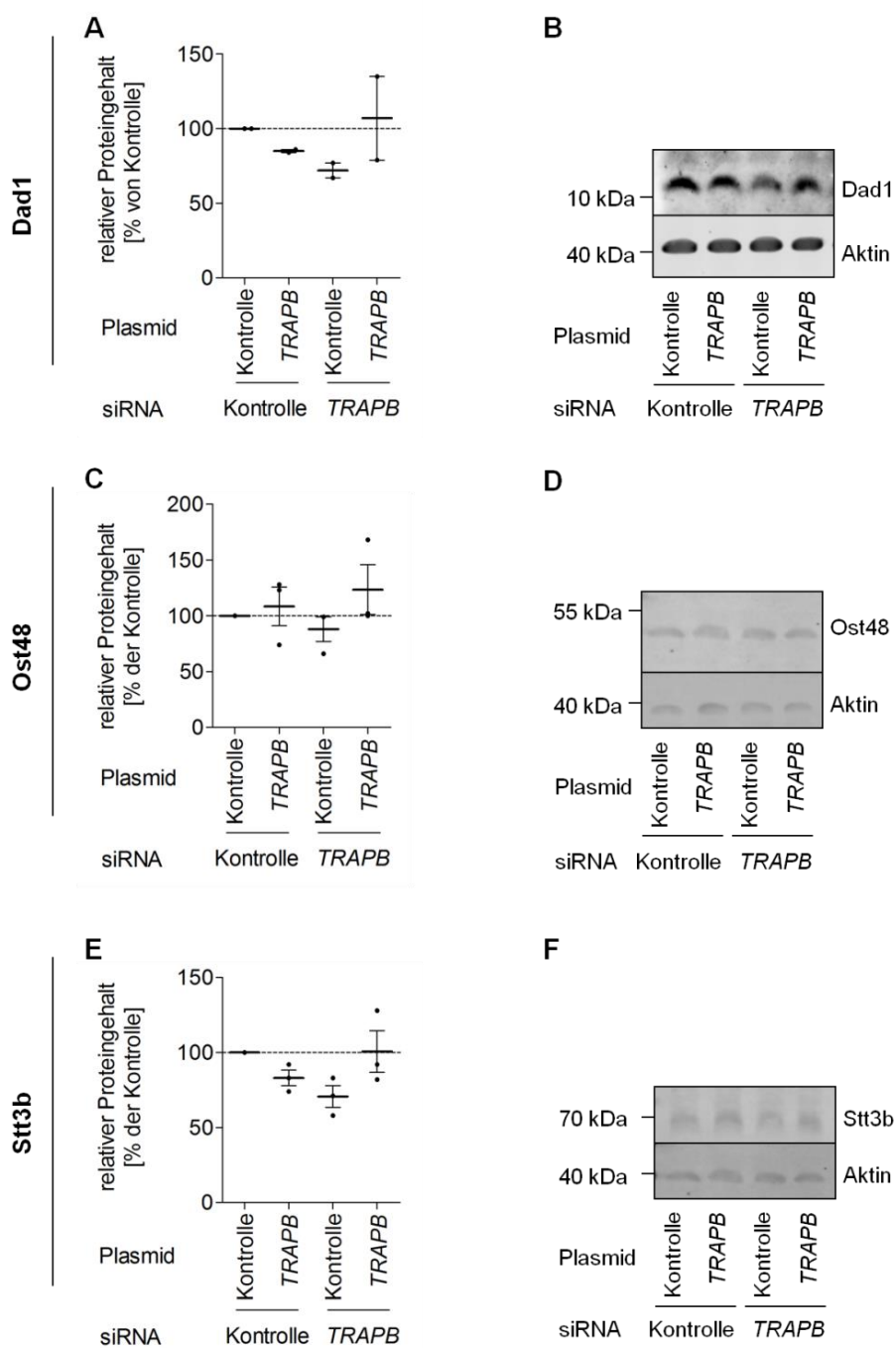
**Abbildung 43: Untersuchung des relativen Proteingehalts der OST-Komplex-Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der OST-Komplex-Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion für 96 h gemäß 2.6 quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, D, G** zeigen die Mittelwerte des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach TRAPB Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels TRAPB siRNA und TRAPB-UTR siRNA, jeweils  $n = 3$ ) bzw. SEC61A1 Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels SEC61A1 siRNA und SEC61A1-UTR siRNA, jeweils  $n = 2$ ) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B, E, H** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von TRAPB mittels TRAPB siRNA, TRAPB-UTR siRNA bzw. SEC61A1 Depletion quantifiziert ( $n = 5$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8). In **C, F, I** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **B, E & H** dargestellt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Dad1, Ost48 und Stt3b wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Dad1 17,5 %, Ost48 und Stt3b 12,5 %,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (Dad1) bzw. Tank-Blot-Verfahren (Ost48, Stt3b) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von Dad1 und Stt3b erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, der Nachweis von Ost48 erfolgte über einen passenden Antikörper aus der Maus. Als Sekundärantikörper wurde für Stt3b ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für Dad1 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Letzterer wurde auch als sekundärer Antikörper zur Detektion von Ost48 genutzt. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Ost48 und  $\alpha$ -Stt3b in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -Dad1 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anschließend wurde überprüft, ob die reduzierte Proteinmenge der potentiellen TRAP-Substrate auf die verminderten mRNA und Proteinlevel von TRAP $\beta$  zurückzuführen sind. Durch eine Komplementationsanalyse wurde dies verifiziert. Dazu erfolgte die Depletion von *TRAPB* mittels UTR siRNA und gleichzeitig die Expression einer siRNA-resistenten *TRAPB*-cDNA. Diese Kompensation sollte für echte TRAP-Substrate auch zur Rettung des Phänotyps der TRAP $\beta$ -Depletion führen. In Abbildung 44 ist das Ergebnis der Komplementationsanalyse für Dad1 (A), Ost48 (B) und Stt3b (C) dargestellt. Als Kontrolle dient dabei jeweils die Probe, welche mit Kontroll-siRNA und einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Durch Transfektion mit *TRAPB*-UTR siRNA und simultaner Expression des Kontrollvektor-Plasmids wurden die Proteinlevel stark reduziert, was die Ergebnisse aus Abbildung 43 unterstreicht. Durch die gleichzeitige Depletion von *TRAPB* mittels gegen *TRAPB*-UTR gerichteter siRNA und Expression der *TRAPB*-cDNA wurde der Proteingehalt an Dad1, Ost48 und Stt3b auf mindestens 100 % wiederhergestellt.

## Western Blot



**Abbildung 44: Rettung des Phänotyps für die Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b des OST-Komplexes nach Depletion von TRAPB (96 h).**

**A, C, E** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des Proteingehalts des jeweils gekennzeichneten Proteins nach Behandlung mit TRAPB-UTR bzw. Kontroll-siRNA sowie simultaner Expression eines Kontrollplasmids bzw. Plasmids, welches für TRAPB siRNA-resistente TRAPB-cDNA kodiert ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. In **B, D, F** ist ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **A, C, E** dargestellt. HeLa-Zellen wurden gemäß Protokoll für 96 h mit TRAPB-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt.

Zusätzlich wurden die Zellen nach 30 h entweder mit einem Plasmid transfiziert, welches für siRNA-resistente *TRAPB*-cDNA mit C-terminalem *Myc-DDK*-Tag kodiert, oder einem Kontrollplasmid. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Dad1, Ost48 und Stt3b wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Dad1 17,5 %, Ost48 und Stt3b 12,5 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (Dad1) bzw. Tank-Blot-Verfahren (Ost48, Stt3b) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von Dad1 und Stt3b erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, der Nachweis von Ost48 erfolgte über einen passenden Antikörper aus der Maus. Als Sekundärantikörper wurde für Stt3b ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für Dad1 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Letzterer wurde auch als sekundärer Antikörper zur Detektion von Ost48 genutzt. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Ost48 und  $\alpha$ -Stt3b in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -Dad1 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

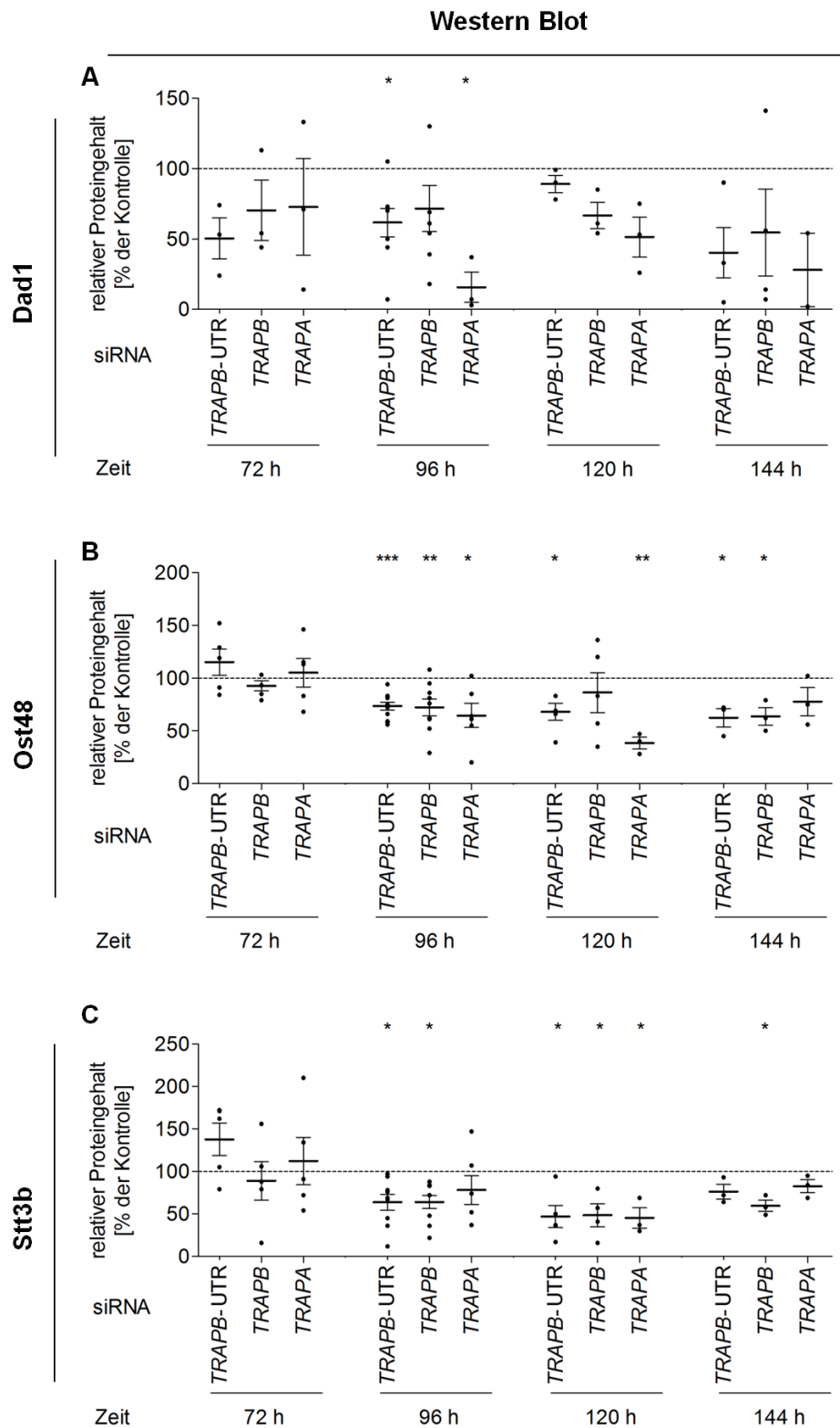
Zusätzlich wurde der Gehalt der Proteine Dad1, Ost48 und Stt3b in Abhängigkeit siRNA vermittelter Reduktion der Genexpression von *TRAPB* bzw. *TRAPA* mittels RNAi im Zeitraum von 72 h – 144 h auf Western Blot Ebene untersucht. Die Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse sind dazu in Abbildung 45 abgebildet.

Bereits nach 72 h war die Verminderung des relativen Dad1-Gehalts (A) nach Behandlung mit *TRAPB* bzw. *TRAPA* siRNA reduziert. Es signifikante Reduktion war 24 h später nach Manipulation mit *TRAPB*-UTR oder *TRAPA* siRNA nachweisbar. Durch die erneute Transfektion mit siRNA nach 96 h blieb die Menge an Dad1 weiterhin vermindert, wenn auch nicht statistisch signifikant.

Bei der Betrachtung des Proteingehalts von Ost48 (B) wird deutlich, dass eine Reduktion des entsprechenden Proteingehalts nach Depletion einer TRAP-Untereinheit erst nach 96 h zu verzeichnen war. Dieser Effekt war statistisch signifikant nach Einsatz der *TRAPA* siRNA, hoch signifikant für *TRAPB*-UTR siRNA.

Während Ost48 nach 120-stündiger Depletion von *TRAPA* auf etwa 40 % weiter reduziert wurde, blieb der Level durch die Transfektion mit einer der beiden *TRAPB* siRNAs gleichwertig bis zum Zeitpunkt 144 h.

Eine signifikante Reduktion von Stt3b (C) war ebenfalls erst nach 96 h Depletion von *TRAPB* nachweisbar. Nach 120 h halbierte sich die Menge an Stt3b im Vergleich zur Kontrolle signifikant, sowohl für *TRAPB*- als auch *TRAPA* Depletion. Nach weiteren 24 h war ein wiederkehrender Anstieg des Gehalts an Stt3b zu verzeichnen, blieb im Mittel jedoch weiterhin reduziert.



**Abbildung 45: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b des OST-Komplexes nach Depletion von TRAPB (72 h – 144 h).**

Vergleichend dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwert der relativen Proteingehalts von **A** Dad1, **B** Ost48 und **C** Stt3b nach TRAPB Depletion mittels TRAPB siRNA bzw. TRAPB-UTR siRNA oder TRAPB Depletion für 72 h, 96 h, 120 h und 144 h.

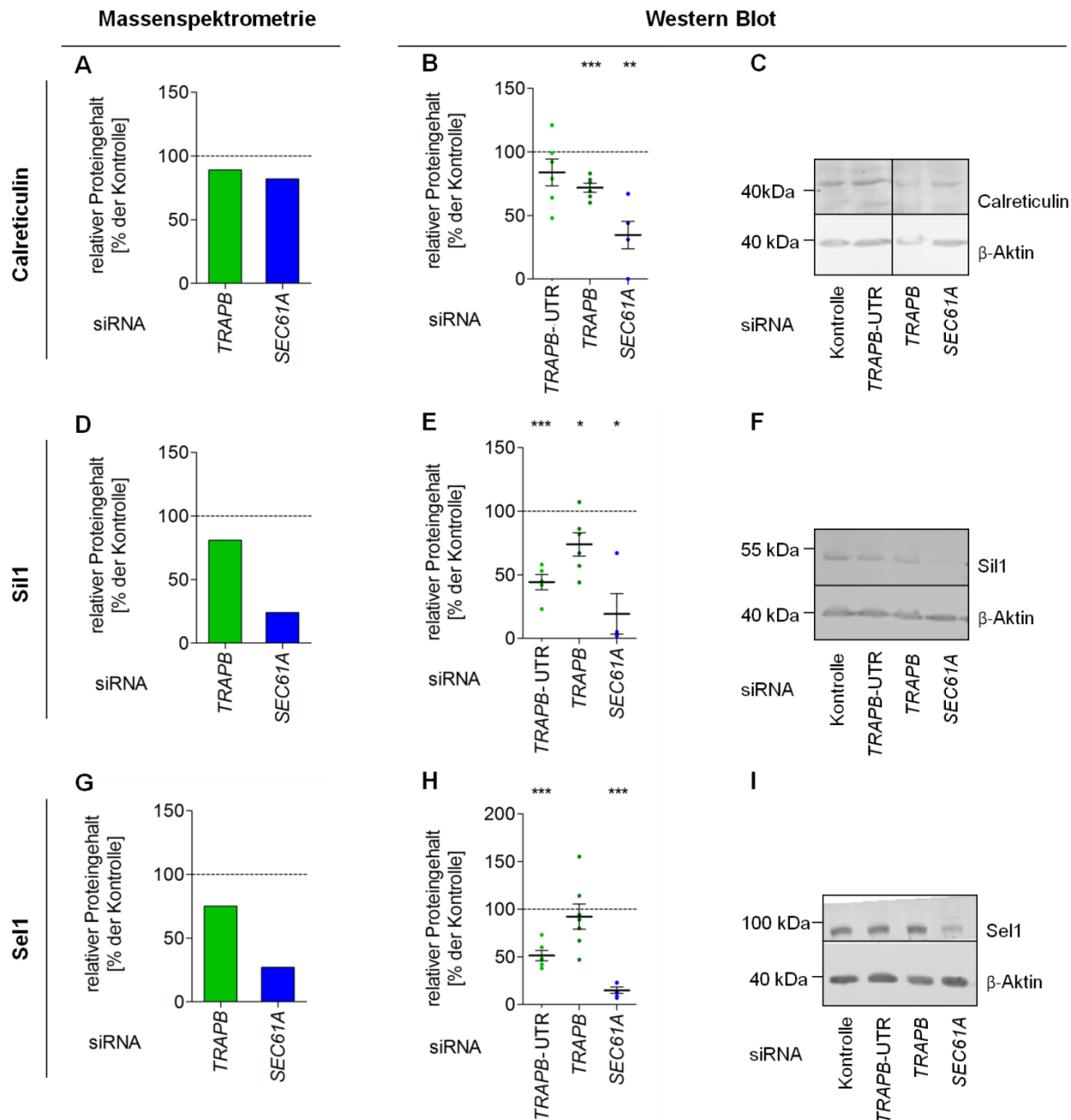
Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen depletierenden oder Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt. Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Dad1, Ost48 und Stt3b wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Dad1 17,5 %, Ost48 und Stt3b 12,5 %,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (Dad1) bzw. Tank-Blot-Verfahren (Ost48, Stt3b) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von Dad1 und Stt3b erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, der Nachweis von Ost48 erfolgte über einen passenden Antikörper aus der Maus. Als Sekundärantikörper wurde für Stt3b ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für Dad1 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Letzterer wurde auch als sekundärer Antikörper zur Detektion von Ost48 genutzt. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Ost48 und  $\alpha$ -Stt3b in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -Dad1 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8).

Die Untereinheiten des OST-Komplexes wurden nach Depletion des TRAP-Komplexes massenspektrometrisch und mittels Western Blot quantitativ untersucht. Durch diese unabhängigen Experimente sowie der Komplementationsanalyse konnten die Proteine Dad1, Ost48 und Stt3b als TRAP-abhängige Substrate identifiziert werden.

### 3.2.2.3. Der Gehalt von Calreticulin, Sil1 und Sel1 ist nach Depletion von *TRAPB* vermindert

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse nach *TRAPB*- und *SEC61A1* Depletion für die ER-luminalen Proteine Calreticulin (A), Sil1 (D) und Sel1 (G) abgebildet. Sil1 wurde aufgrund der Proteomanalyse als potentieller TRAP-abhängiger Kandidat identifiziert. Calreticulin und Sil1 wurden im Zuge dessen nur nach genetischer Manipulation mit einer der beiden verwendeten siRNAs zur Depletion von *TRAPB* als potentielles TRAP-Substrat vorgeschlagen.

Die negative Beeinflussung des relativen Proteingehalts nach der reduzierten Genexpression von *TRAPB* konnte auf Western Blot Ebene für die drei untersuchten Modellsubstrate Calreticulin (B, C), Sil1 (E, F) und Sel1 (H, I) mit mindestens einer der verwendeten siRNAs hoch signifikant nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die quantitative Verminderung der Proteinmenge aufgrund der Depletion von *SEC61A1*. Diese ist für Sil1 signifikant, Calreticulin sehr signifikant und Sel1 hoch signifikant nachweisbar. Für alle drei untersuchten potentiell TRAP-abhängigen Kandidaten Dad1, Ost48 und Stt3b konnten die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse mittels Western Blot nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion bestätigt werden.



**Abbildung 46: Untersuchung des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Calreticulin, Si11 und Sel1 nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion.**

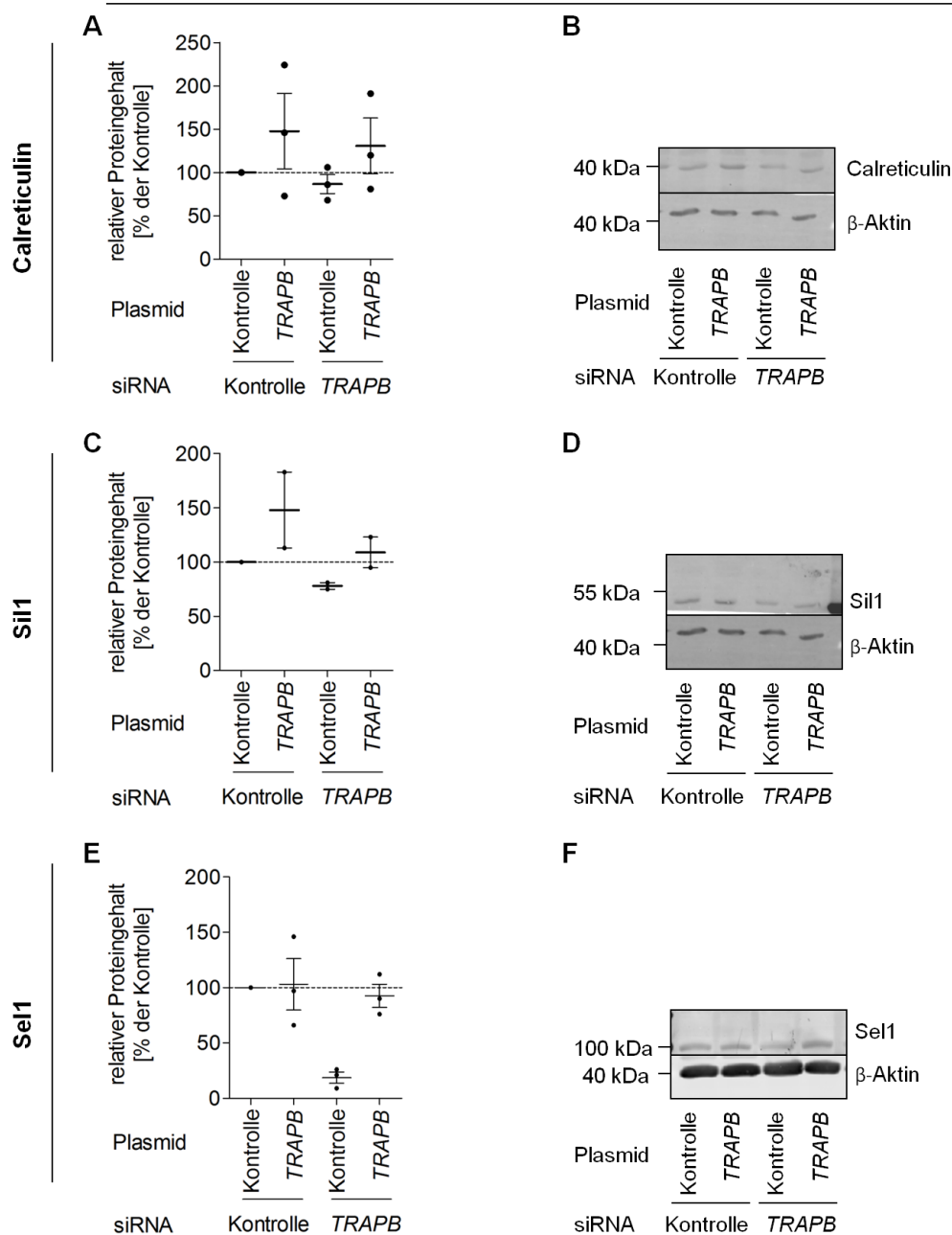
Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der ER-luminalen Proteine Calreticulin, Si11 und Sel1 nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion für 96 h gemäß 2.6 quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, D, G** zeigen die Mittelwerte des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach TRAPB Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation der HeLa-Zellen mittels TRAPB siRNA und TRAPB-UTR siRNA, jeweils  $n = 3$ ) bzw. SEC61A1 Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation der HeLa-Zellen mittels SEC61A1 siRNA und SEC61A1-UTR siRNA, für Sel1  $n = 2$ , für Calreticulin und Si11  $n = 1$ ) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B, E, H** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von TRAPB mittels TRAPB siRNA, TRAPB-UTR siRNA bzw. SEC61A1 Depletion quantifiziert ( $n = 8$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8). In **C, F, I** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **B, E & H** dargestellt.



Zur Bestimmung des Proteingehalts von Calreticulin, Sil1 und Sel1 wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12,5 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A – F veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Anschließend wurde überprüft, ob die reduzierte Proteinmenge der potentiellen TRAP-Substrate auf die verminderten mRNA und Proteinlevel von TRAP $\beta$  zurückzuführen sind. Durch eine Komplementationsanalyse wurde dies verifiziert. Dazu erfolgte die Expression der *TRAPB*-cDNA in Anwesenheit der *TRAPB*-UTR siRNA zur Rettung des Phänotyps nach TRAP $\beta$ -Depletion. Die Ergebnisse dieser Experimente sind Abbildung 47 für Calreticulin (A), Sil1 (B) sowie Sel1 (C) zu entnehmen. Als Kontrolle dient dabei jeweils die Probe, welche mit Kontroll-siRNA und einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Durch Transfektion mit *TRAPB*-UTR siRNA und simultaner Expression des Kontrollvektor-Plasmids wurden die Proteinlevel stark reduziert, was die Ergebnisse aus Abbildung 43 unterstreicht. Durch die gleichzeitige Depletion von *TRAPB* mittels gegen *TRAPB*-UTR gerichteter siRNA und Expression der *TRAPB*-cDNA wird der Gehalt an Calreticulin, Sil1 und Sel1 auf mindestens 100 % wiederhergestellt.

## Western Blot

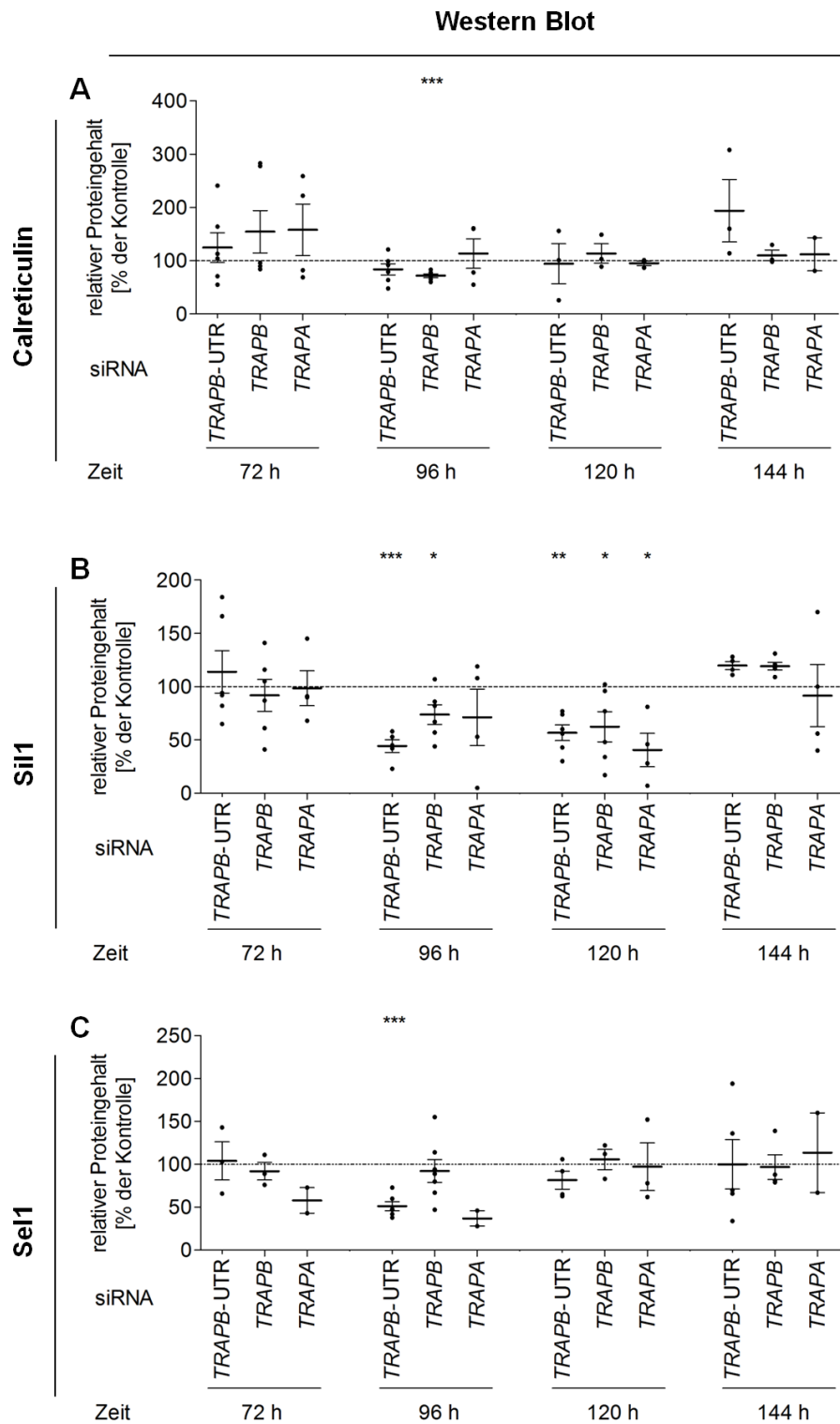


**Abbildung 47: Rettung des Phänotyps für die ER-luminalen Proteine Calreticulin, Sil1 und Sel1 nach Depletion von TRAPB (96 h).**

**A, C, E** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des Proteingehalts des jeweils gekennzeichneten Proteins nach Behandlung mit TRAPB-UTR bzw. Kontroll-siRNA sowie simultaner Expression eines Kontrollplasmids bzw. Plasmids, welches für TRAPB siRNA-resistente TRAPB-cDNA kodiert ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. In **B, D, F** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **A, C, E** dargestellt. HeLa-Zellen wurden gemäß Protokoll für 96 h mit TRAPB-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen nach 30 h entweder mit einem Plasmid transfiziert, welches für siRNA-resistente TRAPB-cDNA mit C-terminalem Myc-DDK-Tag kodiert, oder einem Kontrollplasmid. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Calreticulin, Sil1 und Sel1 wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12,5 %), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran

immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundäntikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primäntikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A – D veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licences/by/4.0/>).

Des Weiteren wurde der Gehalt der Proteine Calreticulin, Sil1 und Sel1 in Abhängigkeit siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* bzw. *TRAPA* im Zeitraum von 72 h – 144 h auf Western Blot Ebene untersucht. Die Ergebnisse dieser kinetischen Analyse sind in Abbildung 48 dargestellt. Für Calreticulin (A) und Sel1 (C) hatte die Behandlung mit einer *TRAPB* siRNA nur nach 96 h eine hoch signifikante Verminderung des Proteingehalts zu Folge. Ein erneuter Anstieg des jeweiligen Proteingehalts erfolgte bereits 24 h später. Die Depletion der  $\alpha$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes führte für Sel1 zu einer Reduktion des Proteingehalts nach 72 h und 96 h, in Bezug auf Calreticulin konnten keine Veränderungen auf Proteinebene nach entsprechender genetischer Manipulation mit *TRAPA* siRNA beobachtet werden. Zu keinem anderen Zeitpunkt erfolgte auf Western Blot Ebene für beide Proteine der Nachweis einer signifikanten Veränderung des relativen Proteingehalts. Sil1 (B) zeigte sich sowohl nach 96 h als auch nach 120 h signifikant vermindert nach reduzierter Genexpression von *TRAPB*.



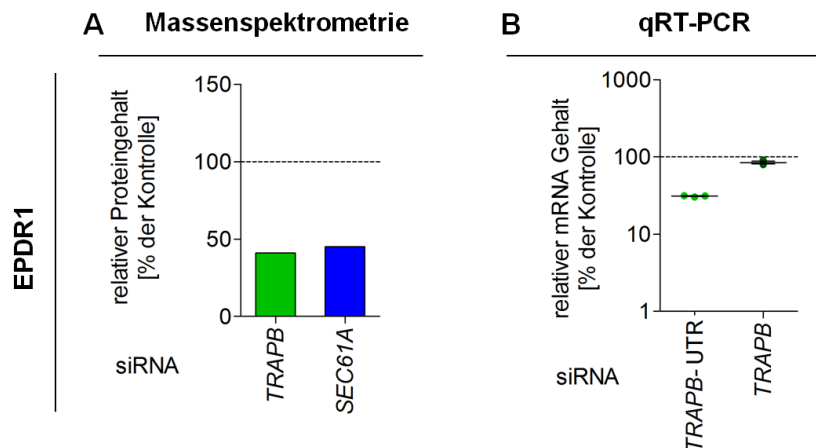
**Abbildung 48: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Calreticulin, Sil1 und Sel1 nach Depletion von TRAPB**

Vergleichend dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwert der Proteingehalts von **A** Calreticulin, **B** Sil1 und **C** Sel1 nach *TRAPB* Depletion mittels *TRAPB* siRNA bzw. *TRAPB*-UTR siRNA oder *TRAPB* Depletion für 72 h, 96 h, 120 h und 144 h. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen depletierenden oder Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt.

Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Calreticulin, Sil1 und Sel1 wurden die Proben nach Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12,5 %,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8).

#### **3.2.2.4. Der Gehalt von EPDR1 ist nach Depletion von *TRAPB* vermindert**

Das Protein EPDR1 wurde innerhalb der Proteomanalyse nach siRNA basierter Manipulation zur reduzierten Genexpression von *TRAPB* und *SEC61A1* als mit am stärksten quantitativ erniedrigt nachgewiesen (Abbildung 49 A). Im Zuge unabhängiger Depletionsexperimente gemäß 2.4.4.1 konnte jedoch der Proteingehalt von EPDR1 mittels Western Blot nach genetischer Zellmanipulation mit *TRAPB*- und *SEC61A1* siRNA auf endogener Ebene nicht validiert werden. Es wurden zur Detektion von EPDR1 im Western Blot verschiedene Antikörper und Bedingungen getestet, allerdings war es nicht reproduzierbar möglich endogenes oder überexprimiertes EPDR1 nachzuweisen. Dementsprechend muss an dieser Stelle auf die Validierung von endogenem EPDR1 als TRAP-Substrat verzichtet werden. Mittels qRT-PCR wurde der relative mRNA-Gehalt von *EPDR1* nach verminderter Expression von *TRAPB* durch zwei verschiedene siRNAs überprüft (B). Es stellte sich heraus, dass die Manipulation der Zellen mit *TRAPB*-UTR siRNA auch eine leichte Verminderung der *EPDR1* mRNA hervorrief. Der Einsatz der *TRAPB* siRNA führte im Gegensatz dazu zu keiner Änderung des mRNA-Gehalts.



**Abbildung 49: Analyse des relativen Protein- und mRNA-Gehalts von EPDR1 nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion**

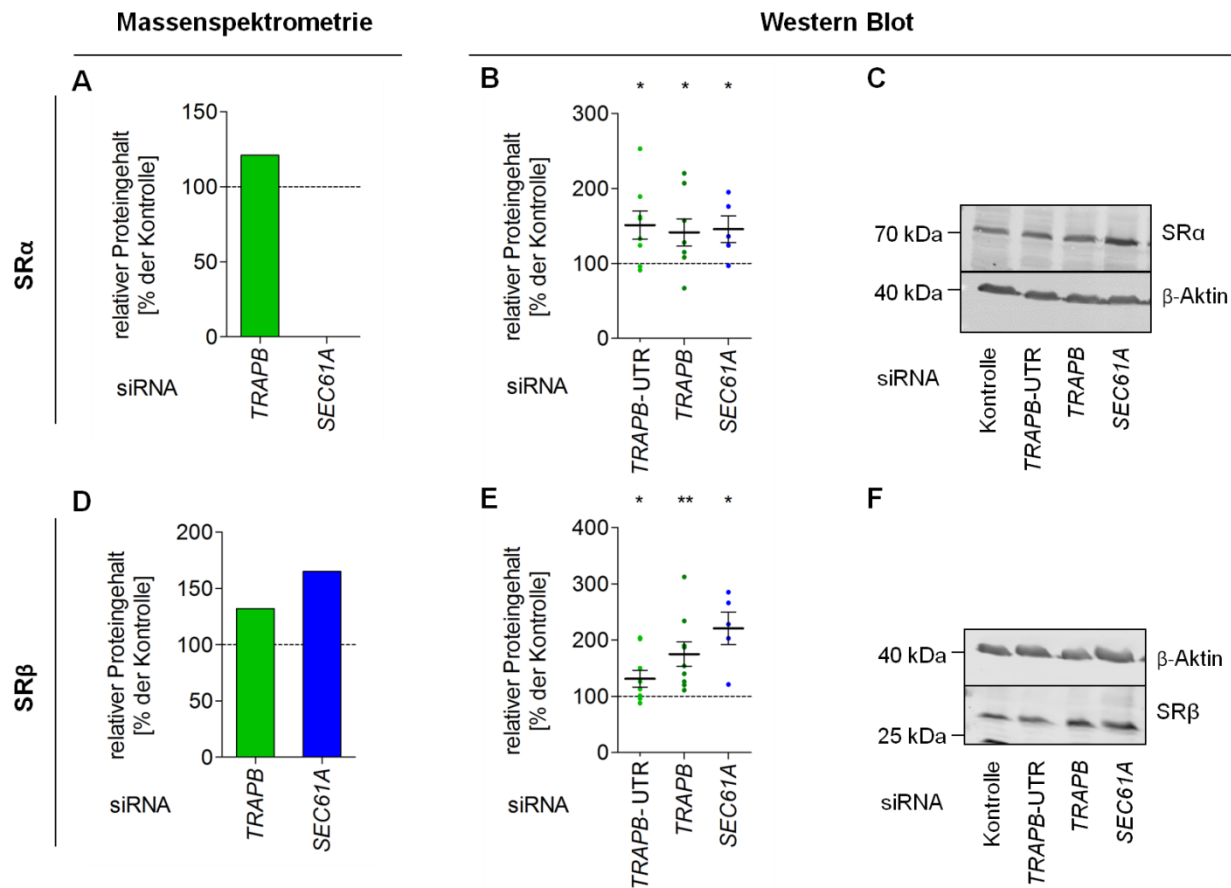
Vergleichend dargestellt ist **(A)** der Proteingehalt EPDR1 quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse sowie des Gehalts an **(B)** mRNA quantifiziert mittel qRT-PCR nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion für 96 h gemäß 2.4.4.1. **A** zeigt die Mittelwerte des Proteingehalts von EPDR1 nach *TRAPB* Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels *TRAPB* siRNA und *TRAPB*-UTR siRNA, jeweils  $n = 3$ ) bzw. *SEC61A1* Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels *SEC61A1* siRNA und *SEC61A1*-UTR siRNA, jeweils  $n = 2$ ) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B** kennzeichnet sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert mRNA-Gehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zur Bestimmung des mRNA Gehalts wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA in einer qRT-PCR weiter analysiert. Aus 5 Mio Zellen wurde durch Anwendung des QIAmp RNA Blood Mini Kit die gesamte RNA isoliert und DNA durch Verdau mit DNaseI abgebaut, die isolierte RNA in Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop beurteilt. Im nachfolgenden Schritt wird die RNA mit Hilfe des SuperScript VILO cDNA Synthese Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt bevor auch die neu gewonnene cDNA im NanoDrop auf Konzentration und Reinheit überprüft wurde. Zur eigentlichen qRT-PCR werden je 50 ng cDNA in ein Well einer MicroAMP Fast 96 Well Reaction Plate, 10  $\mu$ L des TaqMan Gene Expression Mastermix sowie 1  $\mu$ L Expression Assay, d.h. qRT-PCR-Primerpaare für das zu quantifizierende Gen, gegeben. In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit (2.3.2.3) wurden je verwendeter cDNA, die mittels einer siRNA manipuliert wurde, die relevanten Gene in drei technischen Replikaten in einem Experiment untersucht, einzelne Experimente zu drei biologischen Replikaten wiederholt. Im StepOnePlus Real-Time PCR System von Thermo Fisher Scientific lief anschließend die qRT-PCR für ca. zwei Stunden gemäß den Bedingungen in Tabelle 15 ab. Aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der PCR-Zyklen ergab sich eine Kurve aus welcher cycle threshold (ct)-Werte ermittelt wurden. ACTB diente als Standard bei der Kalkulation der  $\Delta$ ct-Werte betreffend dem zu quantifizierenden Gen. Diese Werte wurden anschließend jeweils auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisiert.

### 3.2.3. Validierung potentiell kompensatorischer Mechanismen aufgrund der Depletion des TRAP Komplexes

Durch die Depletion des TRAP-Komplexes wurden innerhalb der Proteomanalyse einige Proteine quantitativ erhöht nachgewiesen. Zur Validierung als Grundlage zur weiteren Untersuchung dieser potentiellen Kompensationsmechanismen wurden gemäß 2.4.4.1 unabhängige Depletions-Experimente durchgeführt und damit Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse hinsichtlich des relativen Proteingehalts auf Western Blot Basis sowie des mRNA-Gehalts mittels quantitativer RT-PCR überprüft.

Unter den quantitativ positiv beeinflussten Proteinen nach Depletion von *TRAPB* wurden die beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des SRP-Rezeptors massenspektrometrisch nachgewiesen, dargestellt in Abbildung 50 A und D. Zur Validierung wurden unabhängige Experimente der siRNA vermittelten verminderte Genexpression von *TRAPB* durchgeführt. Der Gehalt von SR $\alpha$  und SR $\beta$  wurde anschließend auf Western Blot Ebene sowie durch qRT-PCR quantifiziert. Die jeweiligen Ergebnisse der Proteom- sowie der Western Blot Analyse sind vergleichend Abbildung 50 zu entnehmen. Die reduzierte Genexpression von *TRAPB* führte zu einer quantitativen Erhöhung des Proteingehalt von SR $\alpha$  sowie SR $\beta$ . Dies bestätigt das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse, nämlich der Gegenregulation der beiden Untereinheiten des SRP-Rezeptors auf Proteinebene aufgrund der Degradation des TRAP-Komplexes.

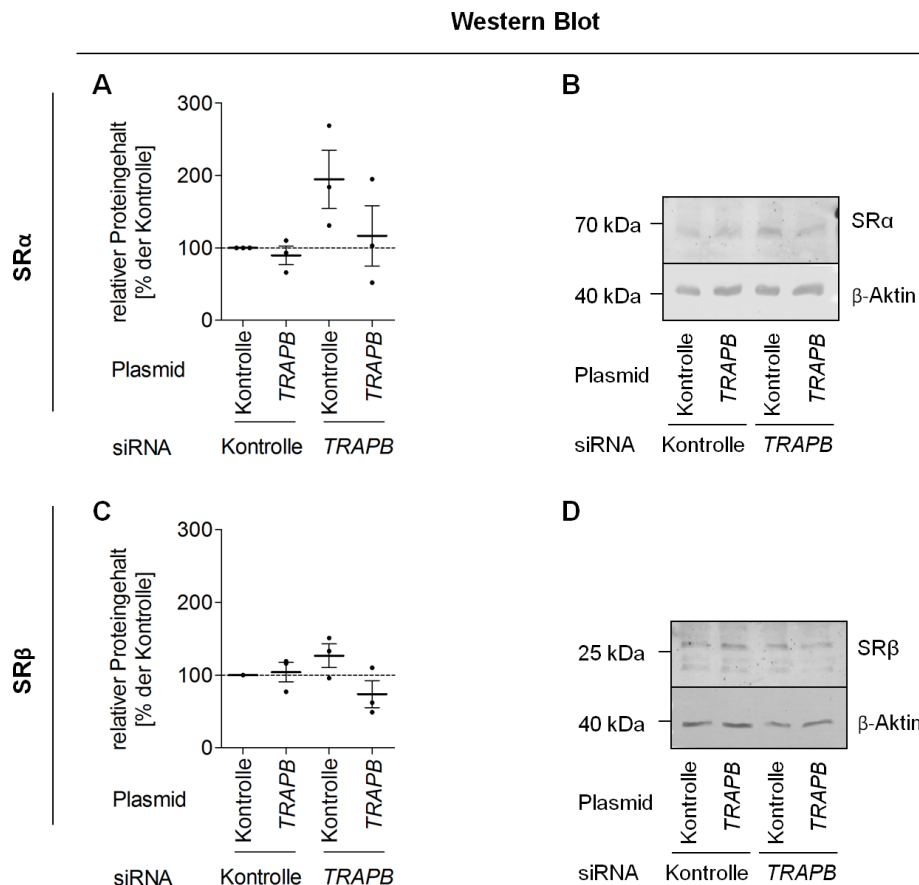
Durch simultane Depletion von *TRAPB* und Expression eines entsprechenden Plasmids kodierend für *TRAPB* cDNA mit *Myc*-DDK-Tag gemäß 2.4.4.1 und 2.4.4.3, lässt sich der Phänotyp dieser Gegenregulation auf Proteinebene retten (Abbildung 51). Die genannten Ergebnisse beziehen sich auf den Zeitpunkt 96 h nach Applikation der *TRAPB*-UTR siRNA.



**Abbildung 50: Untersuchung des relativen Proteingehalts der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach *TRAPB*- bzw. *SEC61A1* Depletion für 96 h gemäß 2.4.4.1 quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A**, **D**, **G** zeigen die Mittelwerte des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach *TRAPB* Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels *TRAPB* siRNA und *TRAPB*-UTR siRNA, jeweils  $n = 3$ ) bzw. *SEC61A1* Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels *SEC61A1* siRNA und *SEC61A1*-UTR siRNA, jeweils  $n = 2$ ) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B**, **E**, **H** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA bzw. *SEC61A1* Depletion quantifiziert ( $n = 8$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8). In **C**, **F**, **I** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **B**, **E** & **H** dargestellt. Zur Bestimmung des Proteingehalts von SR $\alpha$  und SR $\beta$  wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12,5\%$ ,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in  $5\%$  Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich  $100\%$  gesetzt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



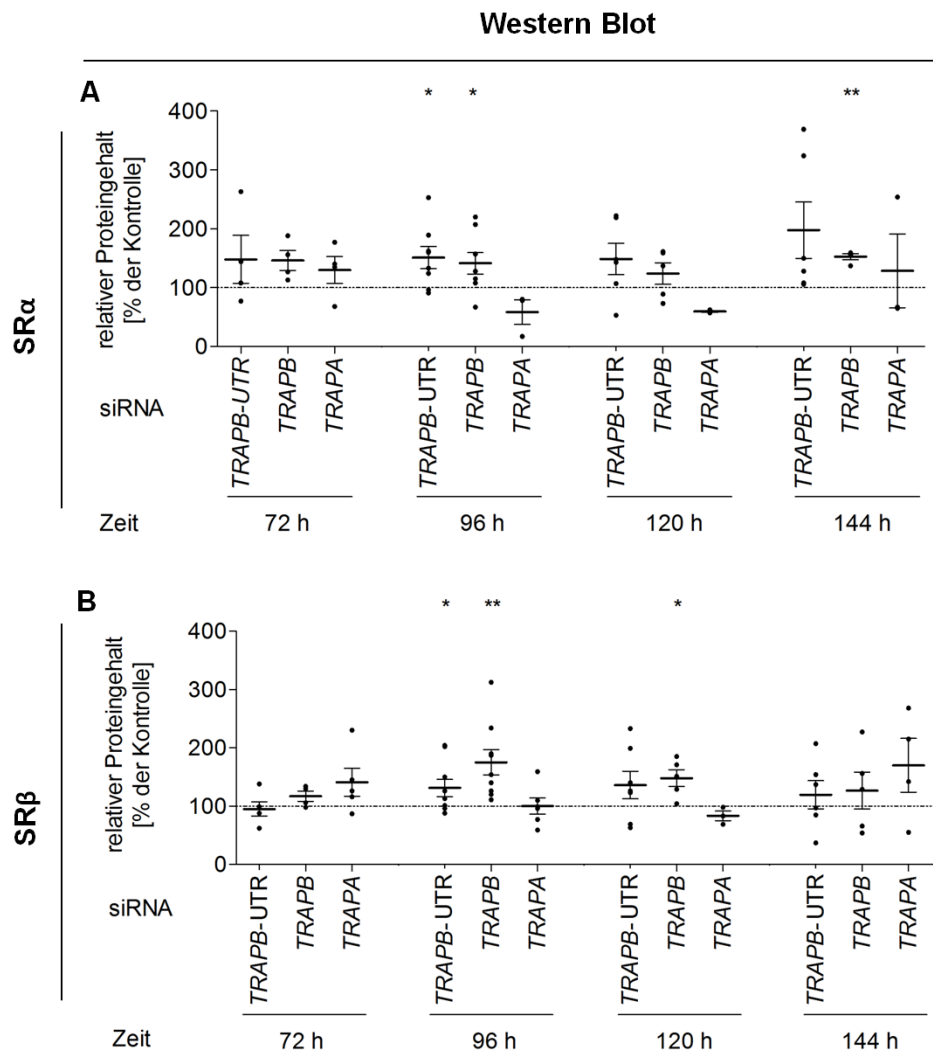


**Abbildung 51: Rettung des Phänotyps für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach Depletion von TRAPB (96 h).**

**A, C, E** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des Proteingehalts des jeweils gekennzeichneten Proteins nach Behandlung mit TRAPB-UTR bzw. Kontroll-siRNA sowie simultaner Expression eines Kontrollplasmids bzw. Plasmids, welches für TRAPB siRNA-resistente TRAPB-cDNA kodiert ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. In **B, D, F** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **A, C, E** dargestellt. HeLa-Zellen wurden gemäß Protokoll für 96 h mit TRAPB-UTR siRNA (#2) bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen nach 30 h entweder mit einem Plasmid transfiziert, welches für siRNA-resistente TRAPB-cDNA mit C-terminalem Myc-DDK-Tag kodiert, oder einem Kontrollplasmid. Die Ernte erfolgte nach 96 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von SR $\alpha$  und SR $\beta$  wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12,5\%$ ,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Des Weiteren wurde die Korrelation zwischen dem Proteingehalt der Proteine SR $\alpha$  und SR $\beta$  in zeitlicher Abhängigkeit zur Transfektionsdauer der HeLa-Zellen mit *TRAPB* bzw. *TRAPA* siRNA untersucht. Die Ergebnisse dieser kinetischen Analyse im Zeitraum von 72 h – 144 h auf Western Blot Ebene sind in Abbildung 52 abgebildet.

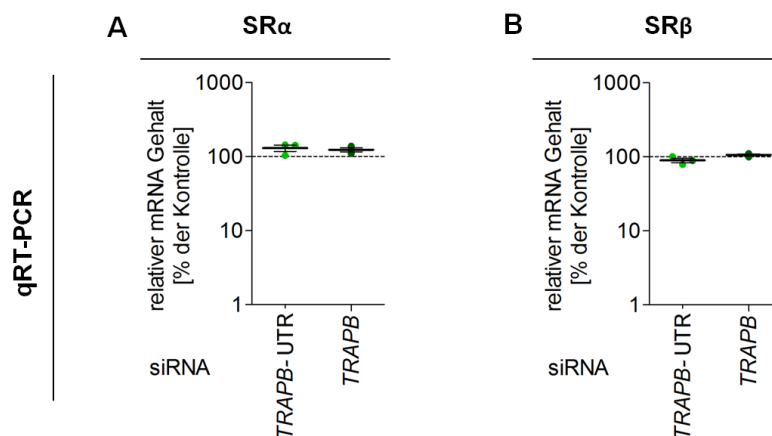
Eine Erhöhung des SR $\alpha$ -Gehalts war über den gesamten beobachteten Zeitraum nach der reduzierten Expression von *TRAPB* im Mittel erkennbar, wenn auch signifikant nur nach 96 h und 144 h nachweisbar. In Bezug auf SR $\beta$  zeigte sich erst nach 96 h eine signifikante quantitative Erhöhung des Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB*. Dieser Effekt tritt auch nach 120 h und 144 h Transfektionsdauer auf, zu letzterem jedoch nicht statistisch signifikant. Die verminderte Genexpression von *TRAPA* bewirkt sowohl für SR $\beta$  als auch SR $\alpha$  nach 72 h und 144 h eine Steigerung der Proteinmenge.



**Abbildung 52: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach Depletion von *TRAPB* (72 h – 144 h).**

Vergleichend dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwert der Proteingehalts von **A** SR $\alpha$  und **B** SR $\beta$  nach *TRAPB* Depletion mittels *TRAPB* siRNA bzw. *TRAPB*-UTR siRNA oder *TRAPB* Depletion für 72 h, 96 h, 120 h und 144 h. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen depletierenden oder Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt. Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von SR $\alpha$  und SR $\beta$  wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12,5\%$ ,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt.

Mittels qRT-PCR wurde außerdem der relative mRNA-Gehalt kodierend für SR $\alpha$  und SR $\beta$  nach der Depletion von *TRAPB* untersucht. Dies diente dem Ausschluss, dass die verwendeten siRNAs, die zur Degradation des TRAP-Komplexes führen, keine direkte Beeinflussung der Untereinheiten des SRP-Rezeptors auf mRNA-Ebene mit sich bringen. In drei unabhängigen Experimenten wurden HeLa-Zellen mit *TRAPB* bzw. *TRAPB*-UTR siRNA für 96 h behandelt. Abbildung 53 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung: Somit führte die Transfektion der HeLa-Zellen mit *TRAPB* bzw. *TRAPB*-UTR siRNA zu keiner Änderung der mRNA-Menge von SRPRA und SRPRB. Da innerhalb der qRT-PCR keine Veränderungen nachgewiesen werden konnten, sind die bisher erläuterten Ergebnisse als Folge der effizienten Reduktion der Genexpression von *TRAPB* mittels RNAi verifiziert worden und Primäreffekte auf Transkriptionsebene des SRP-Rezeptors wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 53: Analyse des relativen mRNA-Gehalts der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des SRP-Rezeptors nach *TRAPB* Depletion**

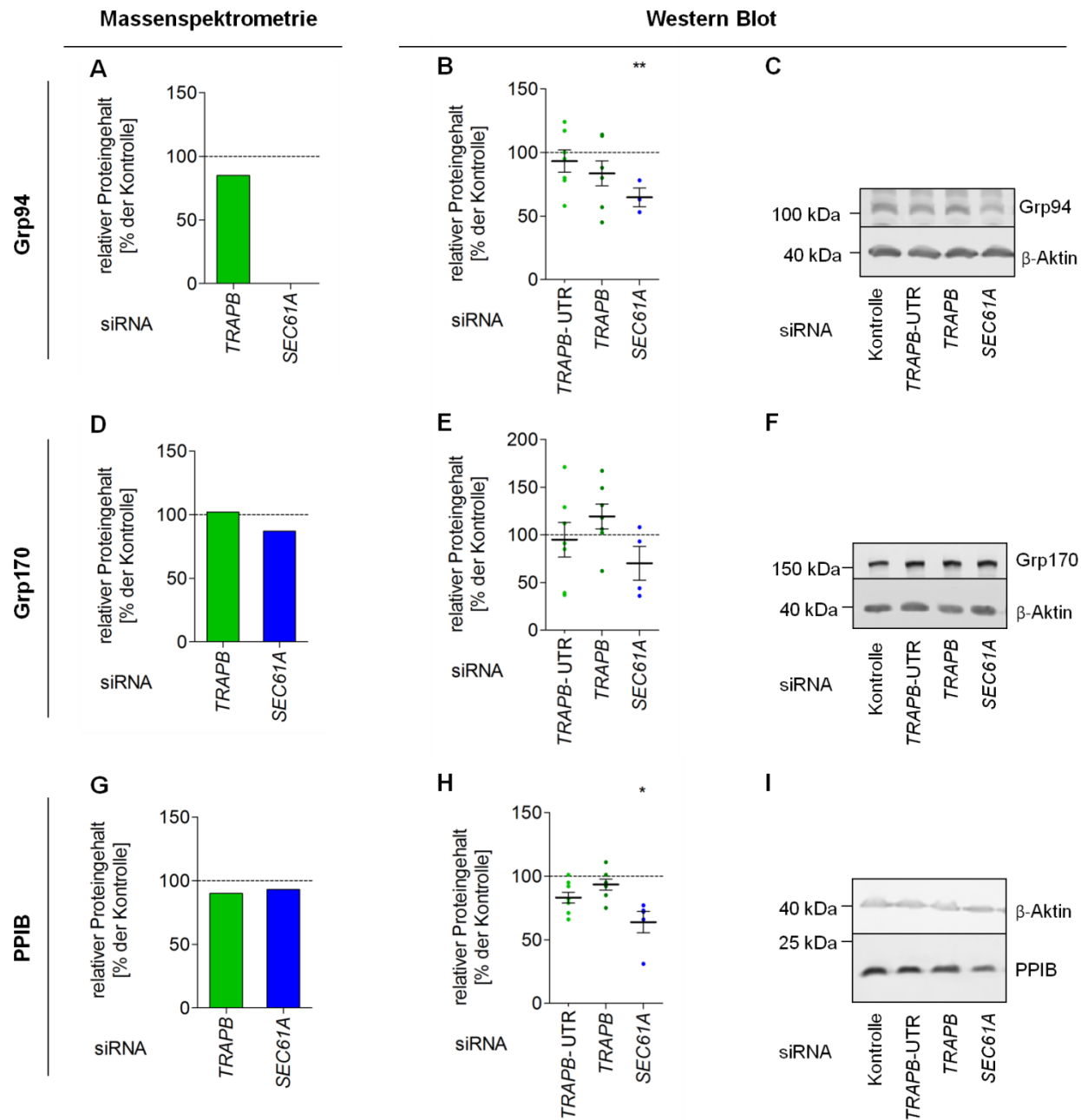
Vergleichend dargestellt ist der Gehalt an mRNA der (A)  $\alpha$ - und (B)  $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach *TRAPB* Depletion für 96 h gemäß 2.3.2.3 quantifiziert mittels qRT-PCR. Gekennzeichnet sind sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von *TRAPB* mittels *TRAPB* siRNA, *TRAPB*-UTR siRNA (n =3). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zur Bestimmung des mRNA Gehalts wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA in einer qRT-PCR weiter analysiert. Aus 5 Mio Zellen wurde anschließend durch Anwendung des QIAamp RNA Blood Mini Kit die gesamte RNA isoliert und DNA durch Verdau mit DNaseI abgebaut, die isolierte RNA in Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop beurteilt. Im nachfolgenden Schritt wird die RNA mit Hilfe des SuperScript VILO cDNA Synthese Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt bevor auch die neu gewonnene cDNA im NanoDrop auf Konzentration und Reinheit überprüft wurde. Zur eigentlichen qRT-PCR werden je 50 ng cDNA in ein Well einer MicroAMP Fast 96 Well Reaction Plate, 10  $\mu$ L des TaqMan Gene Expression Mastermix sowie 1  $\mu$ L Expression Assay, d.h. qRT-PCR-Primerpaare für das zu quantifizierende Gen, gegeben. In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit (2.3.2.3) wurden je verwendeter cDNA, die mittels einer siRNA manipuliert wurde, die relevanten Gene in drei technischen Replikaten in einem Experiment untersucht, einzelne Experimente zu drei biologischen Replikaten wiederholt. Im StepOnePlus Real-Time PCR System von Thermo Fisher Scientific lief anschließend die qRT-PCR für ca. zwei Stunden gemäß den Bedingungen in Tabelle 15 ab. Aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit der PCR-Zyklen ergab sich eine Kurve aus welcher cycle threshold (ct)-Werte ermittelt wurden. ACTB diente als Standard bei der Kalkulation der  $\Delta$ ct-Werte betreffend dem zu quantifizierenden Gen. Diese Werte wurden anschließend jeweils auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen normalisiert. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

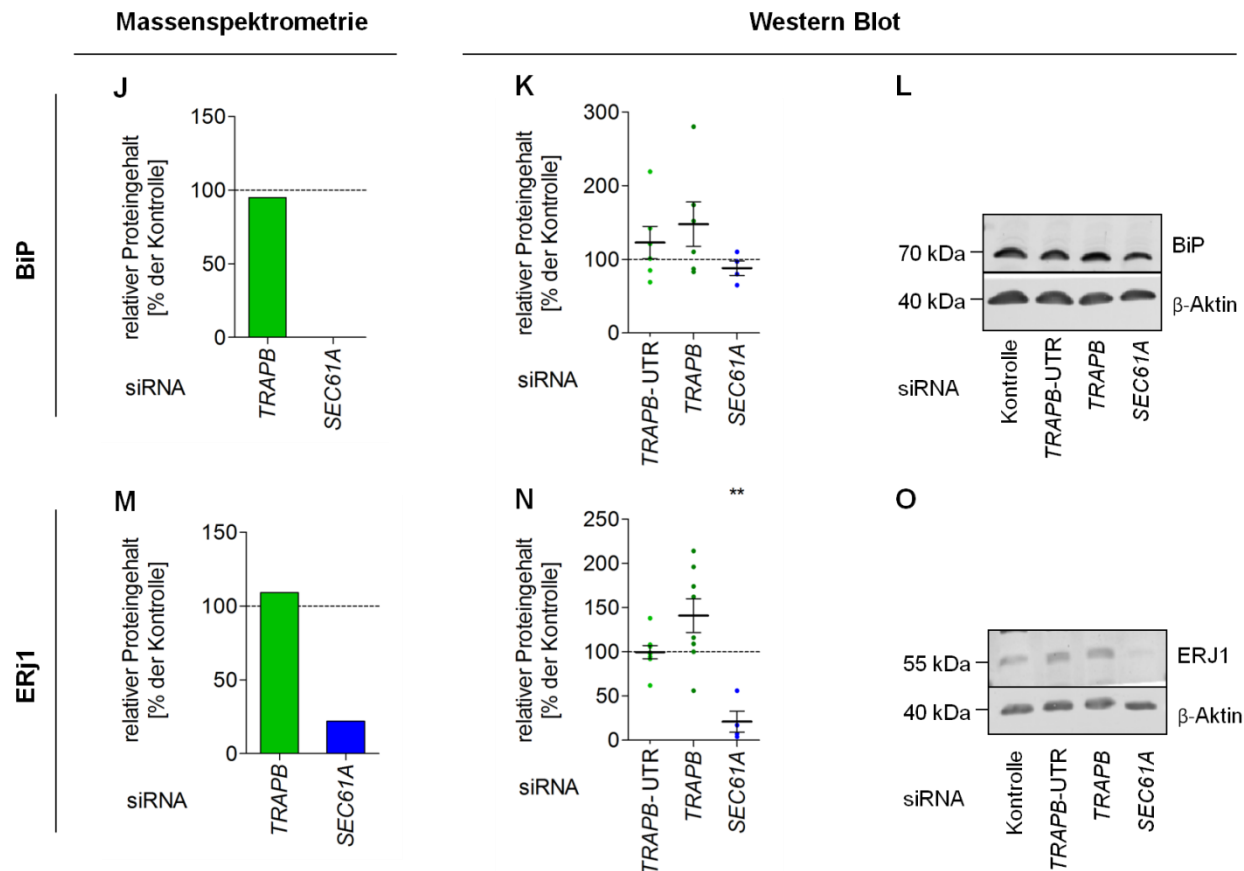
### 3.2.4. Validierung unbeeinflusster Proteine nach *TRAPB* Depletion

Zur Verifizierung der bisherigen Validierungsergebnisse wurden weitere Modellproteine ausgewählt, um diese gleichermaßen zu untersuchen. Bei den Proteinen PPIB, ERj1, Grp94, Grp170 und BiP handelt es sich um ER-Proteine, welche laut Proteomanalyse nach der Depletion von *SEC61A1* quantitativ vermindert nachgewiesen wurden. Die verminderte Genexpression von *TRAPB* zeigte jedoch keinen Einfluss auf den Gehalt der genannten Proteine. Um dies auch in unabhängigen Experimenten zu prüfen, wurden HeLa-Zellen 96 h gemäß 2.4.4.1 mittels siRNA *SEC61A1* und *TRAPB* betreffend manipuliert. Abbildung 54 zeigt vergleichend die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse (A, D; G, J, M) sowie den Validierungs-experimenten, auf Basis des Western Blots. Durch diese wurde bestätigt, dass aufgrund der Depletion von *SEC61A1* der Gehalt der untersuchten Proteine signifikant reduziert wurde. Eine Beeinträchtigung des Proteingehalts nach Depletion des TRAP-Komplexes wurde nicht nachgewiesen. Somit wurde auch die Aktivierung der „*unfolded protein response* (UPR)“ durch quantitative Erhöhung der UPR-assoziierten Proteine BiP, Grp94 und Grp170 nach 96 h Depletionszeit ausgeschlossen.

Abbildung 55 zeigt die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung hinsichtlich der Depletion der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes im Zeitraum von 48 h bis 144 h und der Auswirkung auf den Gehalt der Proteine Grp94 (A), Grp170 (B), PPIB (C), BiP (D) und ERj1 (E) mittels Western Blot Analyse.

Zusammenfassend wurde für keines der untersuchten Proteine zu einem Zeitpunkt des gesamten Untersuchungszeitraums eine quantitative Beeinflussung des Proteingehalts aufgrund der Depletion von *TRAPB* oder *TRAPA* nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die untersuchten Proteine auch nicht etwa verzögert von der verminderte Genexpression der TRAP-Komplex-Untereinheiten affiziert werden, somit in keiner Abhängigkeit zum TRAP-Komplex stehen.

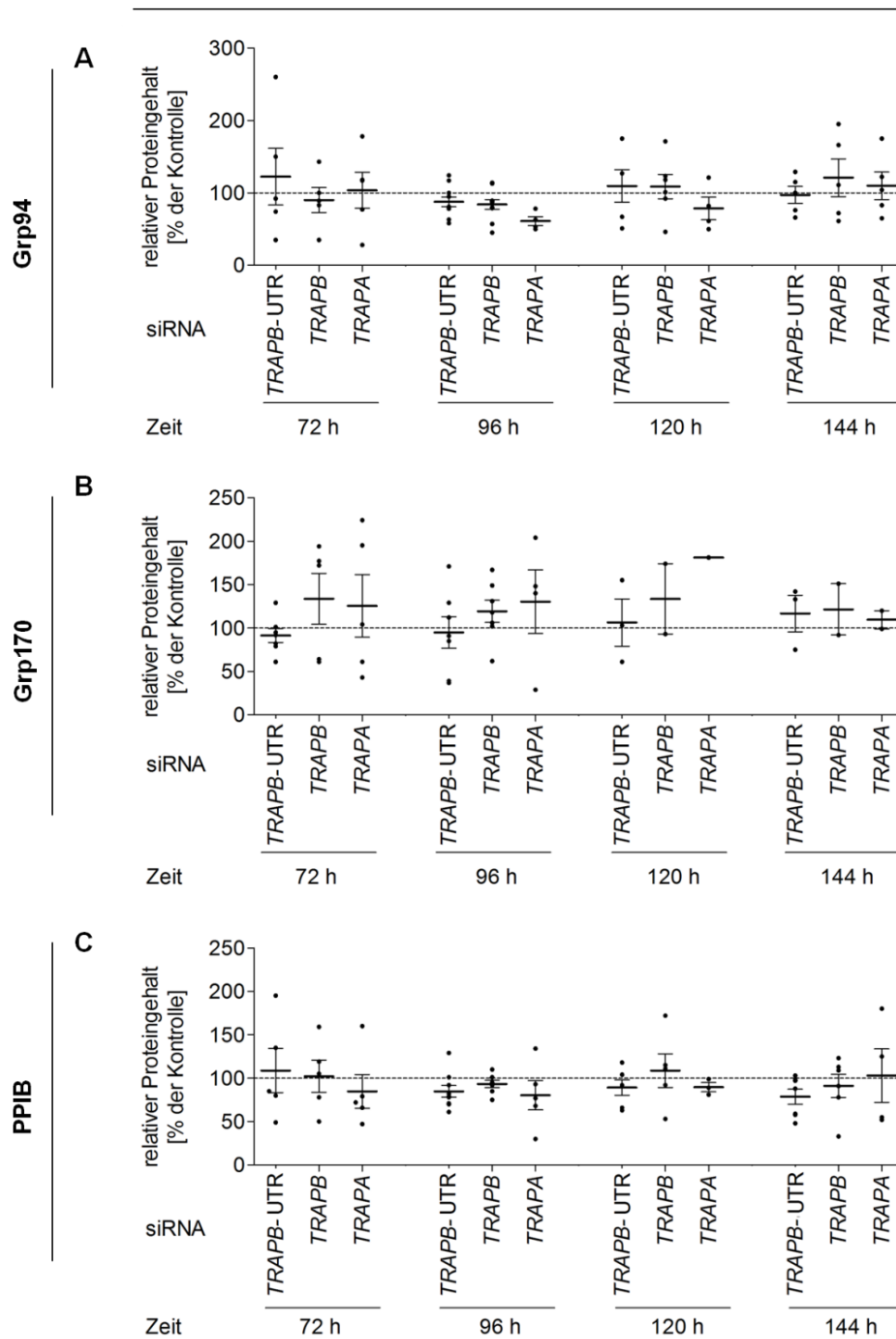




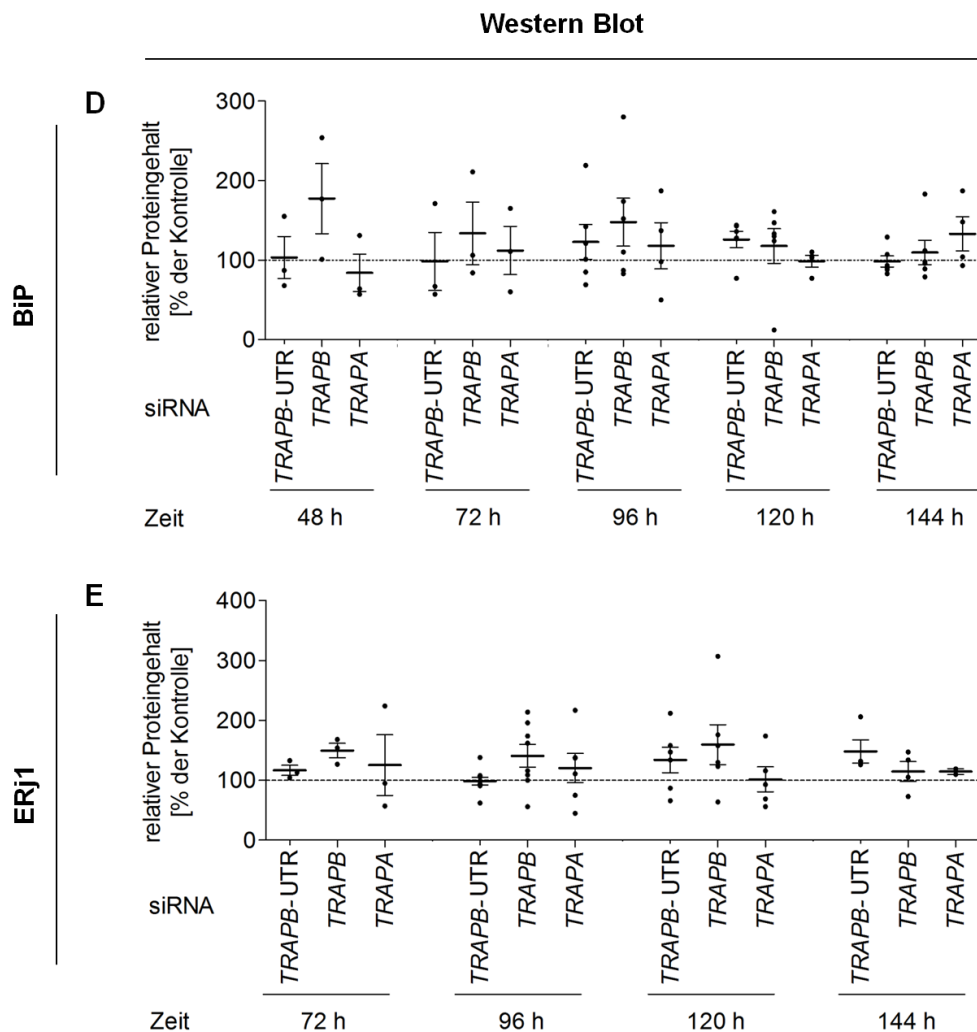
**Abbildung 54: Untersuchung des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Grp94, Grp170, PPIB und BiP sowie des ER-Membranproteins ERj1 nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion (96 h).**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der ER-luminalen Proteine Grp94, Grp170, PPIB und BiP sowie des ER-Membranproteins ERj1 nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion für 96 h gemäß 2.4.4.1, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, D, G, J, M** zeigen die Mittelwerte des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach TRAPB Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels TRAPB siRNA und TRAPB-UTR siRNA, jeweils n = 3) bzw. SEC61A1 Depletion (Mittelwert aus den Ergebnissen nach Manipulation de HeLa-Zellen mittels SEC61A1 siRNA und SEC61A1-UTR siRNA, jeweils n = 2) quantifiziert innerhalb der markierungsfreien Proteomanalyse. **B, E, H, K, N** zeigen sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweiligen gekennzeichneten Proteingehalts nach Depletion von TRAPB mittels TRAPB siRNA, TRAPB-UTR siRNA (je n = 5) bzw. SEC61A1 Depletion quantifiziert (n = 3). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8). In **C, F, I, L, O** ist je ein repräsentativer Blot als Grundlage der Auswertung in **B, E, H, K, N** dargestellt. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Grp94, Grp170, PPIB, BiP und Erj1 wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12,5 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet. β-Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti-β-Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von β-Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A – I veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licences/by/4.0/>).

Western Blot







**Abbildung 55: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Grp94, Grp170, PPIB und BiP sowie des ER-Membranproteins ERj1 nach TRAPB- bzw. SEC61A1 Depletion (48 h – 144 h).**

Vergleichend dargestellt sind Einzelwerte und der Mittelwert der Proteingehalts von **A** Grp94, **B** Grp170, **C** PPIB, **D** BiP und **E** ERj1 nach TRAPB Depletion mittels TRAPB siRNA bzw. TRAPB-UTR siRNA oder TRAPB Depletion für 72 h, 96 h, 120 h und 144 h. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 10 nM der jeweiligen depletierenden oder Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 96 h behandelt. Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Grp94, Grp170, PPIB, BiP und ERj1 wurden die Proben nach 96-stündiger Manipulation mit der jeweiligen siRNA mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12,5\%$ ,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Zum Vergleich der Kontrolle mit den Ergebnissen nach Proteindepletion wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (2.8).

Durch die Ergebnisse der Kapitel 3.2.2 bis 3.2.4 konnte Folgendes beobachtet werden:

Durch die reduzierte Genexpression von *TRAPB* mittels RNAi wurde der relative mRNA-Gehalt für keines der untersuchten potentiellen TRAP-abhängigen Substrate PPIC, TMED5, ACP2 oder EPDR1 maßgeblich negativ beeinflusst. Da gleichzeitig die Proteinmenge jedoch stark vermindert war, kann daraus gefolgert werden, dass es sich dabei um einen Sekundäreffekt der *TRAPB* siRNA auf Proteinebene handelt.

Ebenso wurde keine quantitative Veränderung der mRNA Menge kodierend für die beiden Untereinheiten des SRP-Rezeptors nach genetischer Manipulation der HeLa-Zellen mit *TRAPB* siRNA nachgewiesen. Jedoch wurde bestätigt, dass die SR $\alpha$  und SR $\beta$  Proteinmenge gleichzeitig signifikant erhöht war.

Es wurde nachgewiesen, dass die 96-stündige Transfektion mit einer entsprechenden siRNA zur Reduktion der Genexpression *TRAPB* dazu führte, dass der relative Proteingehalt der OST-Komplex Untereinheiten Dad1, Stt3b und Ost48 stark vermindert wurde. Untersuchungen zum Proteingehalt von Calreticulin, Sil1 und Sel1 zeigten die gleichen Ergebnisse.

Die genannten Effekte hinsichtlich der quantitativ veränderten Proteinlevel aller untersuchten Modellsubstrate konnten durch simultane Expression von siRNA-resistenter *TRAPB*-cDNA gerettet werden.

Des Weiteren erfolgte der Nachweis, dass die verminderte Genexpression von *TRAPB* im Zeitraum von 96 h nicht zu einer Aktivierung der UPR führt. Essentielle Effektoren dieses Prozesses, wie z.B. BiP, Grp94 und Grp170 waren nach Depletion des TRAP-Komplexes unbeeinflusst. Gleiches wurde für die ER-residenten Proteine Sel1 und ERj1 beobachtet.

All diese Beobachtungen unterstützen und bestätigen die Ergebnisse der Proteomanalyse und der folgenden Proteinmengenbestimmung. Dies lässt die Folgerung zu, dass beide Methoden gleichwertige Strategien zur validen Untersuchung proteinbiochemischer Zusammenhänge in HeLa-Zellen sind.

### 3.3. Charakteristika der TRAP-Substrate

Im Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes erfolgte die Untersuchung der Proteine, die innerhalb der Proteomanalyse *TRAPB*-depletierter HeLa-Zellen als vermindert nachgewiesen wurden, hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften von Signalpeptiden sowie N-terminalen Transmembranhelices bei Proteinen ohne abspaltbares Signalpeptid.

In Abbildung 56 ist die Verteilung des Hydrophobizitätsscores sowie des GP-Gehalts der Signalpeptide bzw. N-terminalen Transmembranhelices des gesamten humanen Proteoms, der Sec61- sowie der TRAP-Substrate dargestellt. Auffallend ist, dass TRAP-Substrate im Vergleich zum gesamten humanen Proteom sowie Sec61-Substraten einen höheren Anteil helixbrechender Aminosäuren, Glycin und Prolin (GP), innerhalb ihrer Signalpeptide aufweisen (A, Wilcoxon Vorzeichen Rang Test  $p = 0,007$ ). Dies deutet darauf hin, dass TRAP-Substrate eine geringere Neigung zur Ausbildung von alpha-Helices innerhalb ihrer Signalpeptide haben. Im Durchschnitt ist der GP-Gehalt der Signalpeptide TRAP-abhängiger Substrate um 50 % erhöht im Vergleich zur Gesamtheit humaner Signalpeptide als auch des gesamten humanen Proteoms (E).

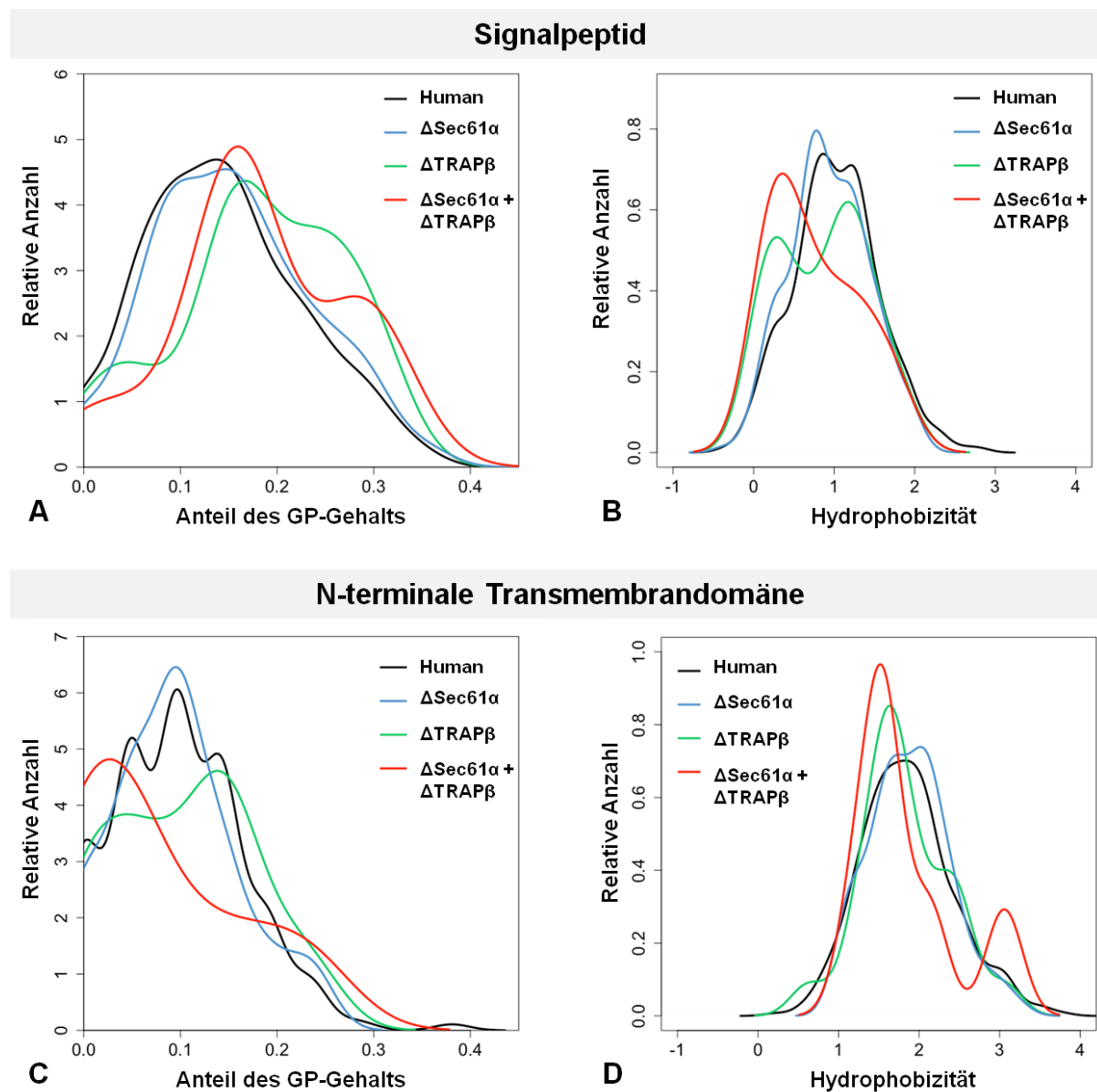
Des Weiteren wird deutlich, dass Polypeptide mit wenig-hydrophobem Signalpeptid stärker durch die Sec61 Depletion beeinflusst sind (B). Dies deutet darauf hin, dass Sec61 solche Vorläufer bevorzugt, welche ein Signalpeptid mit überdurchschnittlicher Hydrophobizität besitzen (Wilcoxon Vorzeichen Rang Test  $p = 0,055$ ). Bei Betrachtung der TRAP-Substrate ergibt sich die Tendenz, dass eine niedrige Hydrophobizität der Signalpeptide kennzeichnendes Merkmal ist ( $p = 0,125$ ). Diese Tendenz wird dann signifikant ( $p = 0,05$ ), wenn man die TRAP-Substrate auf die Gruppe beschränkt, welche zusätzlich auch durch die Depletion von Sec61 negativ beeinflusst werden. Diese Beobachtungen gehen mit solchen vorhergehender in vitro Studien einher (Fons, Bogert, & Hegde, 2003).

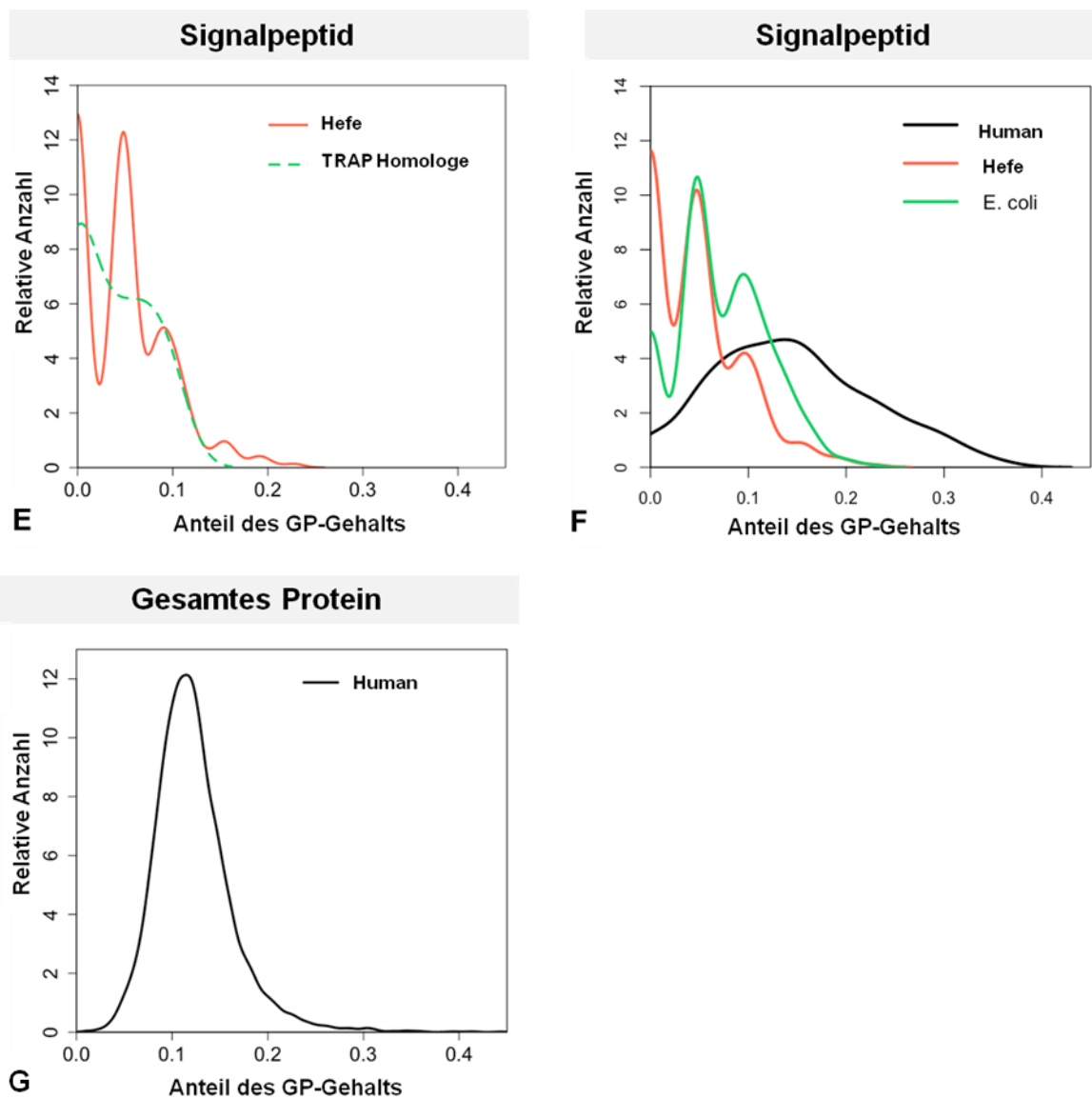
Die genannten Tendenzen hinsichtlich Hydrophobizität sowie GP-Gehalt sind ebenfalls bei Betrachtung der N-terminalen Transmembrandomänen von Proteinen ohne abspaltbares Signalpeptid erkennbar, wenn auch nicht statistisch signifikant (Abbildung 56 C, D).

Zur Klärung der Frage nach dem Ursprung des ungewöhnlich hohen Anteils der helixbrechenden Aminosäuren der Signalpeptide, wurden Homologe der humanen TRAP-Substrate in *S. cerevisiae* untersucht (E). Unter den 7000 Proteinsequenzen (SwissProt) des Hefeproteoms befanden sich 800 Proteine mit Signalpeptid. Sieben direkte Homologe humaner TRAP-Substrate konnten dieser Gruppe zugeordnet werden. Die Homologe in *S. cerevisiae* zeigen einen durchschnittlichen GP-Gehalt von 5,3 %, damit deutlich geringer als derer der humanen TRAP-Substrate.

Des Weiteren beträgt der durchschnittliche GP-Gehalt aller Signalpeptide des *S. cerevisiae* Proteoms 8 % und liegt damit wesentlich unter dem Durchschnitt humaner Signalpeptide (F).

Sehr ähnlich verhält sich dies für die Signalpeptide des *E. coli* Proteoms. Der TRAP-Komplex ist weder in *E. coli* noch in *S. cerevisiae* konserviert. Dies unterstützt die These, dass der hohe GP-Gehalt lediglich relevant zur Translokation von TRAP-Substraten in humanen Zellen ist.





**Abbildung 56: Physiko-chemische Eigenschaften der TRAP-Substrate mit Signalpeptid oder N-terminaler Transmembrandomäne.**

Dargestellt ist die Verteilung des GP-Gehaltes (**A, C**) sowie des Hydrophibizitätsscores (**B, D**) der Signalpeptide (**A; B**) bzw. N-terminalen Transmembranhelices (**C, D**) des gesamten humanen Proteoms (schwarz), der Sec61 $\alpha$ -Substrate (blau), der TRAP-Substrate (grün) sowie der sowohl Sec61 $\alpha$ - als auch TRAP-Substrate (rot). In **E** und **F** zeigen die Verteilung des relativen GP-Anteils der Signalpeptide im Proteom der Hefe (rot), *E. coli* (grün), des Menschen (schwarz) sowie der Hefe-Orthologe humaner TRAP-Substrate (gestrichelt). **G** zeigt die Verteilung des GP-Anteils kompletter Proteinsequenzen der gesamten humanen Proteoms (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### **3.4. Evaluierung der TRAP Substrate sowie deren Charakteristika in Fibroblasten von CDG-Patienten**

Bezugnehmend zu den in Kapitel 1.6 beschriebenen congenitalen Glykosylierungskrankheiten (CDG) wurden Mutationen in der  $\gamma$  und  $\delta$  Untereinheit des TRAP-Komplexes identifiziert, die zum teilweisen oder gesamten Verlust des TRAP-Komplexes und dadurch zu einer CDG führen. Fibroblasten von drei CDG-Patienten wurden daher ebenfalls mittels quantitativer markierungsfreier Proteomanalyse untersucht. Anschließend erfolgte die Auswertung hinsichtlich quantitativer Abweichungen im Proteinspektrum im Vergleich zu gesunden Kontroll-Fibroblasten. Im folgenden Abschnitt werden diese Daten der chronisch TRAP-depletierten Patientenzellen mit den Daten der HeLa-Zellen verglichen, welche durch siRNA vermittelte Depletion dahingehend manipuliert wurden, den TRAP-Komplex weitestgehend zu degradieren.

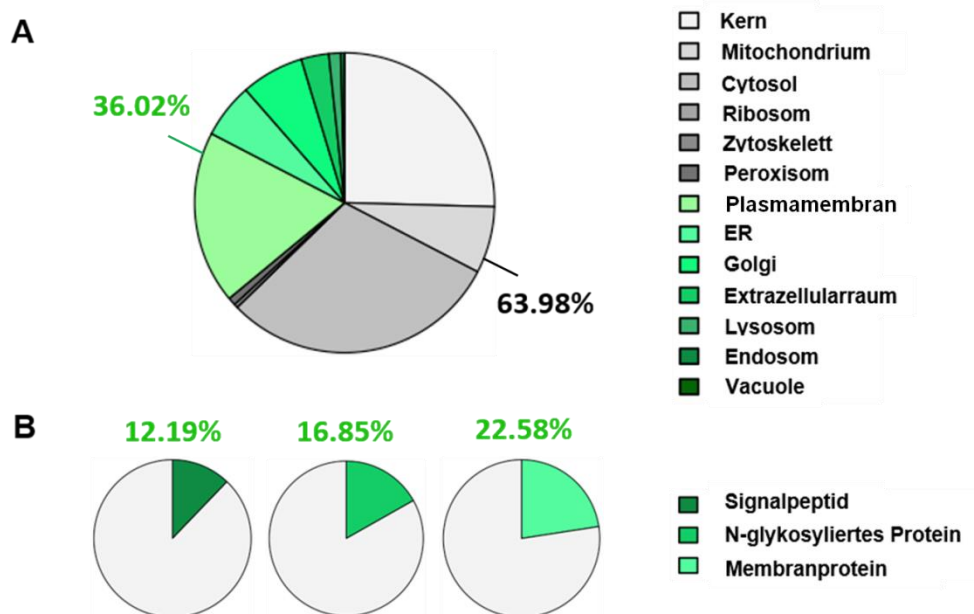
#### **3.4.1. Datenvergleich der Proteomanalyse von chronisch TRAP-defizienten CDG-Patientenfibroblasten mit transient TRAP-depletierten HeLa-Zellen**

Zur zusätzlichen Validierung von TRAP-Substraten und deren Eigenschaften wurden Fibroblasten von drei CDG-Patienten sowie Fibroblasten von zwei gesunden Personen als Kontrollen verwendet. Dabei weisen zwei Patienten eine Mutation in der  $\delta$ -, ein Patient in der  $\gamma$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes auf (1.6). Diese wurden einer quantitativen, markierungsfreien Proteomanalyse sowie anschließender Proteinmengenbestimmung unterzogen. Durch den quantitativen Vergleich der Kontroll- mit den Patientenfibroblasten wurden quantitativ negativ beeinflusste Proteine identifiziert, die gemäß Abbildung 24 potentielle TRAP-Substrate sein könnten. Insgesamt wurden 5919 verschiedene Proteine innerhalb der massenspektrometrischen Analyse charakterisiert. 279 Proteine wurden negativ gegenüber der Kontrolle innerhalb der Patientenzellen beeinflusst.

Im Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes erfolgte die Untersuchung der Proteine, hinsichtlich ihrer Lokalisation, der physikochemischen Eigenschaften N-terminaler Signalpeptide sowie Transmembranhelices bei Proteinen ohne abspaltbares Signalpeptid.

Abbildung 57 zeigt die subzelluläre Lokalisation der innerhalb der Proteomanalyse quantifizierten Proteine basierend auf Gene Ontology (GO) Annotationen. Innerhalb des gesamten Proteoms konnten 36 % der Proteine dem sekretorischen Transportweg zugeordnet werden. Dieser Anteil ist vergleichbar mit dem der Gruppe negativ beeinflusster Proteine aufgrund der siRNA vermittelten Depletion von *TRAPB* in HeLa-Zellen (40 %).

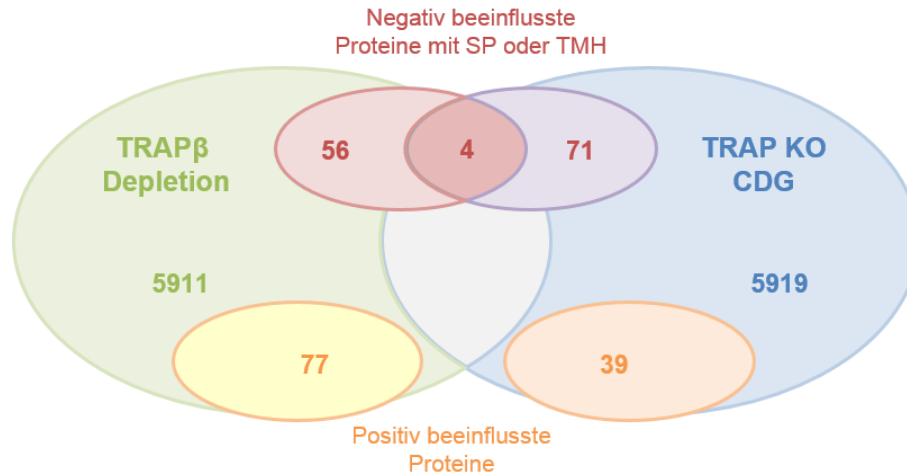
Der Anteil der Proteine mit Signalpeptid (12 %) sowie Glykoproteine (17 %) war etwas geringer im Vergleich zum Datensatz der transient TRAP-depletierten HeLa-Zellen. Der Anteil an Membranproteinen war jedoch mit 23 % vergleichsweise erhöht.



**Abbildung 57: Subzelluläre Lokalisation der Proteine TRAP defizienter CDG-Fibroblasten.**

Dargestellt ist **A** der Anteil der subzelluläre Lokalisation des Proteoms der analysierten TRAP sowie TRAP-defizienten CDG-Fibroblasten. In grün sind die Organellen des sekretorischen Transportwegs gekennzeichnet. Zudem wird in **B** der Anteil derer Proteine markiert, die innerhalb der Gruppen in A ein Signalpeptid oder eine N-Glykosylierung aufweisen bzw. es sich um Membranproteine handelt (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Unter den 279 negativ beeinflussten Proteinen der CDG-Fibroblasten waren sowohl die Untereinheiten des TRAP-Komplexes zu finden, als auch 15 Proteine welche zuvor in HeLa-Zellen nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* negativ beeinflusst wurden (Abbildung 58). Bei näherer Betrachtung der 100 Proteine, welche dem sekretorischen Weg zugeordnet wurden, fällt auf, dass es fast keine Überschneidung mit der entsprechenden Gruppe transient TRAP-depletierter HeLa-Zellen gibt. Lediglich vier Proteine (CREG1, EPDR1, TUSC3, TWSG1) mit einem abspaltbaren Signalpeptid wurden in beiden Datensätzen als vermindert nachgewiesen.



**Abbildung 58: Quantitative Auswertung der mittels MS detektierten Proteine nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* in HeLa-Zellen sowie in chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten**

Nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* wurden 5911 Proteine in allen drei biologischen Replikaten nachgewiesen, 5919 in allen Proben der Fibroblasten mit Mutation in der  $\gamma$  bzw.  $\delta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes. Vergleichend zur Kontrolle waren nach Behandlung der HeLa-Zellen mit *TRAPB* siRNA 60 Proteine mit Signalpeptid oder N-terminaler Transmembranhelix negativ beeinflusst; die Fibroblasten der CDG-Patienten wiesen 75 solcher Proteine auf. Vier Proteine (CREG1, EPDR1, TUSC3 und TWSG1) waren in beiden Gruppen zu finden. In ihrer Quantität positiv beeinflusst wurden nach Depletion von *TRAPB* 77 Proteine, in den Fibroblasten der CDG Patienten 39 Proteine. In beiden Gruppen wurden keine gleichen Proteine nachgewiesen.

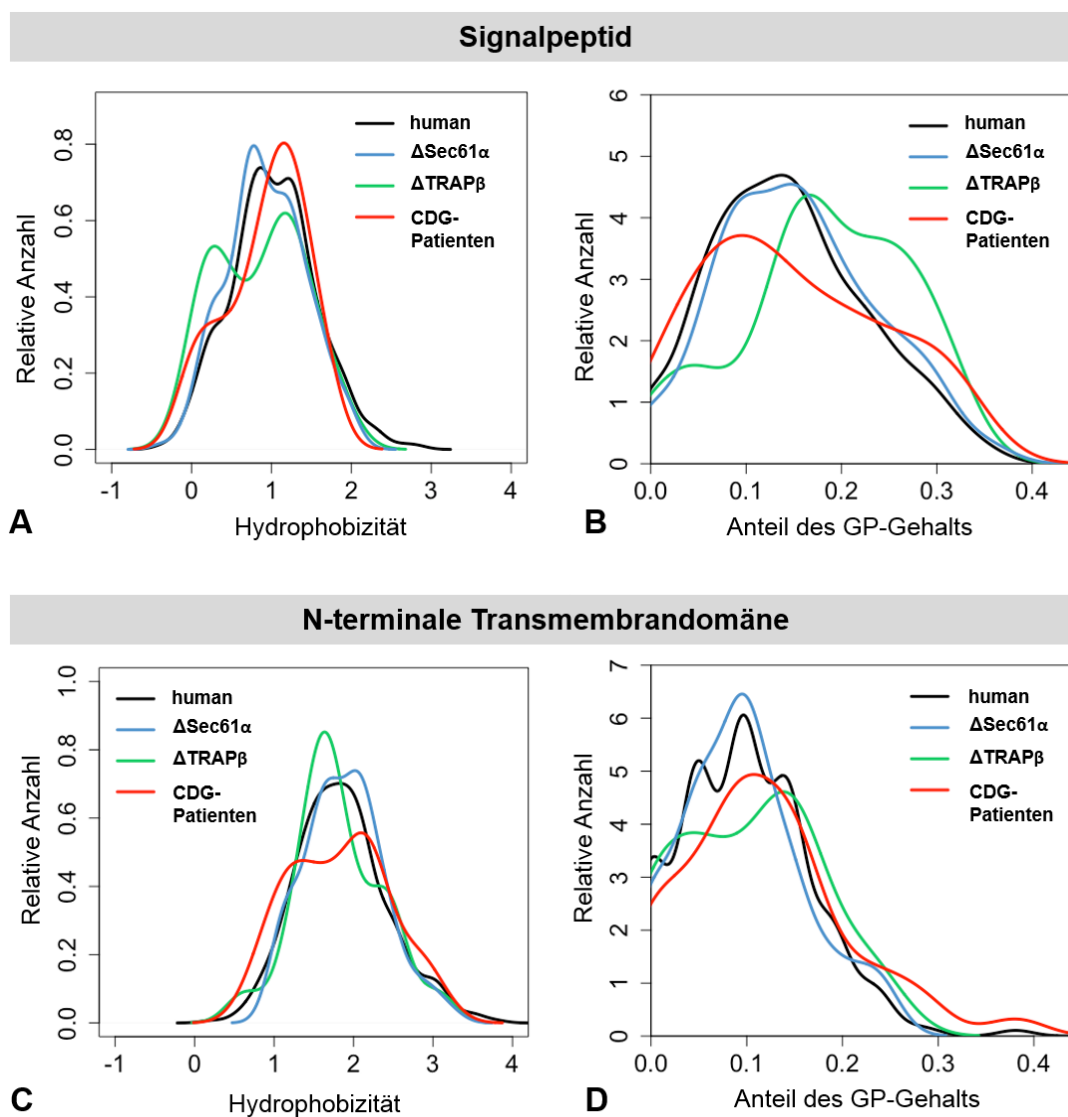
Die detaillierte Liste aller quantifizierten Proteine mit korrespondierenden Gennamen, UniProtKB IDs, und log2fold changes sind Nguyen, Stutz et al. (2018) „Supplementary Data 8“ (negativ beeinflusst) und „Supplementary Data 9“ (positiv beeinflusst) zu entnehmen.

In Abbildung 59 wird die Verteilung des Hydrophobizitätsscores sowie des GP-Gehalts innerhalb der Signalpeptide bzw. N-terminalen Transmembranhelices gezeigt. Der Datensatz ist vergleichend zu dem des gesamten humanen Proteoms, der Sec61- sowie der TRAP-Substrate. Auffallend ist, dass Signalpeptide der Proteine, welche im Proteom der CDG-Patienten im Mittel vermindert waren, nur für eine kleine Auswahl eine niedrigere Hydrophobizität aufwiesen, im Gegensatz zu TRAP-Substraten, die nach transienter TRAP Depletion ermittelt wurden (A). Letztere weisen für den Großteil der Substrate einen erhöhten Glycin und Prolin Gehalt auf und damit eine Verschiebung der gesamten Kurve hin zu höherem GP-Gehalt im Vergleich zum gesamten humanen Proteom (B). Bei Betrachtung der Kurve zugehörig zum CDG-Datensatz fällt auf, dass diese nicht komplett verschoben ist, sondern flacher und verbreitert ist. Dies bedeutet, dass die negativ beeinflussten Proteine homogener verteilt sind, es sowohl Signalpeptide mit geringem GP-Gehalt gibt, aber auch eine deutliche Anzahl mit stark erhöhtem GP-Gehalt.



Die genannten Tendenzen hinsichtlich Hydrophobizität sowie GP-Gehalt sind ebenfalls bei Betrachtung der N-terminalen Transmembrandomänen von Proteinen ohne abspaltbares Signalpeptid erkennbar, wenn auch nicht statistisch signifikant (Abbildung 59 C, D).

Des Weiteren fällt auf, dass die Hälfte der negativ beeinflussten Proteine mit N-Glykosylierung und abspaltbarem Signalpeptid einen GP-Gehalt über 15 % in selbigem aufweisen. Gleiches gilt für Glykoproteine mit N-terminaler Transmembranhelix.

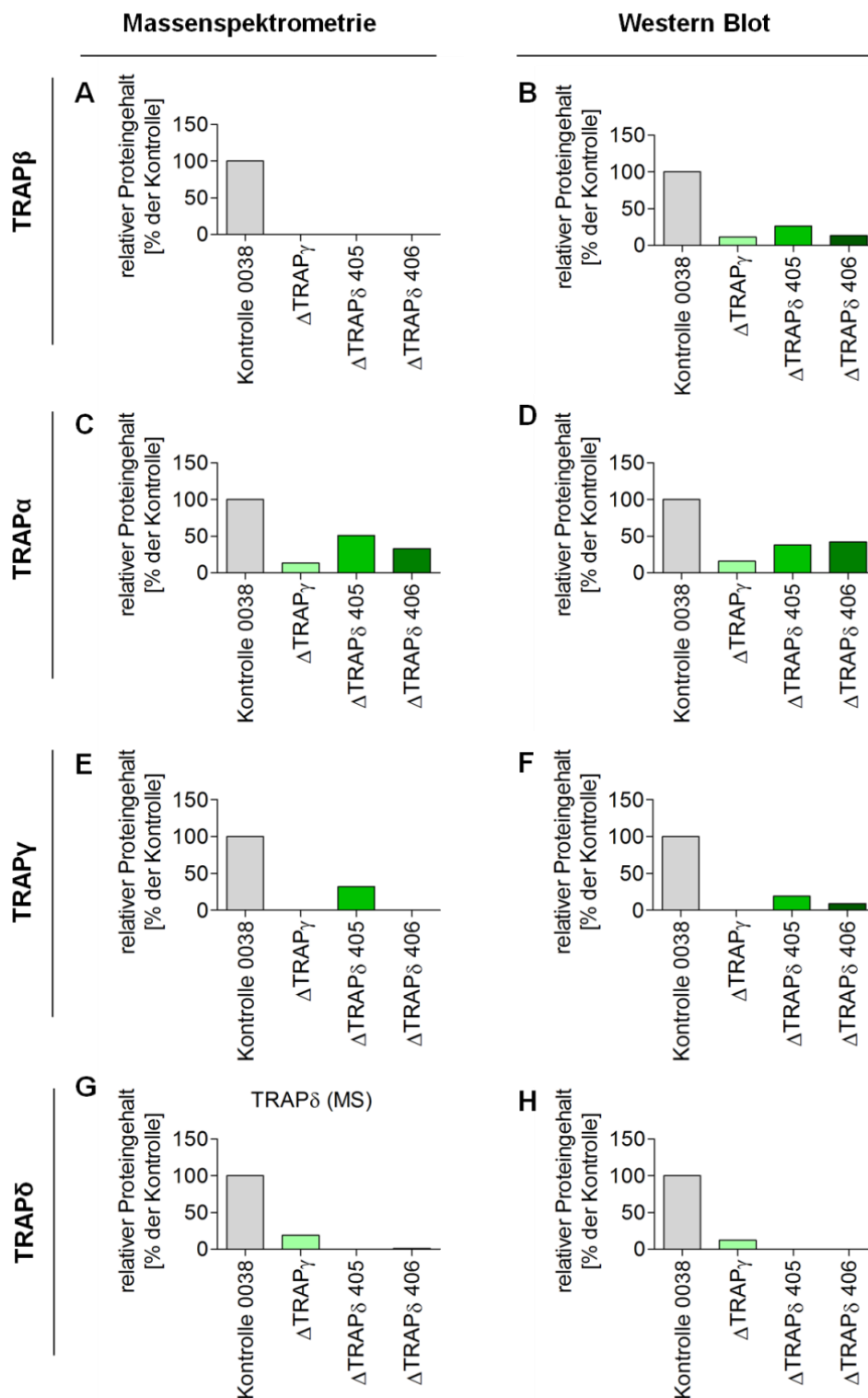


**Abbildung 59: Physiko-chemische Eigenschaften der TRAP-Substrate mit Signalpeptid oder N-terminaler Transmembrandomäne chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten und siRNA vermittelt TRAP-depletierter HeLa-Zellen.**

Dargestellt ist die Verteilung des Hydrophobizitätsscores (**A, C**) sowie des GP-Gehaltes (**B, D**) der Signalpeptide (**A, B**) bzw. N-terminalen Transmembranhelices (**C, D**) des gesamten humanen Proteoms (schwarz), der Sec61 $\alpha$ -Substrate (blau), der TRAP-Substrate (grün) jeweils identifiziert nach siRNA vermittelter Proteindepletion in HeLa-Zellen sowie der TRAP-Substrate identifiziert in chronisch TRAP-defizienten CDG-Fibroblasten (rot) (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.4.2. Validierung der TRAP-Substrate in CDG-Fibroblasten

Mit Hilfe der markierungsfreien quantitativen Proteomuntersuchung und anschließender Proteinmengenbestimmung wurden Proteine identifiziert, welche aufgrund der transienten Depletion von *TRAPB* in HeLa-Zellen in ihrer relativen Quantität beeinflusst wurden. Daneben erfolgte die gleichartige massenspektrometrische Analyse von CDG-Fibroblasten, welche aufgrund einer Genmutation chronisch TRAP-depletiert sind. Es erfolgte die quantitative Untersuchung der CDG-Fibroblasten hinsichtlich der in 3.2 validierten TRAP-Substrate auf Western Blot Ebene. Jede Untersuchung wurde dabei lediglich einmal pro Patient und Kontrolle durchgeführt. Abbildung 60 zeigt die Ergebnisse die Untereinheiten des TRAP-Komplexes betreffend: TRAP $\beta$  (A) wurde massenspektrometrisch nur in der Kontrolle nachgewiesen, im Western Blot (B) zeigten alle Patientenzellen einen minimalen Restgehalt. Für die anderen drei Untereinheiten  $\alpha$  (C, D),  $\gamma$  (E, F) und  $\delta$  (G, H) wurden die Ergebnisse der Proteomanalyse auch mittels Western Blot bestätigt. Insgesamt wurde die Degradation des gesamten TRAP-Komplexes auch für CDG-Fibroblasten durch die Mutationen in einzelnen Untereinheiten verifiziert.

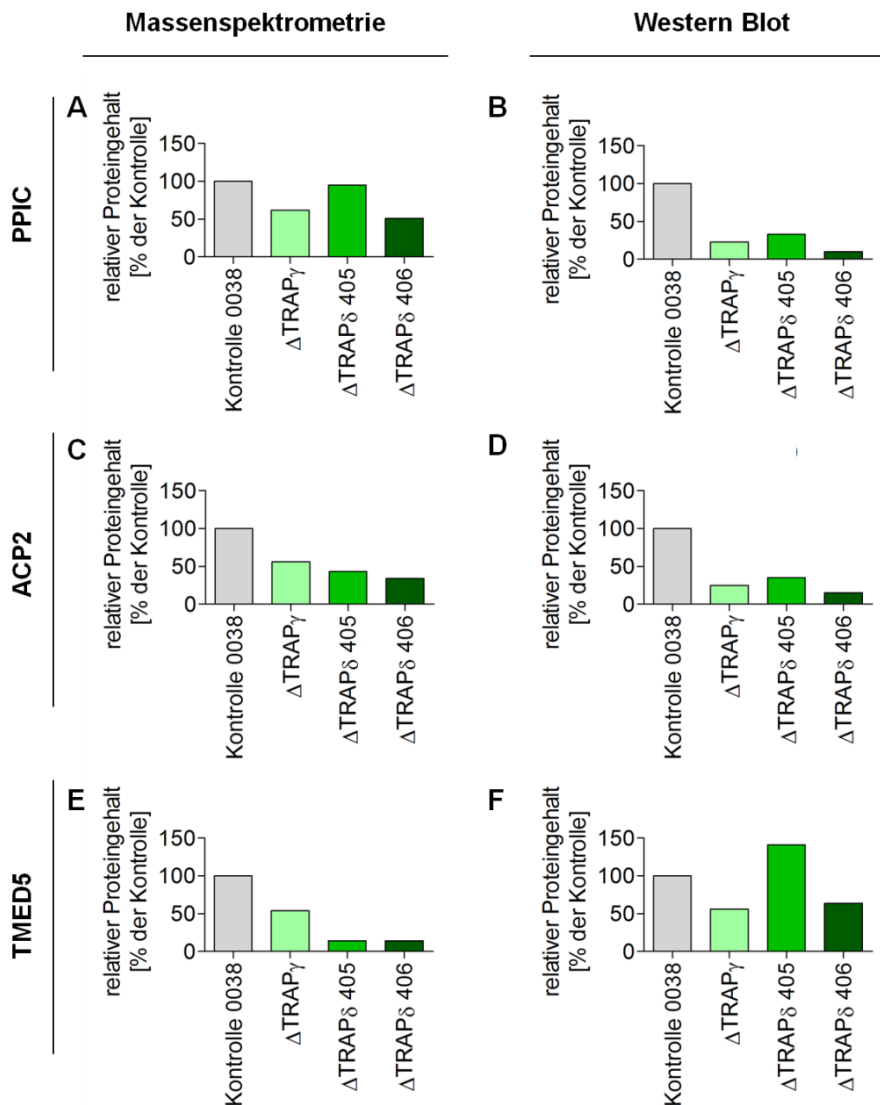


**Abbildung 60: Untersuchung des relativen Proteingehalts der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes in Fibroblasten von CDG-Patienten.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes in Fibroblasten von CDG-Patienten, die Mutationen innerhalb der TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheit aufweisen, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, C, E, G** zeigen die Ergebnisse des massenspektrometrischen Quantifizierung der jeweiligen Untereinheit des TRAP-Komplexes ( $n = 1$ ). Die Zellen wurden keiner zusätzlichen genetischen Manipulation unterzogen und das Zelllysat gemäß 2.4.5 aufbereitet.

**B, D, F, H** zeigen den Proteingehalt der jeweiligen Untereinheit des TRAP-Komplexes auf Basis der Western Blot Analyse ( $n = 1$ ). Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Überprüfung des resultierenden Proteingehalts wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine mittels *Semidy*-Blotting auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von TRAP $\alpha$ , TRAP $\beta$  und TRAP $\gamma$  erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten **A, C** veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licences/by/4.0/>).

Gleiches gilt für die nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* als TRAP-Substrate validierten Proteine PPIC, ACP2 und TMED5: In Abbildung 61 sind die Ergebnisse hinsichtlich der Untersuchung der CDG-Fibroblasten zusammengefasst. Sowohl die quantitative MS-Analyse als auch die Untersuchung auf Western Blot Basis zeigten einen stark verminderten Gehalt der genannten Proteine. Unterschiedliche Ergebnisse waren für Patient 405 bzgl. des Gehalts an PPIC und TMED5 zu verzeichnen.

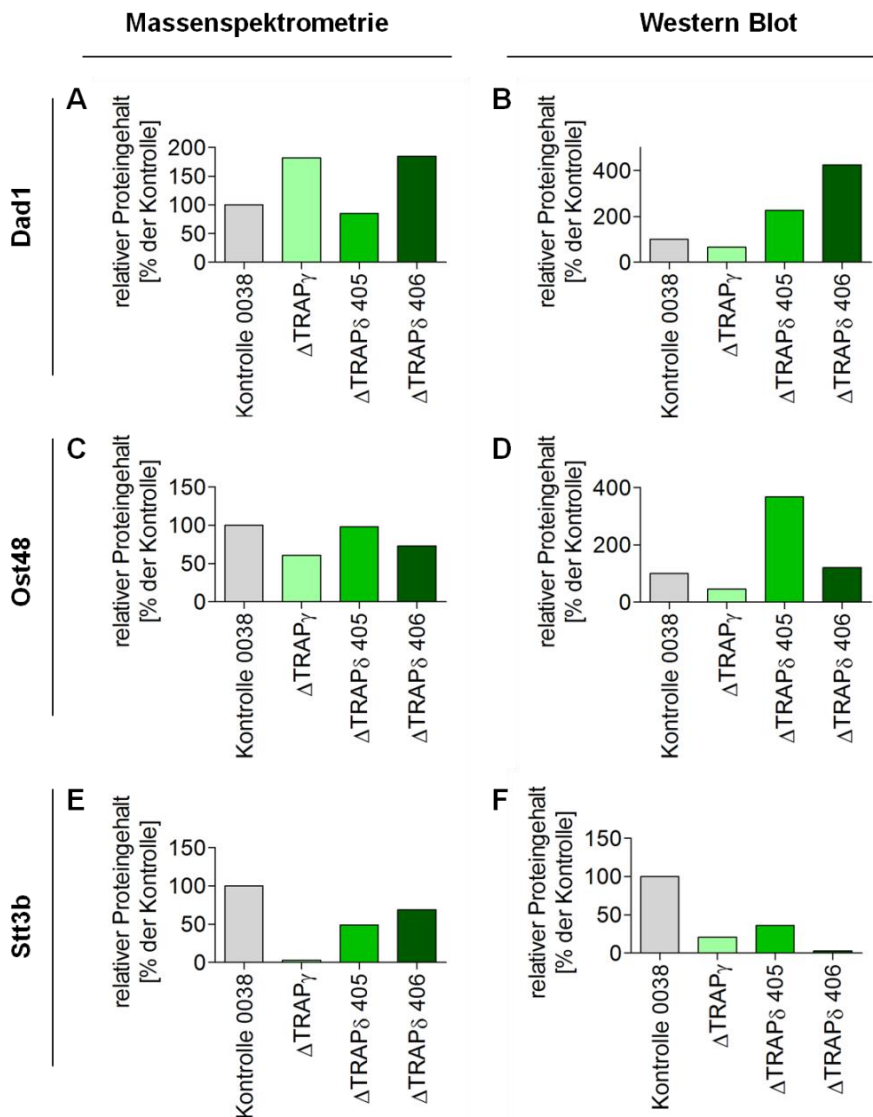


**Abbildung 61: Untersuchung des relativen Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 in Fibroblasten von CDG-Patienten.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt von PPIC, ACP2 und TMED5 in Fibroblasten von CDG-Patienten, die Mutationen innerhalb der TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheit aufweisen, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, C, E, G** zeigen die Ergebnisse des massenspektrometrischen Quantifizierung des jeweiligen Proteins ( $n = 1$ ). Die Zellen wurden keiner zusätzlichen genetischen Manipulation unterzogen und das Zelllysat gemäß 2.4.5 aufbereitet. **B, D, F, H** zeigen den jeweiligen Proteingehalt auf Basis der Western Blot Analyse ( $n = 1$ ). Nach Ernte der Zellen zum jeweils gekennzeichneten Zeitpunkt wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $15\%$ ,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (PPIC; TMED5) bzw. Tank-Blot-Verfahren (ACP2) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von PPIC, ACP2 und TMED5 erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde für PPIC ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für ACP2 und TMED5 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin und  $\alpha$ -PPIC in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -ACP2 und  $\alpha$ -TMED5 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A, C, E veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

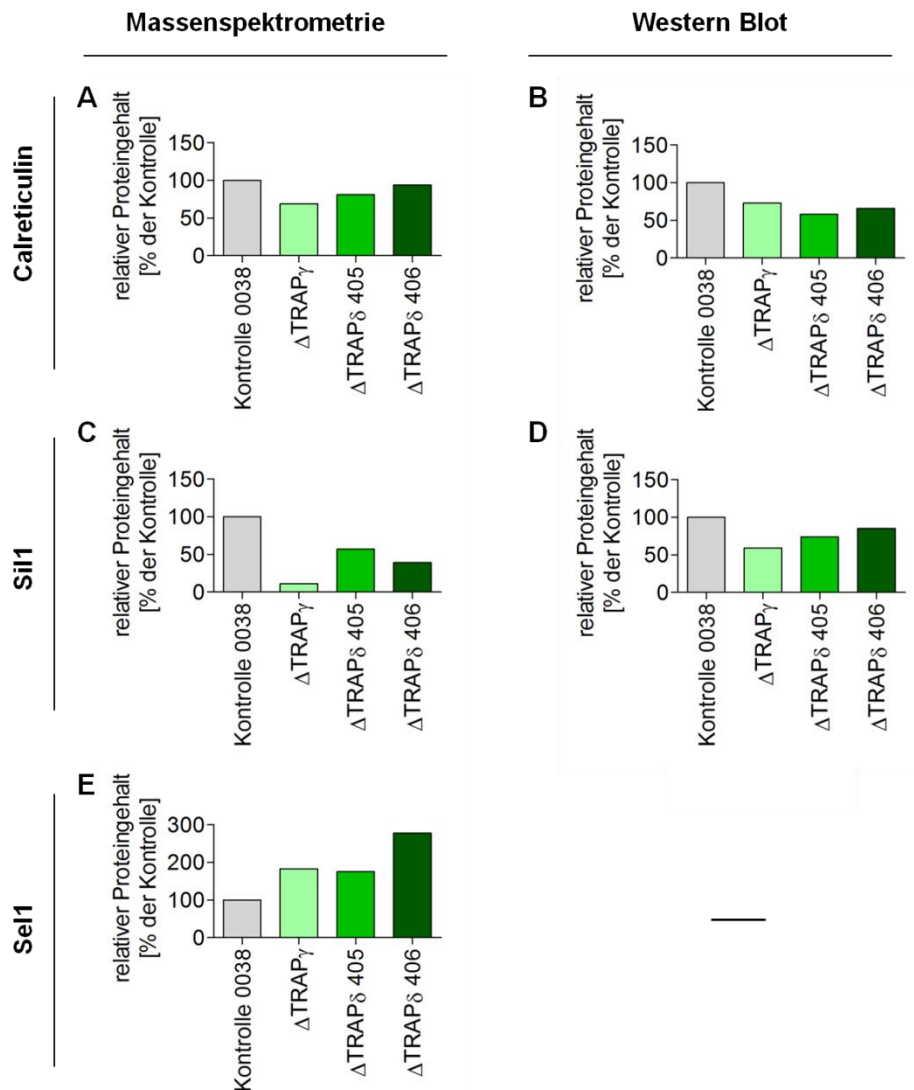
Die Ergebnisse der Untersuchung hinsichtlich des relativen Proteingehalts der drei als TRAP-Substrate validierten Untereinheiten des OST-Komplexes sind in Abbildung 62 zusammenfasst: Dabei zeigten sich im Hinblick auf Stt3b (E, F) jeweils gleichwertige Ergebnisse wie die der transient *TRAPB*-depletierten HeLa-Zellen, nämlich eine starke Verminderung des relativen Proteingehalts in den untersuchten Patientenzellen. Dies gilt sowohl für die massenspektrometrische als auch für die Western Blot basierte Analyse. Gleiches gilt in Bezug auf Ost48 (C, D), mit Ausnahme des Patienten 405. Die Unterschiede zwischen einzelnen Patienten werden stark bei der Betrachtung der Ergebnisse zu Dad1 (A, B) deutlich.

Die Verminderung des Gehalts an Dad1, der in den Untersuchungen der transient *TRAPB*-depletierten HeLa-Zellen zur Validierung von Dad1 als TRAP-Substrat führte, geht mit den CDG-Untersuchungen nicht konform. Im Gegensatz dazu wurde durch die massenspektrometrische Analyse gezeigt, dass der Gehalt an Dad1 in Proben von zwei CDG-Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle sogar stark erhöht war. Für Patient 406 wurde dieses Ergebnis auch im Western Blot bestätigt. Bezüglich der beiden anderen untersuchten Patientenproben wurden gegensätzliche Ergebnisse zwischen den massenspektrometrisch und Western Blot basierten Resultaten erfasst.



**Abbildung 62: Untersuchung des relativen Proteingehalts der OST-Komplex-Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b in Fibroblasten von CDG-Patienten.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt der OST-Komplex-Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b in Fibroblasten von CDG-Patienten, die Mutationen innerhalb der TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheit aufweisen, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. **A, C, E, G** zeigen die Ergebnisse des massenspektrometrischen Quantifizierung des jeweiligen Proteins ( $n = 1$ ). Die Zellen wurden keiner zusätzlichen genetischen Manipulation unterzogen und das Zellysate gemäß 2.4.5 aufbereitet. **B, D, F, H** zeigen den jeweiligen Proteingehalt auf Basis der Western Blot Analyse ( $n = 1$ ). Nach Ernte der Zellen wurden diese gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Dad1, Ost48 und Stt3b wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Dad1 17,5 %, Ost48 und Stt3b 12,5 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blotting (Dad1) bzw. Tank-Blot-Verfahren (Ost48, Stt3b) auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von Dad1 und Stt3b erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, der Nachweis von Ost48 erfolgte über einen passenden Antikörper aus der Maus. Als Sekundärantikörper wurde für Stt3b ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet, für Dad1 ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Letzterer wurde auch als sekundärer Antikörper zur Detektion von Ost48 genutzt. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 verdünnt,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Ost48 und  $\alpha$ -Stt3b in 5 % Magermilchlösung,  $\alpha$ -Dad1 in CrossFroxx-Puffer. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A, C, E veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



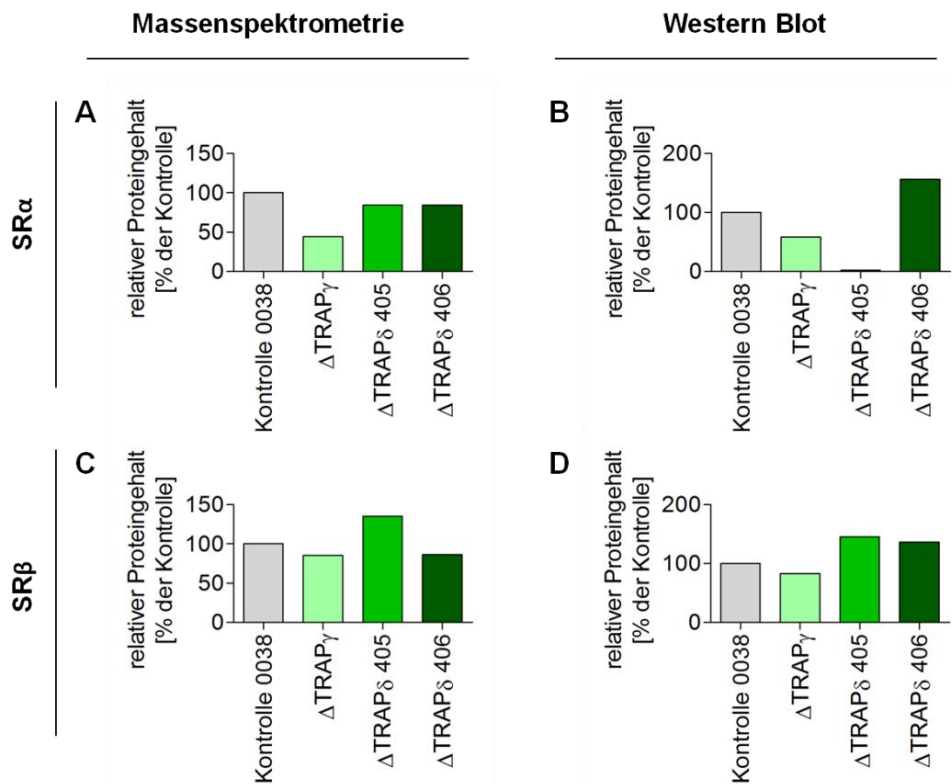
**Abbildung 63: Untersuchung des relativen Proteingehalts von Calreticulin, Sil1 und Sel1 in Fibroblasten von CDG-Patienten.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt von Calreticulin (A, B), Sil1 (C, D) und Sel1 (E) in Fibroblasten von CDG-Patienten, die Mutationen innerhalb der TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheit aufweisen, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. A, C, E zeigen die Ergebnisse der massenspektrometrischen Quantifizierung des jeweiligen Proteins (n = 1). Die Zellen wurden keiner zusätzlichen genetischen Manipulation unterzogen und das Zelllysate gemäß 2.4.5 aufbereitet. B, D zeigen den jeweiligen Proteingehalt auf Basis der Western Blot Analyse (n = 1). Nach Ernte der Zellen wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von SR $\alpha$  und SR $\beta$  wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12,5 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundäntikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primäntikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt.



Des Weiteren wurden Untersuchungen hinsichtlich der quantitativen Beeinflussung der Proteine Sil1, Calreticulin und Sel1 in TRAP-defizienten Fibroblasten von CDG-Patienten durchgeführt. Sowohl die Ergebnisse der Proteomanalyse als auch der Western Blot basierten Experimente zeigten, dass der Gehalt der ER-luminalen Proteine Sil1 und Calreticulin erniedrigt war gegenüber den Kontrollfibroblasten. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit den zuvor dargestellten Ergebnissen, welche in transient TRAP-depletierten HeLa-Zellen gewonnen wurden. Für Sel1 wurde nach transients TRAP-Depletion in HeLa Zellen zuvor eine quantitativ negative Beeinflussung beobachtet. Die Ergebnisse der chronisch TRAP-depletierten CDG-Patientenzellen zeigen gegensätzlich jedoch eine quantitative Erhöhung des Proteingehalts von Sel1. Dies betrifft das Ergebnis, welches innerhalb der Proteinanalyse sowie Proteinhäufigkeitsbestimmung nachgewiesen wurde, auf Western Blot Ebene wurden an dieser Stelle keine Daten zum Vergleich erhoben.

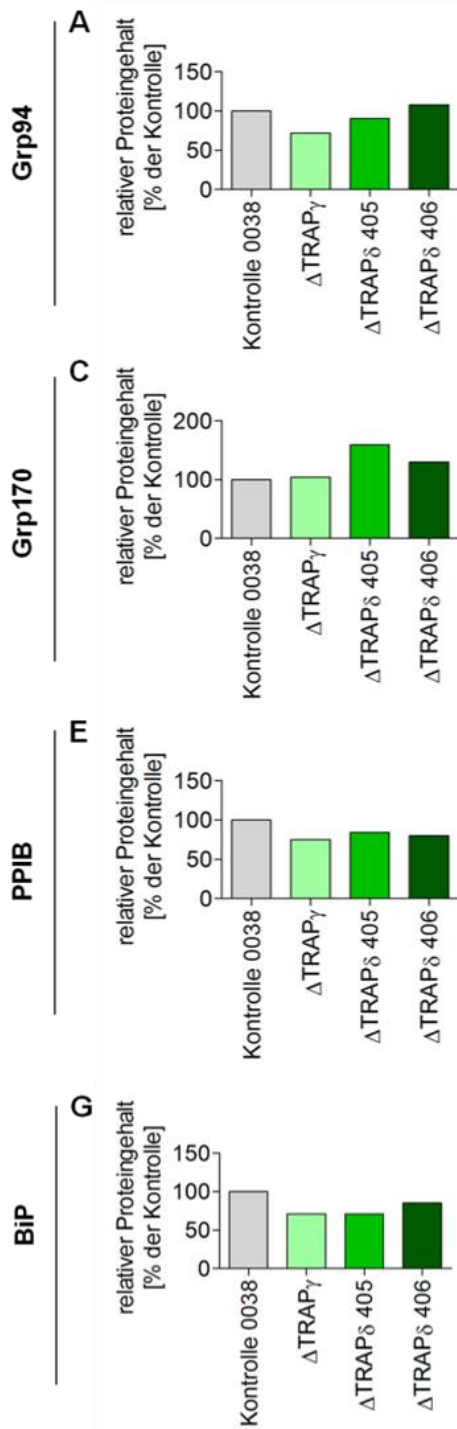
Darüber hinaus wurde auch überprüft, ob der Gehalt der Untereinheiten des SRP-Rezeptors gleichsam zu den Ergebnissen nach siRNA vermittelter TRAP Depletion ebenfalls quantitativ erhöht war. Aus Abbildung 64 wird ersichtlich, dass die positive Beeinflussung der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des SRP-Rezeptors lediglich auf nach Western Blot Analyse und auch nur für Patient 406 beobachtet wurde. Generell zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der massenspektrometrischen und der Western Blot basierten Analyse sowie einem sehr inhomogenen Bild bzgl. der generellen quantitativen Beeinflussung des SRP-Rezeptors aufgrund des Fehlen des TRAP-Komplexes.



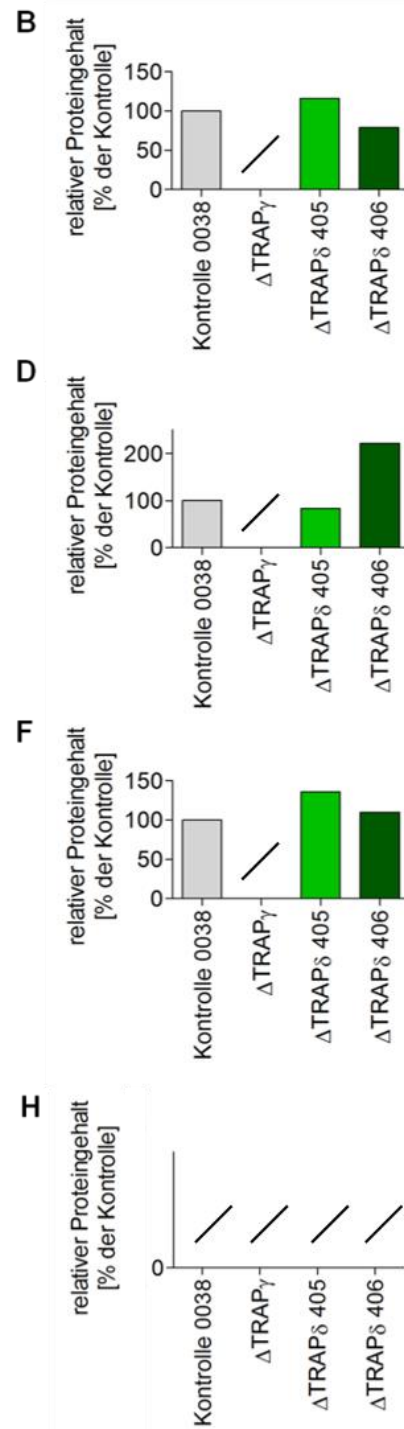
**Abbildung 64: Untersuchung des relativen Proteingehalts  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors in Fibroblasten von CDG-Patienten.**

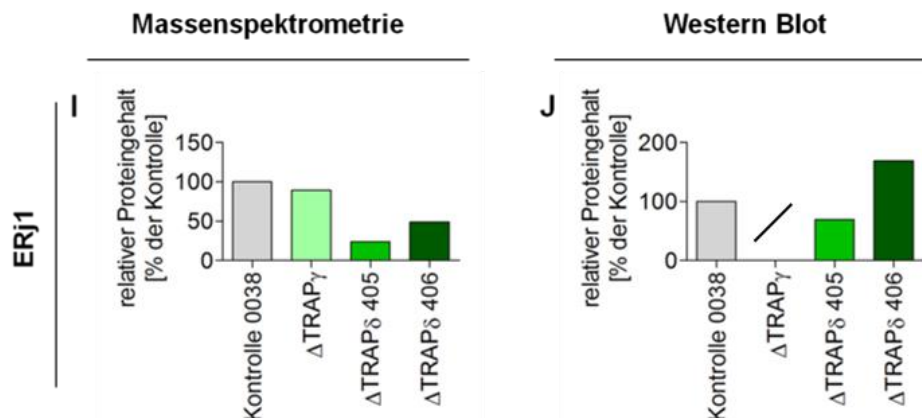
Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt  $\alpha$ - (A, B) und  $\beta$ -Untereinheit (C, D) des SRP-Rezeptors in Fibroblasten von CDG-Patienten, die Mutationen innerhalb der TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheit aufweisen, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. A, C zeigen die Ergebnisse des massenspektrometrischen Quantifizierung des jeweiligen Proteins ( $n = 1$ ). Die Zellen wurden keiner zusätzlichen genetischen Manipulation unterzogen und das Zelllysate gemäß 2.4.5 aufbereitet. B, D zeigen den jeweiligen Proteingehalt auf Basis der Western Blot Analyse ( $n = 1$ ). Nach Ernte der Zellen wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von SR $\alpha$  und SR $\beta$  wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt ( $12,5\%$ ,  $4 \cdot 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in  $5\%$  Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich  $100\%$  gesetzt.

Massenspektrometrie



Western Blot





**Abbildung 65: Untersuchung des relativen Proteingehalts von Grp94, Grp170, PPIB, BiP und ERj1 in Fibroblasten von CDG-Patienten.**

Vergleichend dargestellt ist der Proteingehalt von Grp94 (A, B), Grp170 (C, D), PPIB (D, E), BiP (F, G) und ERj1 (H, I) in Fibroblasten von CDG-Patienten, die Mutationen innerhalb der TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheit aufweisen, quantifiziert mittels markierungsfreier Proteomanalyse und auf Western Blot Ebene. A, C, E, G, I zeigen die Ergebnisse des massenspektrometrischen Quantifizierung des jeweiligen Proteins (n = 1). Die Zellen wurden keiner zusätzlichen genetischen Manipulation unterzogen und das Zelllysät gemäß 2.4.5 aufbereitet. B, D, F, H, J zeigen den jeweiligen Proteingehalt auf Basis der Western Blot Analyse (n = 1). Nach Ernte der Zellen wurden diese gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Bestimmung des Proteingehalts von Grp94, Grp170, PPIB, BiP und Erj1 wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12,5 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über das Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5 verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper detektiert. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. (Daten A, C, E veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abbildung 65 fasst die Ergebnisse der Analyse zu Grp94 (A, B), Grp170 (C, D), PPIB (E, F), BiP (G, H) und ERj1 (I, J) zusammen. Hinsichtlich der CDG-Patientenzellen, mit Mutation in der  $\gamma$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes, erfolgte aufgrund mangelndem Probenmaterial keine semi-quantitative Analyse mittels Western Blot. Im Mittel konnte keine Beeinflussung der Proteine aufgrund der chronischen Depletion des TRAP-Komplexes der CDG-Fibroblasten nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchung transient *TRAPB*-depletierter Zellen. Des Weiteren entsprachen die Resultate der quantitativen Proteomanalyse denen der Western Blot Daten, in Bezug auf CDG-Patient 405 und 406.

Tabelle 25 fasst die gesamten Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen aus Kapitel 3.2 sowie 3.4.2 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zusammen.

Tabelle 25: Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* erniedrigt sind (I)**

Protein			TRAP Komplex			
			TRAP $\alpha$	TRAP $\beta$	TRAP $\gamma$	TRAP $\delta$
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	79 $\pm$ 6	8 $\pm$ 1	-	-
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	115 $\pm$ 7	9 $\pm$ 1	-	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	Massenspektrometrie		42	35	21	29
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	38 $\pm$ 21	14 $\pm$ 8	17 $\pm$ 6	-
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	41 $\pm$ 22	16 $\pm$ 11	41 $\pm$ 14	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	Massenspektrometrie		50	-	80	88
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	42 $\pm$ 21	59 $\pm$ 18	111 $\pm$ 27	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	32 $\pm$ 12	45 $\pm$ 5	-	-
Protein-Gehalt in TRAP $\gamma$ defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		13	0	0	19
	Western Blot		16	11	0	12
Protein-Gehalt in TRAP $\delta$ defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		51	0	32	0
	Western Blot		38	26	19	0
Protein-Gehalt in TRAP $\delta$ defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		33	0	0	1
	Western Blot		42	13	9	0

Tabelle 25 (Fortsetzung): Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* erniedrigt sind (II)**

			TRAP Substrate			
Protein			ACP2	EPDR1	PPIC	TMED5
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	75 ± 5	31 ± 2	101 ± 13	62 ± 4
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	111 ± 5	84 ± 5	100 ± 12	100 ± 7
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		80	41	68	64
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	71 ± 27	-	57 ± 11	34 ± 12
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	76 ± 19	-	81 ± 36	97 ± 23
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		68	45	61	56
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	57 ± 21	-	33 ± 24	50 ± 22
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	20 ± 12	-	62 ± 38	81 ± 39
Protein-Gehalt in TRAP $\gamma$ defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		56	-	62	54
	Western Blot		25	-	23	56
Protein-Gehalt in TRAP $\delta$ defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		43	-	95	14
	Western Blot		35	-	33	141
Protein-Gehalt in TRAP $\delta$ defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		34	-	51	14
	Western Blot		15	-	10	64

Tabelle 25 (Fortsetzung): Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* erniedrigt sind (III)**

			Komponenten des OST-Komplex		
Protein			Dad1	Stt3b	Ost48
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	-	-	-
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	-	-	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		66	72	81
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	73 ± 45	70 ± 33	76 ± 12
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	66 ± 34	62 ± 30	64 ± 20
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		98	91	74
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	64 ± 18	55 ± 22	59 ± 12
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	16 ± 15	80 ± 36	65 ± 26
Protein-Gehalt in <i>TRAPγ</i> defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		182	3	61
	Western Blot		65	21	45
Protein-Gehalt in <i>TRAPδ</i> defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		85	49	98
	Western Blot		226	36	368
Protein-Gehalt in <i>TRAPδ</i> defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		185	69	73
	Western Blot		424	3	121

Tabelle 25 (Fortsetzung): Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* erniedrigt sind (IV)**

			weitere ER-luminale Proteine		
Protein			Si1	Calreticulin	Se1
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	-	-	-
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	-	-	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		81	89	75
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	58 ± 32	84 ± 25	51 ± 12
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	74 ± 21	72 ± 9	82 ± 21
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		24	82	27
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	26 ± 28	35 ± 22	17 ± 8
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	86 ± 50	114 ± 48	57 ± 29
Protein-Gehalt in <i>TRAPγ</i> defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		11	69	183
	Western Blot		59	73	-
Protein-Gehalt in <i>TRAPδ</i> defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		57	81	175
	Western Blot		74	58	-
Protein-Gehalt in <i>TRAPδ</i> defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		39	94	278
	Western Blot		85	66	-



Tabelle 25 (Fortsetzung): Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* erhöht sind**

			Untereinheiten des SRP-Rezeptors	
Protein			SR $\alpha$	SR $\beta$
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	129 $\pm$ 12	89 $\pm$ 9
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	123 $\pm$ 9	105 $\pm$ 5
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	Massenspektrometrie		121	132
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	136 $\pm$ 34	122 $\pm$ 35
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	130 $\pm$ 40	158 $\pm$ 40
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	Massenspektrometrie		-	165
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	133 $\pm$ 28	205 $\pm$ 53
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle $\pm$ SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	58 $\pm$ 29	88 $\pm$ 18
Protein-Gehalt in TRAP $\gamma$ defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		67	85
	Western Blot		58	83
Protein-Gehalt in TRAP $\delta$ defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		126	135
	Western Blot		2	145
Protein-Gehalt in TRAP $\delta$ defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		126	86
	Western Blot		156	136

Tabelle 25 (Fortsetzung): Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* unbeeinflusst sind (I)**

			UPR-aktive Proteine		
Protein			BiP	Grp170	Grp94
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	-	-	-
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	-	-	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		95	102	85
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	123 ± 49	113 ± 59	89 ± 21
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	148 ± 68	138 ± 23	88 ± 23
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		-	87	-
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	88 ± 17	70 ± 31	54 ± 24
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	118 ± 50	130 ± 63	61 ± 11
Protein-Gehalt in <i>TRAPγ</i> defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		71	104	72
	Western Blot		-	-	-
Protein-Gehalt in <i>TRAPδ</i> defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		71	159	90
	Western Blot		-	83	116
Protein-Gehalt in <i>TRAPδ</i> defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		85	130	108
	Western Blot		-	222	79

Tabelle 25 (Fortsetzung): Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente

**Proteine, die nach Depletion von *TRAPB* unbeeinflusst sind (II)**

			weitere ER-Proteine	
Protein			ERj1	PPIB
mRNA-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	qRT-PCR	<i>TRAPB</i> siRNA #2	-	-
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	-	-
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPB</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		109	90
	Western Blot	<i>TRAPB</i> siRNA #2	94 ± 14	86 ± 11
		<i>TRAPB</i> siRNA #3	130 ± 45	93 ± 11
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>SEC61A1</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Massenspektrometrie		22	93
	Western Blot	<i>SEC61A1</i> siRNA #5	21 ± 19	64 ± 17
Protein-Gehalt nach Depletion von <i>TRAPA</i> [% der Kontrolle ± SEM]	Western Blot	<i>TRAPA</i> siRNA #3	121 ± 54	81 ± 34
Protein-Gehalt in TRAPγ defizienten Patientenzellen [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		89	75
	Western Blot		-	-
Protein-Gehalt in TRAPδ defizienten Patientenzellen (405) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		24	84
	Western Blot		69	136
Protein-Gehalt in TRAPδ defizienten Patientenzellen (406) [% der Kontrolle]	Massenspektrometrie		49	80
	Western Blot		169	110

Zusammenfassend bestätigen die meisten Ergebnisse der Western Blot Analysen die Resultate der Proteomuntersuchung und folgender Proteinmengenbestimmung der chronisch TRAP-defizienten CDG-Patientenzellen. Im Vergleich zu den Ergebnissen, welche zuvor nach transienter TRAP-Depletion gewonnen wurden, sind gleichartige Tendenzen klar nachweisbar.

### 3.5. Übersicht weiterer Ergebnisse der Proteomanalysen ohne zusätzliche Validierungsexperimente

Die Gesamtheit der durch die Proteomanalysen gewonnenen Daten wurde im ProteomeXchange (PX) Consortium (Deutsch, et al., 2017) hinterlegt (Dataset PXD008178). Zusätzlich zu den Modellsubstraten, welche zur Validierung der substratspezifischen Eigenschaften des TRAP-Komplexes verwendet wurden, gibt es noch eine Reihe weiterer Proteine, die Funktionen in der Proteinhomöostase einer humanen Zelle erfüllen. In Tabelle 26 sind einige dieser Proteine mit dem jeweiligen Proteingehalt entweder nach siRNA-basierter Depletion oder in TRAP-defizienten CDG-Patientenfibroblasten aufgelistet.

Tabelle 26: Übersicht weiterer Ergebnisse der Proteomanalysen ohne zusätzliche Validierungsexperimente

	Gen	$\Delta$ TRAPB	$\Delta$ SEC61A1	CDG
				359 ( $\gamma$ ) / 405 ( $\delta$ ) / 406 ( $\delta$ )
Relativer Proteingehalt [% der Kontrolle]				
<b>Translokase- komponenten des Endoplasmatischen Retikulums</b>	<i>SEC61A1</i>	99%	17%	90% / 142% / 103%
	<i>SEC61B</i>	115%	35%	148% / 196% / 148%
	<i>SEC61G</i>	95%	46%	105% / 106% / 99%
	<i>SEC62</i>	95%	90%	134% / 74% / 138%
	<i>SEC63</i>	104%	109%	100% / 126 % / 103%
	<i>SND2</i>	-	-	- / - / -
	<i>WRB</i>	-	-	- / - / -
	<i>CAML</i>	121%	115%	35% / 0% / 43%
	<i>SRP14</i>	107%	106%	116% / 183% / 146%
	<i>SRP19</i>	98%	124%	82% / 122% / 74%
	<i>SRP54</i>	96%	131%	113% / 85% / 81%
	<i>SRP68</i>	106%	127%	77% / 83% / 85%
	<i>SRP72</i>	99%	108%	65 % / 64% / 66%
	<i>SRP9</i>	101%	98%	184% / 137% / 144%
	<i>TRC /GET4</i>	89%	147%	32% / 0% / 35%
<i>ASNA1</i>	84%		122% / 85% / 130%	

<b>Untereinheiten des OST-Komplexes</b>	<i>RPN1</i>	92%	99%	88% / 85% / 90%
	<i>RPN2</i>	96%	85%	109% / 118% / 78%
	<i>STT3A</i>	95%	88%	104% / 219% / 121%
	<i>KRTCAP2</i>	-	-	139% / 72% / 0%
	<i>MLEC</i>	105%	63%	89% / 65% / 106%
	<i>OSTC</i>	90%	161%	101% / 52% / 123%
	<i>TUSC3</i>	64%	-	- / - / -
	<i>TMEM258</i>	-	-	- / - / -
	<i>MAGT3</i>	-	-	- / - / -
	<i>OST4</i>	-	-	- / - / -
<b>Ca<sup>2+</sup>-Homöostase</b>	<i>STIM1</i>	105%	73%	162% / 187% / 112%
	<i>ORAI1</i>	-	-	- / - / -
	<i>SERCA; ATP2A2</i>	98%	112%	147% / 124% / 189%
<b>Cytosolische Chaperone</b>	<i>HSP90AB1</i>	101%	116%	139% / 118% / 140%
	<i>HSBP1</i>	91%	187%	83% / 154% / 136%
	<i>HSPA1A</i>	109%	152%	114% / 71% / 103%
	<i>HSPB8</i>	91%	145%	0% / 25% / 163%
	<i>AHSA1</i>	93%	131%	94% / 59% / 55%
	<i>HSPH1</i>	98%	123%	67% / 85% / 67%
	<i>BAG3</i>	104%	120%	60% / 59% / 101%
	<i>BAG1</i>	106%	190%	56% / 106% / 0%
<b>E3-Ligasen</b>	<i>HERC2</i>	98%	125%	- / - / -
	<i>TRIM4</i>	112%	-	127% / 1% / 203%
	<i>HLTF</i>	127%	132%	- / - / -
	<i>MID1</i>	143%	212%	125% / 16% / 125%
	<i>NEDD4</i>	-	380%	489% / 243% / 316%
	<i>UBR1</i>	88%	216%	160% / 140% / 264%
	<i>MYCBP2</i>	108%	252%	85% / 260% / 0%
	<i>ZNRF2</i>	91%	177%	- / - / -
	<i>UBR7</i>	114%	143%	- / - / -
	<i>UFL1</i>	102%	122%	36% / 95% / 78%
	<i>UBE2O</i>	110%	160%	72% / 196% / 141%
	<i>UBE4A</i>	86%	159%	159% / 35% / 0%

<b>Mitochondriale Transportkomponenten</b>	<i>TOM1</i>	74%	109%	33% / 50% / 53%
	<i>TOM1L1</i>	106%	83%	- / - / -
	<i>TOM1L2</i>	99%	78%	101% / 47% / 92%
	<i>TOMM20</i>	104%	111%	321% / 113% / 236%
	<i>TOMM22</i>	120%	119%	81% / 106% / 76%
	<i>TOMM34</i>	104%	93%	93% / 176% / 194%
	<i>TOMM40</i>	115%	114%	150% / 225% / 90%
	<i>TOMM5</i>	109%	112%	162% / 0% / 33%
	<i>TOMM6</i>	94%	338%	- / - / -
	<i>TOMM7</i>	105%	193%	0% / 258% / 17%
	<i>TOMM70A</i>	101%	110%	46% / 76% / 65%
	<i>TIMM10</i>	93%	91%	82% / 171% / 156%
	<i>TIMM10B</i>	111%	-	- / - / -
	<i>TIMM13</i>	101%	76%	84% / 34% / 25%
	<i>TIMM17A</i>	107%	-	- / - / -
	<i>TIMM21</i>	95%	116%	- / - / -
	<i>TIMM22</i>	87%	113%	- / - / -
	<i>TIMM23; TIMM23B</i>	108%	148%	- / - / -
	<i>TIMM44</i>	96%	113%	75% / 103% / 70%
	<i>TIMM50</i>	113%	101%	87% / 61% / 121%
<i>TIMM8A</i>	99%	77%	0% / 63% / 77%	
<i>TIMM8B</i>	104%	-	81% / 63% / 180%	
<i>TIMM9</i>	98%	108%	107% / 69% / 110%	

### **3.6. Validierung der Eigenschaften identifizierter TRAP-Substrate**

Mittels markierungsfreier Proteomanalyse konnten nach Reduktion der Genexpression mittels RNAi solche Proteine identifiziert werden, welche in direkter Abhängigkeit zum TRAP-Komplex stehen, um vollständig und korrekt im ER-Lumen prozessiert zu werden (3.2). Diese TRAP-Kandidaten wurden weitergehend einer bioinformatischen Proteinmengenbestimmung unterzogen, um gemeinsame Eigenschaften der Proteine dieser Gruppe zu erfassen. Es zeigte sich, dass die Signalpeptide der TRAP-Substrate einen erhöhten Gehalt an helixbrechenden Aminosäuren (Glycin und Prolin) sowie eine verminderte Hydrophobizität aufweisen. Im folgenden Kapitel werden diese möglicherweise determinierenden Eigenschaften der TRAP-Kandidaten weitergehend untersucht.

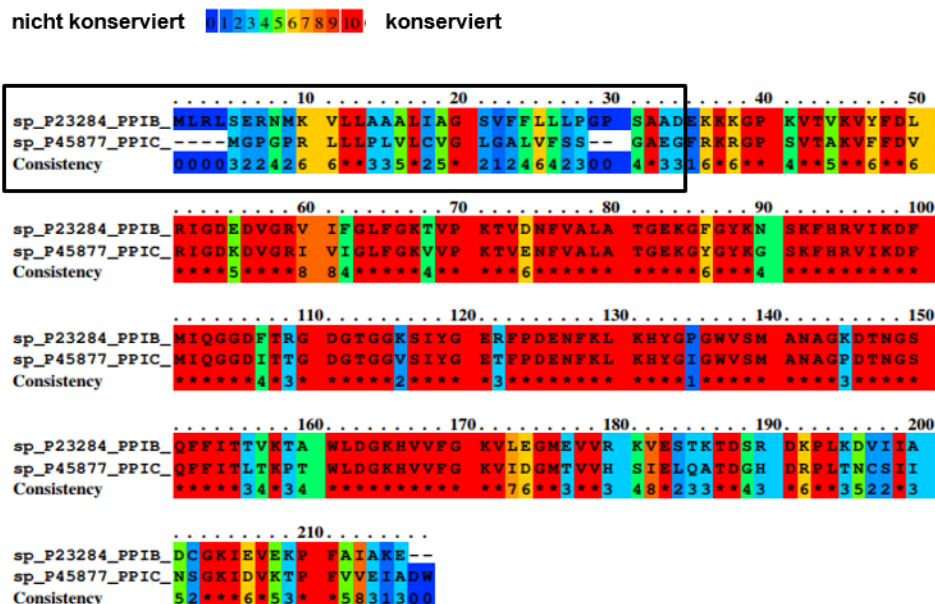
Zu diesem Zweck wurden mehrere identifizierte und validierte TRAP-Substrate sowie eine als nicht TRAP-abhängig nachgewiesene Kontrolle ausgewählt. Es erfolgte die Analyse der jeweiligen physikochemischen Eigenschaften *in silico* sowie die Spezifizierung der Transport- und Glykosylierungseigenschaften der Modellpolypeptide in genetisch manipulierten Zellen.

#### **3.6.1. Die Paraloge PPIB und PPIC**

Die beiden peptidyl-propyl-cis/trans-Isomerasen PPIC und PPIB wurden zuvor auf endogener Basis im Hinblick auf TRAP-Abhängigkeit untersucht. PPIC wurde dabei als echtes TRAP-Substrat validiert (3.2.2.1.), wohingegen der Vorläufer von PPIB unbeeinflusst von der Depletion des TRAP-Komplexes in Bezug auf den ER-Import blieb (3.2.4).

##### **3.6.1.1. Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften von PPIB und PPIC**

Abbildung 66 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenz von PPIB und PPIC. Es wird deutlich, dass beide Sequenzen sehr ähnlich sind. Im reifen Teil sind diese zu 72 % identisch und weitere 13 % der Aminosäuren sind vergleichbar. Auffallend sind die Unterschiede beider Sequenzen innerhalb der Signalpeptide.

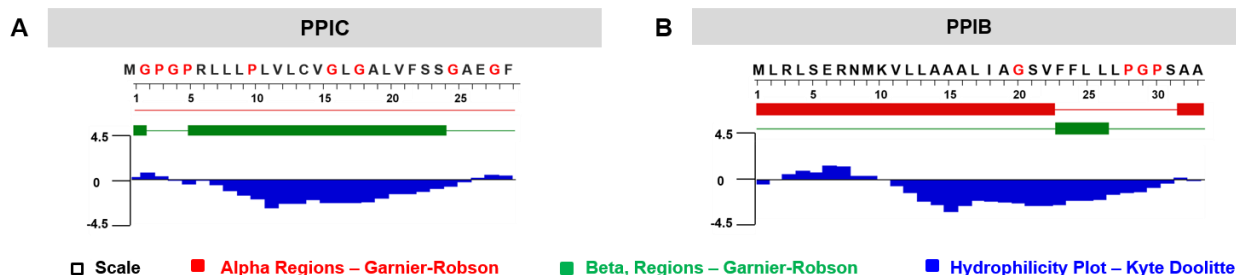


**Abbildung 66: Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen Paraloge PPIB und PPIC**

Dargestellt ist der Aminosäuresequenzvergleich der beiden peptidyl-propyl-cis/trans-Isomerasen PPIC und PPIB. Der Vergleich wurde mittels „Standard Protein Blast“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) durchgeführt. Beide Paraloge zeigen eine Identität von 72 % sowie weitere 13 % an ähnlichen Aminosäuren im reifen Teil. Schwarz umrandet ist die Aminosäuresequenz der Signalpeptide.

Die strukturellen Eigenschaften der Signalpeptide von PPIB und PPIC werden in Abbildung 67 verglichen. Darin sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche laut Protean Vorhersage-Tool alpha-helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen (grün) (Garnier, Osguthorpe, & Robson, 1978) ausbilden. Das Signalpeptid von PPIC bildet demnach keine alpha-Helix aus, wohingegen das Signalpeptid von PPIB vorrangig durch diese Sekundärstruktur gekennzeichnet ist. Zudem ist in blau das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) für beide Signalpeptide dargestellt. Beide Hydrophobizitätsscores sind nahezu gleich, liegt dieser für das Signalpeptid von PPIB bei 0,961, für PPIC bei 1,063. Deutliche Unterschiede sind bei der Betrachtung des Anteils der helixbrechenden Aminosäuren, Glycin und Prolin (GP) vorzufinden. Der GP-Anteil des Signalpeptids von PPIC liegt bei 32 %, wohingegen der GP-Anteil von PPIB lediglich 12 % aufweist.





**Abbildung 67: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der Signalpeptide von PPIC und PPIB**

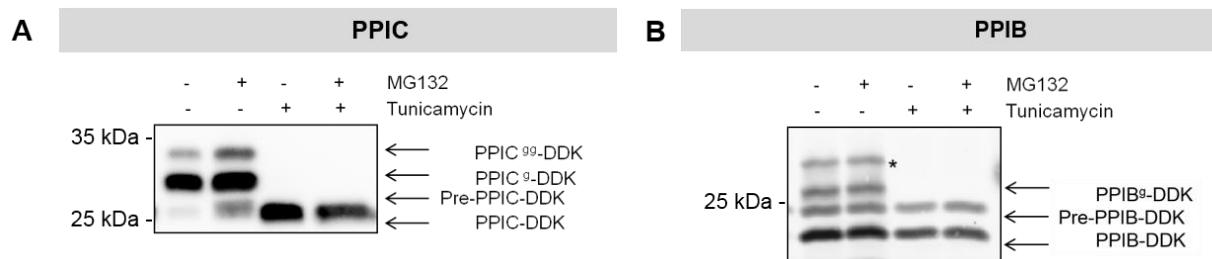
Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der beiden Paraloge PPIC (A) und PPIB (B). Helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) sind rot markiert. Der GP-Anteil des Signalpeptids von PPIC liegt bei 32 %, der von PPIB bei 12 %. Darunter sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche laut Protean Vorhersage-Tool (DNASTAR / Lasergene 12) alpha-helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen ausbilden. In blau ist das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle gezeigt.

### 3.6.1.2. Charakterisierung einzelner Prozessierungsstufen nach Expression plasmidkodierter Modellsubstrate

Es erfolgte die Untersuchung, ob die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Paraloge PPIB und PPIC für das differente Verhalten in Abwesenheit bzw. nach Verminderung des TRAP-Komplexes verantwortlich sind. Dazu wurde zunächst überprüft, ob sich die Ergebnisse, die bisher auf endogener Ebene evaluiert wurden, mit denen des plasmidgetriebenen Transports (2.4.6) der Modell-Polypeptide in das ER-Lumen decken. Für letzteren wurden Plasmide kodierend für die cDNA von PPIB bzw. PPIC jeweils mit C-terminalem Myc-DDK-Tag kommerziell erworben.

Da die Beurteilung der Transport- und Glykosylierungseigenschaften mittels densitometrischer Untersuchung auf Western Blot Basis realisiert wird, wurde zunächst eine Charakterisierung der einzelnen plasmidkodierten Proteinbanden durchgeführt (2.4.6.2):

HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA kodierend für die Sequenz eines Modellsubstrats transfiziert. Zur Inhibition der N-Glykosylierung wurden die Zellen zusätzlich 2 h nach der Plasmid-Transfektion mit Tunicamycin manipuliert. Zur Hemmung der Degradation des Vorläuferpolypeptids und dessen Akkumulation im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt (2.4.6.1). Nach 25-stündiger Expression der cDNA erfolgte die Zellernte und Aufbereitung des Zelllysats zur Western Blot Analyse. Das Ergebnis zur Charakterisierung der einzelnen Prozessierungsstufen von PPIB und PPIC ist in Abbildung 68 dargestellt. Beispielhaft für PPIC (A) war somit die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-PPIC-DDK), importiertem PPIC nach Signalsequenzabspaltung (PPIC-DDK) und den beiden glykosylierten Formen (PPIC<sup>9</sup>-DDK und PPIC<sup>99</sup>-DDK) möglich.



**Abbildung 68: Charakterisierung der Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufer PPIB und PPIC.**

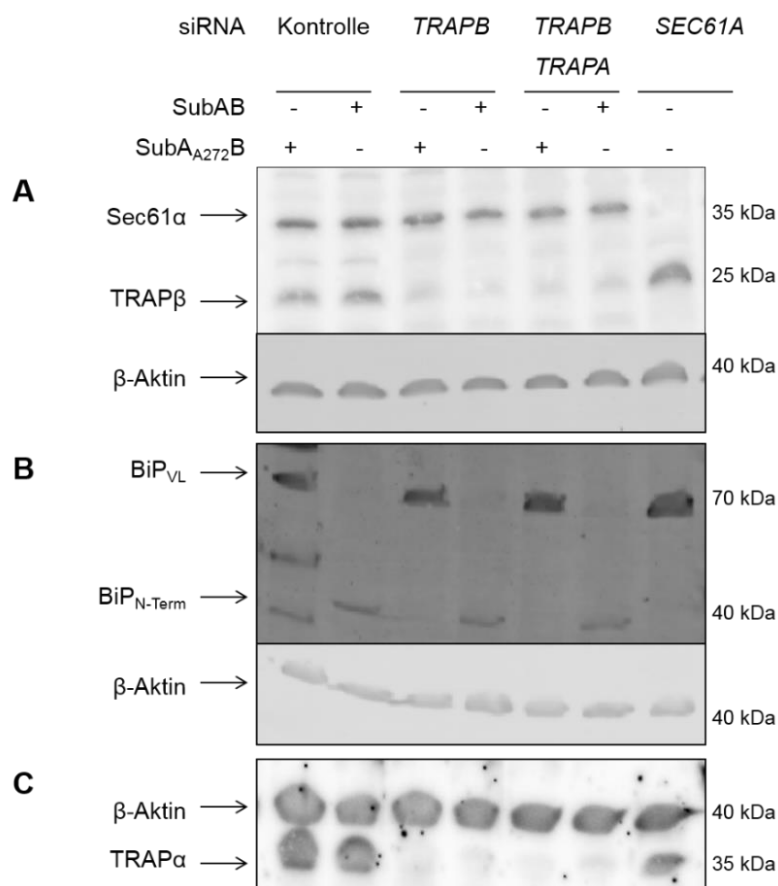
Unterschiedliche Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modellsubstrate PPIC (A) und PPIB (B) wurden charakterisiert. Somit ist die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-PPIC-DDK / Pre-PPIB-DDK), importiertem Polypeptid nach Signalsequenzabspaltung (PPIC-DDK / PPIB-DDK) und den glykosylierten Formen (PPIC<sup>9</sup>-DDK, PPIC<sup>99</sup>-DDK / PPIB<sup>9</sup>-DDK) möglich. HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Hemmung der N-Glykosylierung wurden die Zellen zusätzlich 2 h nach der Plasmid-Transfektion mit Tunicamycin manipuliert. Zur Akkumulation des Vorläuferpolypeptids im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt. Nach 25-stündiger Expression des cDNA erfolgte die Zellernte und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Varianten von PPIB und PPIC mit Myc-DDK-Tag erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 3.6.1.3. Analyse der Translokation der plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufer PPIB und PPIC nach Depletion von Translokasekomponenten

Inwiefern ein Defekt beim ER-Import oder etwa in Bezug auf die Glykosylierung der Polypeptide vorliegt, wurde in intakten HeLa-Zellen mittels Transportassay untersucht (2.4.6). Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen ausgesät und *SEC61A1*, *TRAPB* oder *TRAPB* und *TRAPA* durch RNA-Interferenz depletiert. Die Überprüfung der Depletionseffizienz mittels Western Blot Analyse ist in Abbildung 69 dargestellt. Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen mit einem Expressionsplasmid, kodierend für die cDNA von PPIB bzw. PPIC mit Myc-DDK-Tag. Durch Applikation des SubtilaseAB-Toxins erfolgte die Spaltung des ER-luminalen Chaperons BiP. Als Negativkontrolle dazu wurde die inaktive Form des SubtilaseAB-Toxins SubA<sub>A272</sub>B eingesetzt (2.4.4.2). In Abbildung 70 sind die Ergebnisse von je drei biologischen Replikaten zur Untersuchung des Prozessierungsverhaltens von PPIB und PPIC nach Depletion verschiedener Translokasekomponenten zusammengefasst. Bei Betrachtung der Verteilung des Anteils einzelner Prozessierungsstufen fällt auf, dass nach der Toxin-vermittelten Spaltung von BiP weniger reifes PPIC nachweisbar war, was für einen Transportdefekt von PPIC spricht. Die Abnahme der Translokationseffizienz verstärkte sich durch die zusätzliche Depletion von *TRAPB* und *TRAPA* und kommt dem Effekt nach Genexpressionsminderung von *SEC61A1* gleich.

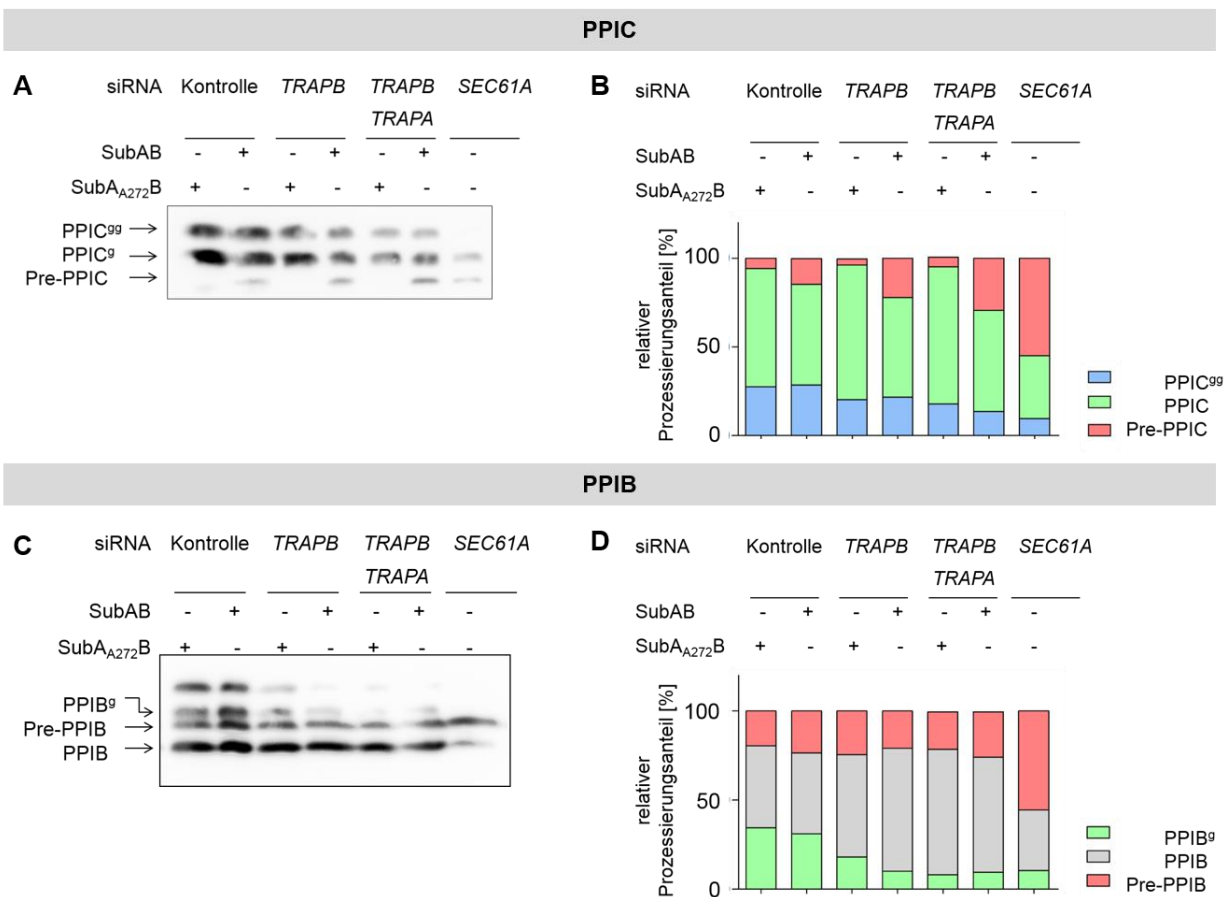
In Bezug auf PPIB ist lediglich eine ineffiziente Glykosylierung nach Depletion von *TRAPB* und zusätzlichen Translokasekomponenten nachweisbar. Ein Transportdefekt wurde jedoch nur nach Depletion von *SEC61A1* gezeigt.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen zu beiden Proteinen PPIC und PPIB auf endogener Basis nach der Depletion des TRAP-Komplexes.



**Abbildung 69: Analyse der Depletionseffizienz verschiedener Translokasekomponenten bei gleichzeitiger Überexpression plasmidkodierter Polypeptide**

Zur Analyse der Translokation plasmidtriebener Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten wurde mittels Western Blot die Depletionseffizienz von **A** Sec61α & TRAPβ, **B** BiP und **C** TRAPα überprüft. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Kontroll- (20 nM), *TRAPB*-UTR (10 nM), *TRAPA* (20 nM) oder *SEC61A1*-UTR (20 nM) siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h manipuliert. Nach 72 h erfolgte die Plasmidtransfektion. 9 h vor Ernte wurden die Zellen mit dem Toxin Subtilase AB zur Spaltung des Chaperons BiP oder seiner inaktiven Form SubA<sub>A272</sub>B als Kontrolle versetzt. Eine Stunde später wurde der Proteasominhibitor MG132 zu allen Proben hinzugegeben. Zum Zeitpunkt 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von Sec61α, TRAPβ, BiP und TRAPα erfolgte über einen entsprechenden Antikörper aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD (Sec61α, TRAPβ und TRAPα) oder an Cy5 (BiP) verwendet. β-Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti-β-Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt.



### Abbildung 70: Analyse der Translokation plasmidgetriebener Polypeptidvorläufer von PPIB und PPIC nach Depletion von Translokasekomponenten

Gemäß 2.4.6 wurde die Translokation und Prozessierung der plasmidgetriebener Model-Substrate PPIC (**A, B**) und PPIB (**C, D**) untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Kontroll- (20 nM), *TRAPB*-UTR (10 nM), *TRAPA* (20 nM) oder *SEC61A1*-UTR (20 nM) siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h manipuliert. Nach 72 h erfolgte die Plasmidtransfektion. 9 h vor Ernte wurden die Zellen mit dem Toxin Subtilase AB zur Spaltung des Chaperons BiP oder seiner inaktiven Form SubA<sub>A272B</sub> als Kontrolle versetzt. Eine Stunde später wurde der Proteasominhibitor MG132 zu allen Proben hinzugegeben. Zum Zeitpunkt 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der von PPIC und PPIB mit Myc-DDK-Tag erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene aus dem Kaninchen. Als Sekundäntikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Die jeweilige Prozessierungsform ist als mittlerer Anteil des Gesamtsignals innerhalb einer Probe jeweils rechts graphisch dargestellt (Vorläufer in Rot, importiertes Polypeptid nach Abspaltung der Signalsequenz in Grau, glykosylierte Form in Grün, zweifach glykosylierte Form in Blau, n = 3).

### 3.6.2. Untersuchung weiterer TRAP-Substrate

Weitere plasmidkodierte Polypeptidvorläufer wurden als Modellsubstrate im Transportassay verwendet, um zunächst diese Ergebnisse mit denen endogener Basis betreffend zu vergleichen. Dazu wurden die Kandidaten Sil1, ACP2, EPDR1 und TMED5 ausgewählt. Alle vier konnten in humanen HeLa-Zellen als TRAP-Substrate identifiziert werden. Für TMED5 wurde zusätzlich zur humanen auch die murine Sequenz im Transport in intakten Zellen getestet.

#### 3.6.2.1. Charakterisierung der weiteren Modell-Polypeptidvorläufer

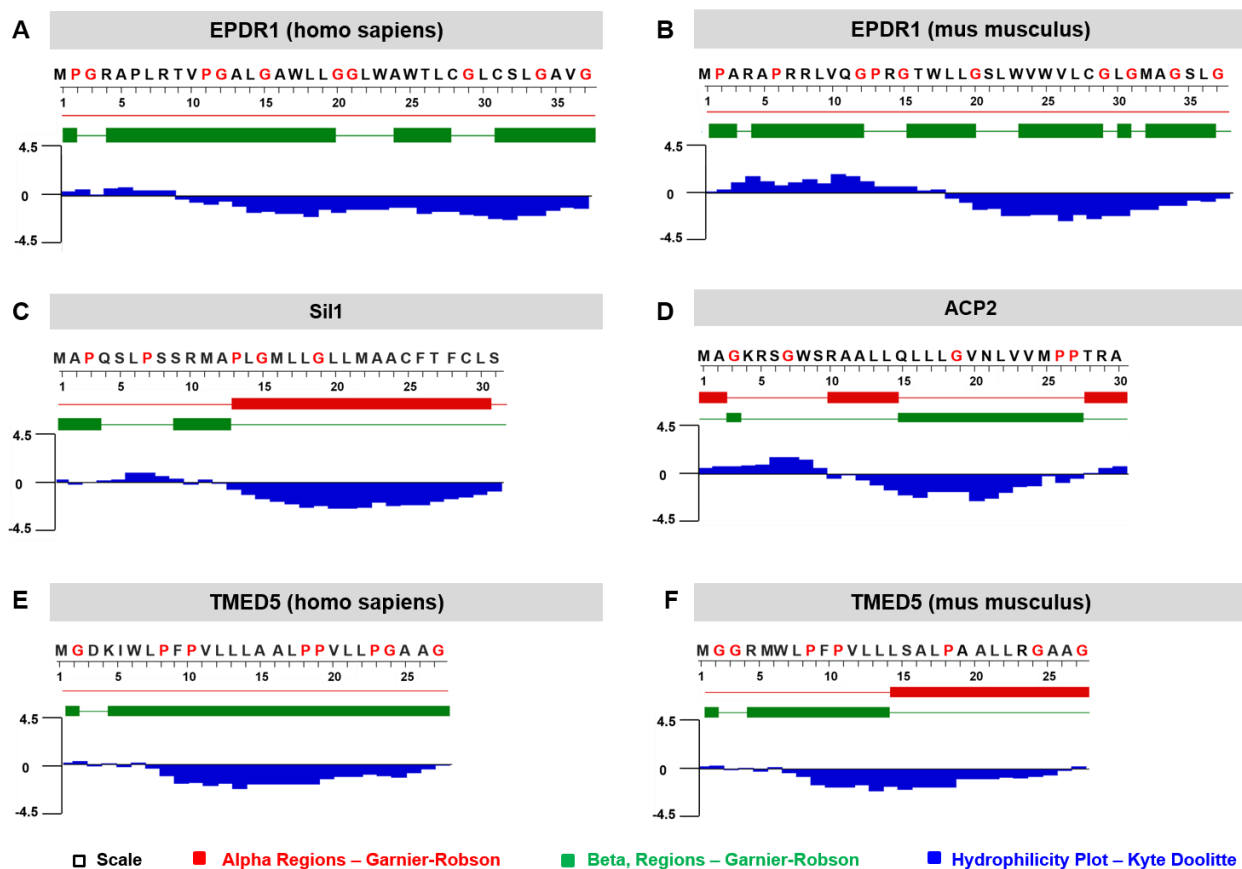
Zuvor wurde in 3.3 gezeigt, dass sich die potentielle TRAP-Substrate vor allem in den Charakteristika ihrer Signalpeptide von TRAP-unabhängigen Substraten unterscheiden. Daher wurden die Eigenschaften der Signalpeptide der zu untersuchenden Substrate in Abbildung 71 verglichen. Dazu gehört die Aminosäuresequenz, in welcher helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) rot markiert sind. Mit Hilfe des Protean Vorhersage-Tools (DNASTAR / Lasergene 12) wurden alpha-helikale (rot) und beta-Faltblattstrukturen (grün) sowie das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle (blau) bestimmt.

Zur Untersuchung der Translokationseffizienz von plasmidkodiertem EPDR1 wurde kommerziell eine cDNA mit muriner Sequenz für EPDR1 erworben. Um die Vergleichbarkeit hinsichtlich der determinierenden Eigenschaften als TRAP-Substrat und den auf endogener Basis erworbenen Ergebnisse beurteilen zu können, wurden beide Sequenzen gegenübergestellt. EPDR1 weist sehr ähnliche Eigenschaften vergleichend zwischen humaner (A) und muriner (B) Sequenz auf. Die Homologie der Proteine im reifen Teil beträgt 89 %, im Signalpeptid 64 %. In Bezug auf EPDR1, weder murin noch human, wird jeweils keine Helixstruktur vorhergesagt. Der GP-Anteil des humanen Signalpeptids ist mit 30 % etwas höher als mit 24 % in der murinen Signalsequenz. Auch der Hydrophobizitätsscore des humanen Signalpeptids liegt mit 0,727 höher im Vergleich zur murinen Signalsequenz (0,31). Zur Untersuchung der Transporteigenschaften von EPDR1 wurde folgend die plasmidkodierte murine Sequenz verwendet. Der physiko-chemische Vergleich der humanen und der murinen Sequenz von EPDR1 zeigt, dass die beiden Sequenzen ähnlich genug sind, um die Ergebnisse der Untersuchungen des plasmidkodierten EPDR1 mit denen auf humaner, endogener Ebene zu vergleichen.

Ein anderes Ergebnis zeigte der orthologe Vergleich in Bezug auf TMED5: In Abbildung 71 wurde ebenfalls die humane Sequenz (E) mit der murinen Sequenz (F) von und den jeweiligen physikochemischen Eigenschaften von TMED5 verglichen.

Beide Sequenzen wurden folgend für die plasmidkodierte Überexpression in HeLa-Zellen nach Depletion von Translokasekomponenten verwendet. Während das Signalpeptid des humanen TMED5 einen GP-Gehalt von 30 % aufweist, liegt der entsprechende Wert von TMED5 (murin) bei 26 %. Dieser sehr geringe Unterschied in den Eigenschaften der Signalpeptide führt laut dem Protean Vorhersage-Tool dazu, dass innerhalb des humanen Signalpeptids keine alpha-helikalen Sekundärstrukturen ausgebildet werden, was bei Betrachtung der murinen Signalsequenz gegensätzlich der Fall ist.

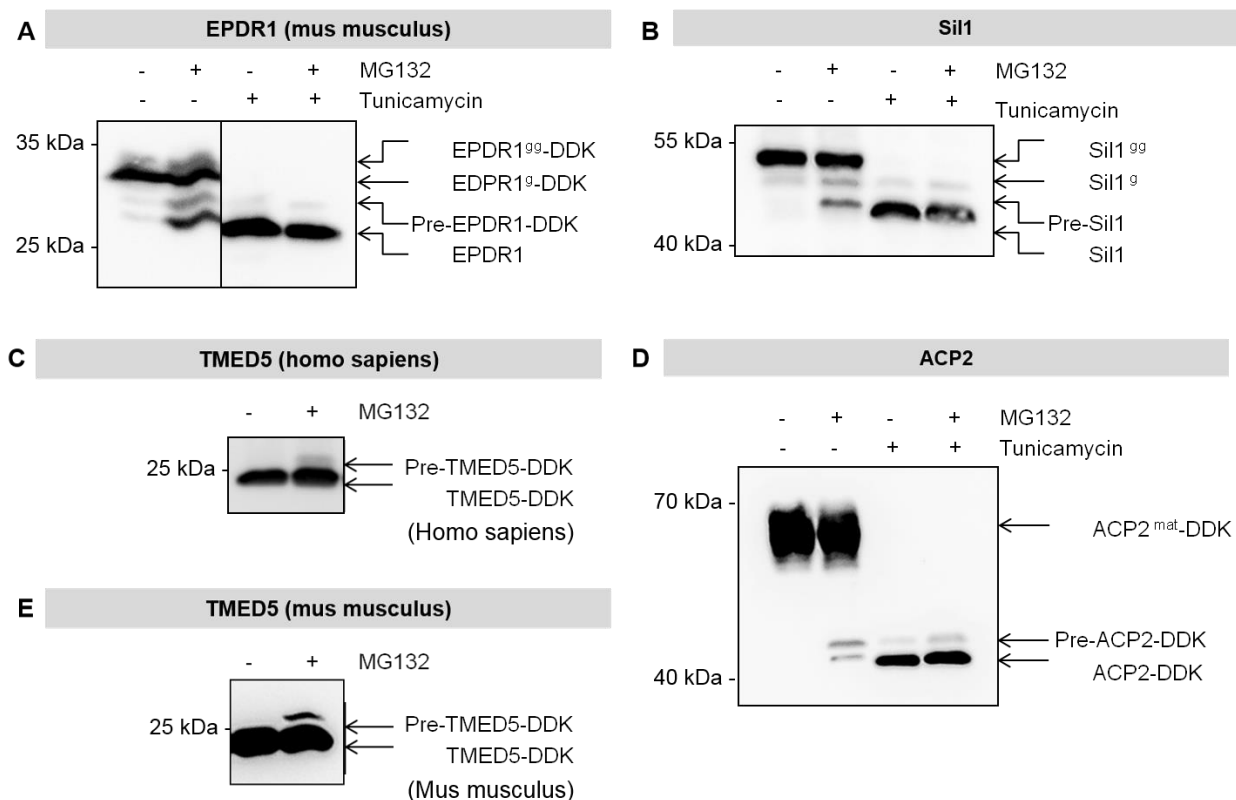
Die Signalpeptide der Proteine Sil1 (C) und ACP2 (D) weisen jeweils einen GP-Gehalt von 16 % auf, was laut Protean-Vorhersage mit der Ausbildung alpha-helikaler Strukturen einhergeht. Der Hydrophobizitätsscore von Sil1 ist mit 0,992 jedoch deutlich höher als der von ACP2 mit 0,304.



**Abbildung 71: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der Signalpeptide verschiedener Modell-Polypeptidvorläufer.**

Die Aminosäuresequenz der weiteren Modellsubstrate **A** EPDR1 (homo sapiens), **B** EPDR1 (mus musculus), **C** Sil1, **D** ACP2, **E** TMED5 (homo sapiens) und **F** TMED5 (mus musculus) ist in dieser Abbildung dargestellt. Helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) sind rot markiert. Darunter sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche laut Protean Vorhersage-Tool (DNASTAR / Lasergene 12) alpha-helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen ausbilden. In blau ist das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle gezeigt.

Um mittels Western Blot die einzelnen Signale der plasmidkodierten Signale nach Überexpression zuordnen zu können, wurde diese im ersten Schritt charakterisiert gemäß 2.4.6.2. Das Ergebnis zur Charakterisierung der einzelnen Prozessierungsstufen ist in Abbildung 72 dargestellt. HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Hemmung der N-Glykosylierung wurden die Zellen 2 h nach der Plasmid-Transfektion zusätzlich mit Tunicamycin manipuliert. Zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt. Nach 25-stündiger Expression des Plasmids erfolgte die Zellernte. Beispielhaft für EPDR1 (A) ist somit die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-EPDR1-DDK), importiertem EPDR1 nach Signalsequenzabspaltung (EPDR1-DDK) und den beiden glykosylierten Formen (EPDR1<sup>g</sup>-DDK und EPDR1<sup>gg</sup>-DDK) möglich.



**Abbildung 72: Charakterisierung der Prozessierungsstufen von plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufern.**

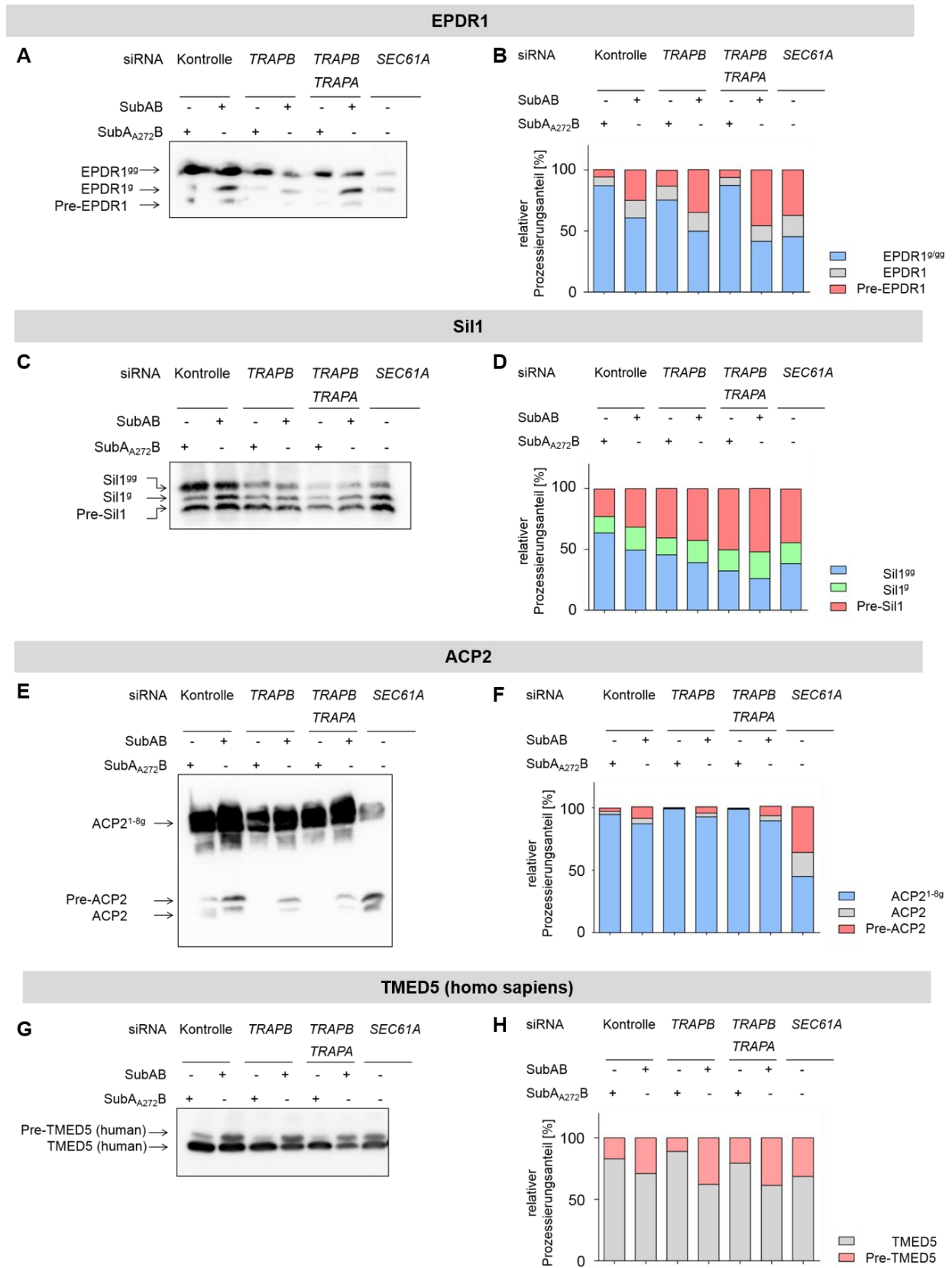
Mittels Western Blot werden unterschiedliche Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modellsubstrate EPDR1 (A), Sil1 (B), TMED5 (homo sapiens) (C), ACP2 (D) und TMED5 (mus musculus) (E) charakterisiert. Somit ist die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-EPDR1-DDK / Pre-Sil1 / Pre-TMED5-DDK / Pre-ACP2-DDK), importiertem Polypeptid nach Signalsequenzabspaltung (EPDR1-DDK / Sil1 / TMED5-DDK / ACP2-DDK) und den glykosylierten Formen (EPDR1<sup>g</sup>-DDK, EPDR1<sup>gg</sup>-DDK / Sil1<sup>g</sup>-DDK, Sil1<sup>gg</sup> / ACP2<sup>1-8g</sup>-DDK) möglich. HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Hemmung der N-Glykosylierung wurden die Zellen zusätzlich 2 h nach der Plasmid-Transfektion mit Tunicamycin manipuliert. Zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt. Nach 25-stündiger Expression des Plasmids erfolgte die Zellernte und Aufbereitung des Zelllysats.

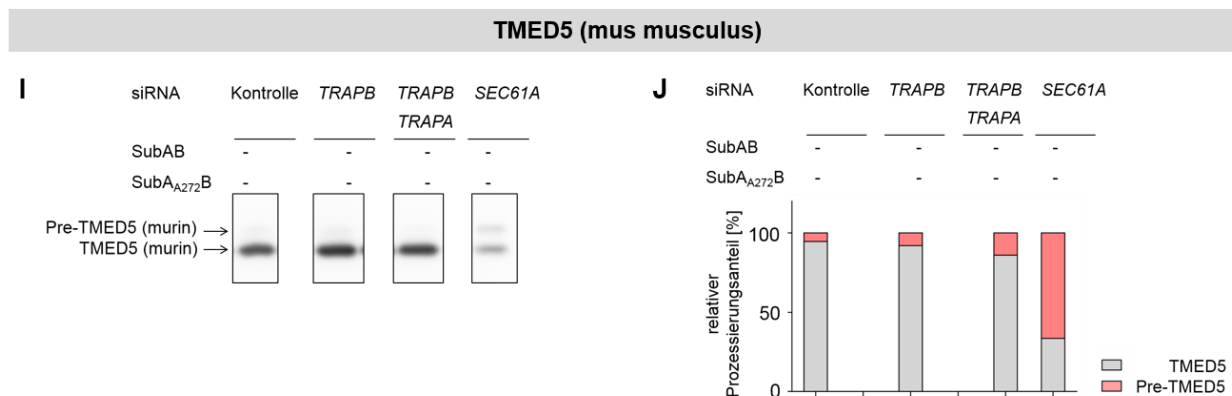
Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von EPDR1, TMED5 und ACP2 mit der *Myc*-DDK-Tag erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene, der Nachweis von Sil1 über einen anti-Sil1-Antikörper, jeweils aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. (Daten A – C veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### **3.6.2.2. Analyse der Translokation plasmidgetriebener Modell-Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten**

In Kapitel 3.2 wurden in HeLa-Zellen potentielle TRAP-Substrate identifiziert und auf endogener Ebene validiert. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung der Transport- und Glykosylierungseffizienz nach plasmidkodierter Überexpression einiger Modellsubstrate nach Depletion von Translokasekomponenten. Als Modellsubstrate dienten Sil1 (human) sowie die Formen mit C-terminalem *Myc*-DDK-Tag von EPDR1 (murin), TMED5 (human & murin) und ACP2 (human). Dazu wurde der Transport-Assay gemäß Kapitel 2.4.6 nach Depletion von *TRAPB*, *TRAPB* & *TRAPA*, BiP oder *SEC61A1* genutzt. Abbildung 73 zeigt die Ergebnisse der Translokationsstudie mit drei Experimenten. Hinsichtlich TMED5 (human) und EPDR1 konnte gezeigt werden, dass aufgrund der Depletion von BiP weniger reifes Protein und mehr Vorläufer nachweisbar war. Dieser Translokationsdefekt verstärkte sich durch die zusätzlich reduzierte Genexpression mittels RNAi von Untereinheiten des TRAP-Komplexes. In Bezug auf ACP2 und TMED5 (murin) war lediglich ein negativer Einfluss auf die Proteinprozessierung nach Depletion von *SEC61A1* nachweisbar. Die verminderte Proteinprozessierung von Sil1 zeigte sich bereits nach Einzeldepletion der Translokasekomponenten BiP und *TRAPB*. Deren simultane sowie zusätzliche Depletion von *TRAPA* verstärkte diesen Effekt. Generell waren für alle untersuchten Modellsubstrate reine Translokationsdefekte zu beobachten, aber keine Defekte der Glykosylierung nach erfolgreichem ER-Import der Polypeptidvorläufer.







### Abbildung 73: Analyse der Translokation plasmidgetriebener Modell-Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten

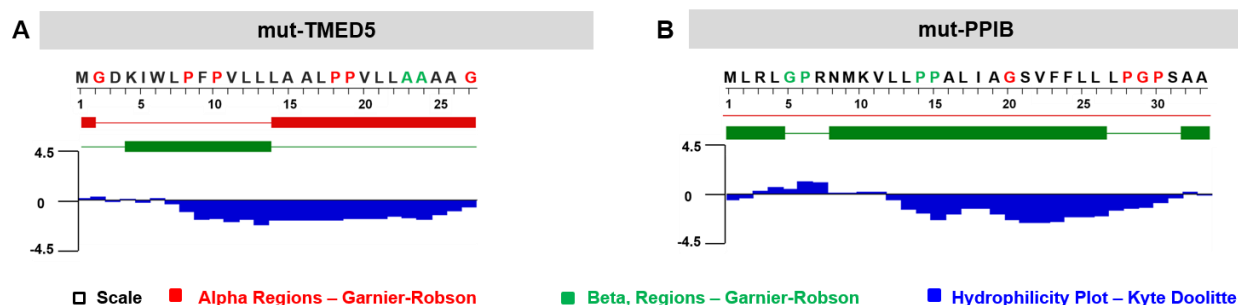
Gemäß 2.4.6 wurde die Translokation und Prozessierung plasmidgetriebener Model-Substrate nach Depletion von Translokasekomponenten untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Kontroll-, *TRAPB*-UTR, *TRAPB*-UTR und *TRAPA*-, oder *SEC61A1* siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h manipuliert. Nach 72 h erfolgte die Plasmidtransfektion. 9 h vor Ernte wurden die Zellen mit dem Toxin Subtilase AB zur Spaltung des Chaperons BiP oder seiner inaktiven Form SubA<sub>A272</sub>B als Kontrolle versetzt. Eine Stunde später wurde der Proteasominhibitor MG132 zu allen Proben hinzugegeben. Zum Zeitpunkt 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %, 4 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Formen mit C-terminalem Myc-DDK-Tag von EPDR1 (A, B), TMED5 (homo sapiens - G, H; mus musculus I, J), und ACP2 (E, F) erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene, der Nachweis von Sil1 (C, D) über einen anti-Sil1-Antikörper, jeweils aus dem Kaninchen. Als Sekundäntikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Die jeweilige Prozessierungsform ist als Anteil des Gesamtsignals innerhalb einer Probe jeweils rechts graphisch dargestellt (Vorläufer in Rot, importiertes Polypeptid nach Abspaltung der Signalsequenz in Grau, glykosylierte Form in Grün, n = 9).

### 3.6.3. Validierung der TRAP-Substrat Eigenschaften

Um den generellen Einfluss des Signalpeptids in Bezug auf die TRAP Abhängigkeit eines Polypeptids zu untersuchen, wurden Hybrid-Mutanten zwischen PPIB und PPIC im pcMV6-entry-Vektor kloniert. Dabei wurde zum einen das GP-reiche Signalpeptid von PPIC mit dem reifen Teil des TRAP-unabhängigen PPIB zusammengebracht (*PPIC-PPIB*). Zum anderen wurde das GP-arme Signalpeptid mit dem reifen Teil des TRAP-abhängigen PPIC verknüpft (*PPIB-PPIC*).

In Kapitel 3.3 wurden physikochemische Eigenschaften der Proteine untersucht, die nach der siRNA vermittelten Depletion von *TRAPB* und der daraus resultierenden Degradation des TRAP-Komplexes quantitativ vermindert waren. Das Signalpeptid betreffend zählt dazu der erhöhte Gehalt von helixbrechenden Aminosäuren Glycin und Prolin sowie eine verminderte Hydrophobizität. Um diese Eigenschaften als für ein TRAP-abhängiges Substrat determinierenden Charakteristika zu validieren, wurden Punktmutationen mittels quick-change PCR in die Signalpeptidsequenzen von PPIB und TMED5 (human) eingeführt (Abbildung 74). Durch die Mutation GP23/24AA im Signalpeptid von TMED5 wurde der GP-Gehalt von 30 % auf 22 % gesenkt bei gleichzeitiger Erhöhung der Hydrophobizitätsscores von 1,074 auf 1,250.

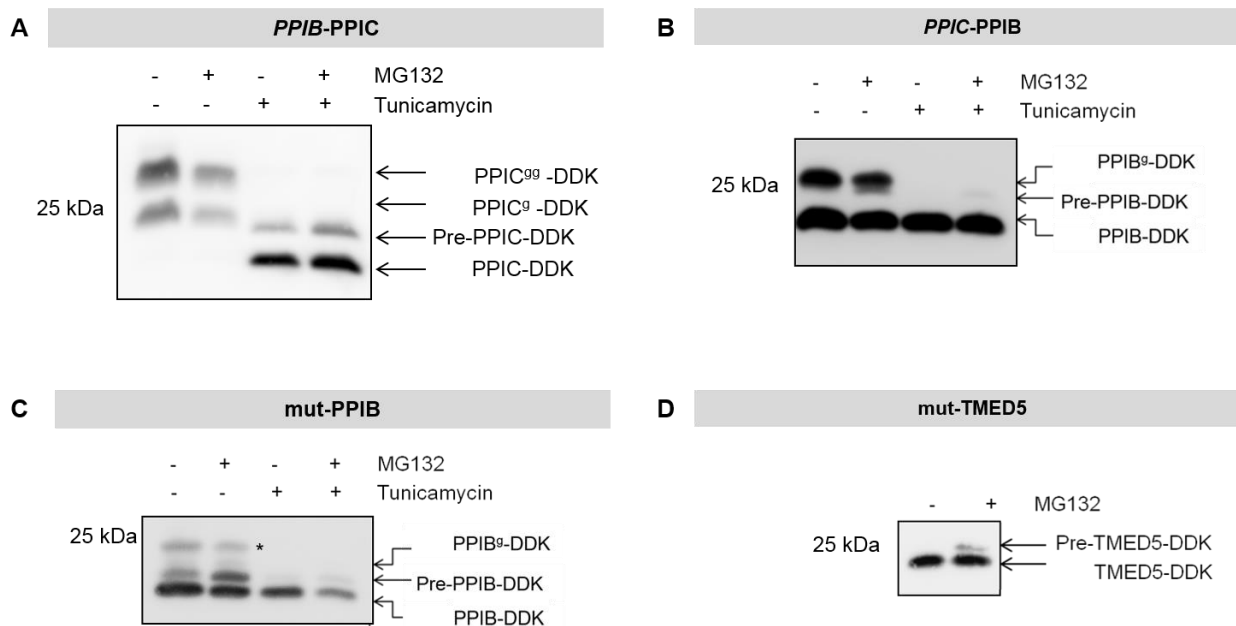
Im Signalpeptid von PPIB resultieren die Mutationen SE5/6GP und AA14/15PP in einer Erhöhung des GP-Gehalt von 12 % auf 24 % sowie einer Erniedrigung der Hydrophobizitätsscores von 0,961 auf 0,814. Der Einfluss dieser Mutationen wurde im Folgenden hinsichtlich der Transporteigenschaften in Abwesenheit von TRAP und BiP untersucht.



**Abbildung 74: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der mutierten Signalpeptide von PPIB und PPIB**

Die Aminosäuresequenz der mutierten Signalsequenz der Modellsubstrate mut-PPIB (A) und mut-TMED5 (B) ist in dieser Abbildung dargestellt. Helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) sind rot markiert, mutierte Aminosäuren grün. Darunter sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche laut Protean Vorhersage-Tool (DNASTAR / Lasergene 12) alpha-helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen ausbilden. In blau ist das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle gezeigt.

Um mittels Western Blot die einzelnen Signale der plasmidkodierten Signale nach Überexpression der Modell-Polypeptidvorläufer *PPIC*-PPIB, *PPIB*-PPIC; mut-PPIB und mut-TMED5 zuordnen zu können, wurden diese im ersten Schritt charakterisiert gemäß 2.4.6.2. Das Ergebnis zur Charakterisierung der einzelnen Prozessierungsstufen ist in Abbildung 75 dargestellt. Dazu wurden HeLa Zellen ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit einem für ein Modell-Substrat kodierendem Plasmid transfiziert für 24 h. Die Behandlung mit Tunicamycin zur Hemmung der N-Glykosylierung erfolgte 2 h nach Plasmid-Transfektion, mit MG132 zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol erfolgte für 8 h. Nach 25-stündiger Expression des Plasmids erfolgte die Zellernte. Beispielhaft für *PPIB*-PPIC (A) ist somit die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-PPIC-DDK), importiertem PPIC nach Signalsequenzabspaltung (PPIC-DDK) und den beiden glykosylierten Formen (PPIC<sup>99</sup>-DDK und PPIC<sup>99</sup>-DDK) möglich.

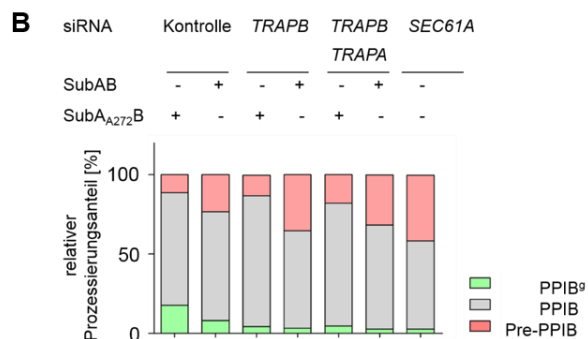
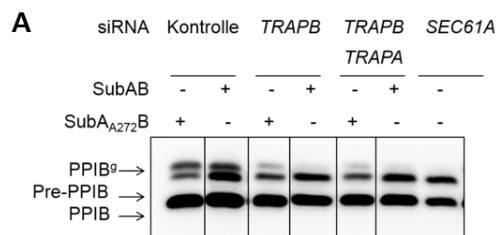


**Abbildung 75: Charakterisierung der Prozessierungsstufen von Modell-Polypeptidvorläufern mit Mutationen innerhalb ihrer Signalsequenz.**

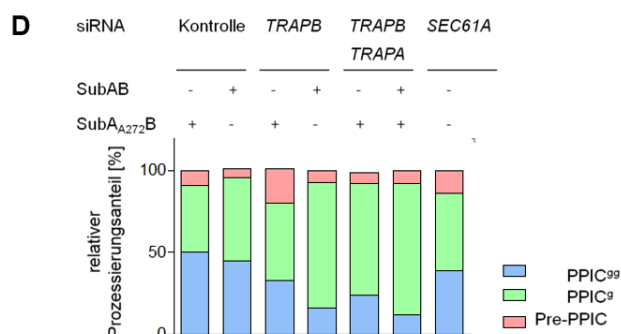
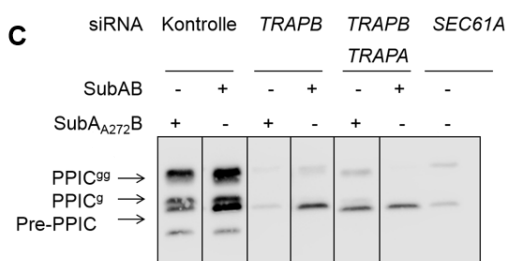
Mittels Western Blot werden unterschiedliche Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modellsubstrate mit mutiertem Signalpeptid von (A) PPIB-PPIC, (B) PPIC-PPIB, (C) mut-PPIB und (D) mut-TMED5 charakterisiert. Somit ist die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-PPIB-DDK / Pre-TMED5-DDK), importiertem Polypeptid nach Signalsequenzabspaltung (PPIB-DDK / TMED5-DDK) und den glykosylierten Formen (PPIB<sup>99</sup>-DDK) möglich. HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Hemmung der N-Glykosylierung wurden die Zellen zusätzlich 2 h nach der Plasmid-Transfektion zusätzlich mit Tunicamycin manipuliert. Zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt. Nach 25-stündiger Expression des Plasmids erfolgte die Zellernte und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %,  $4 \times 10^5$  Zellen pro Spur), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Formen mit C-terminalem Myc-DDK-Tag von PPIB-PPIC, mut-PPIB und mut-TMED5 erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. \* kennzeichnet unspezifische Banden. (Daten B - D veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Die Evaluation der für TRAP-abhängige Substrate determinierenden Signalpeptideigenschaften erfolgte auf Basis des Transport-Assays in lebenden Zellen gemäß 2.4.6. Dabei wurde die Translokations- und Glykosylierungseffizienz der beschriebenen, plasmidgetriebenen Vorläuferpolypeptide nach Depletion von *TRAPB*, *TRAPB* und *TRAPA*, *SEC61A1* und BiP beurteilt. In Abbildung 76 sind die Ergebnisse dreier Versuche sowie eines repräsentativen Western Blots zusammengefasst.

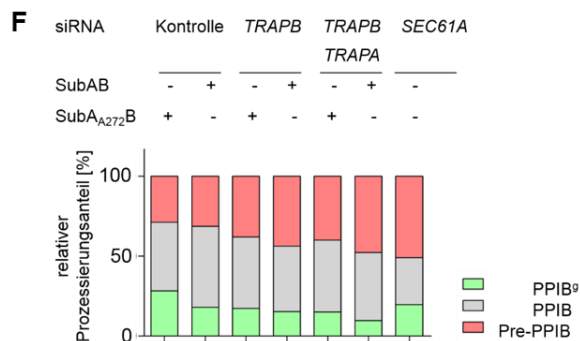
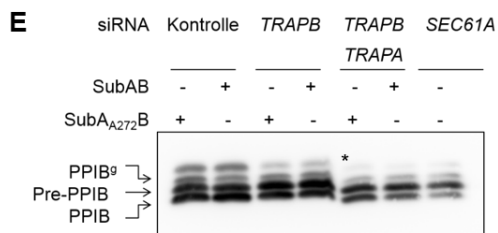
**PPIC-PIIB**



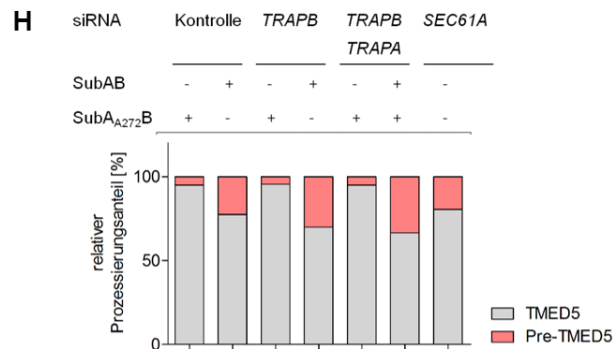
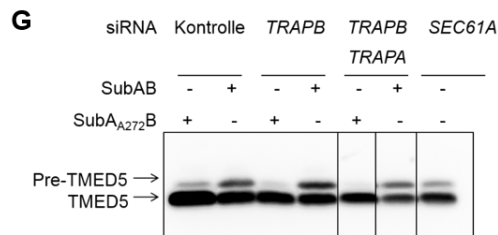
**PIIB-PPIC**



**mut-PIIB**



**mut-TMED5**



**Abbildung 76: Analyse der Translokation plasmidkodierter Modell-Polypeptidvorläufer mit eingebrachter Mutation in ihrer Signalsequenz nach Depletion von Translokasekomponenten**

Gemäß 2.4.6 wurde die Translokation und Prozessierung plasmidgetriebener Modell-Substrate mit mutierter Signalsequenz untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Kontroll-, *TRAPB*-UTR oder *SEC61A1* siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h manipuliert. Nach 72 h erfolgte die Plasmidtransfektion. 9 h vor Ernte wurden die Zellen mit dem Toxin Subtilase AB zur Spaltung des Chaperons BiP oder seiner inaktiven Form SubA<sub>A272</sub>B als Kontrolle versetzt. Eine Stunde später wurde der Proteasominhibitor MG132 zu allen Proben hinzugegeben. Nach 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Formen mit C-terminalem Myc-DDK-Tag von (A, B) *PPIC*-PPIB, (C, D) *PPIB*-PPIC, (E, F) mut-PPIB und (G, H) mut-TMED5 erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Die jeweilige Prozessierungsform ist als Anteil des Gesamtsignals innerhalb einer Probe jeweils rechts graphisch dargestellt (Vorläufer in Rot, importiertes Polypeptid nach Abspaltung der Signalsequenz in Grau, glykosylierte Form in Grün). \* kennzeichnet unspezifische Banden.

Hinsichtlich des Modellsubstrats *PPIC*-PPIB (A, B) wurde nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* oder der Doppeldepletion von *TRAPB* und *TRAPA* keine quantitative Verminderung von reifem PPIB nachgewiesen. Nach Applikation des SubtilaseAB Toxins zur Spaltung von BiP wurde jedoch weniger reifes PPIB und somit ein Translokationsdefekt nachgewiesen. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Reduktion der Genexpression von *TRAPB* und *TRAPA* verstärkt. Ähnlich stark war die Prozessierung von PPIB nach der Depletion von *SEC61A1* gehemmt.

Bei Betrachtung des umgekehrten Konstrukts *PPIB*-PPIC (C, D) war keine Verminderung des prozessierten PPIC aufgrund der Verminderung von *TRAPB*, *TRAPA* oder BiP nachweisbar. Da allerdings auch das Fehlen des Sec61-Komplexes anscheinend keinen Einfluss auf die Prozessierung von PPIC hatte, gab es für Untersuchung dieser Mutante keine valide Positivkontrolle. Darum konnten keine Ergebnisse aus den Experimenten zum Konstrukt *PPIB*-PPIC zur weiteren Beurteilung der Signalpeptideigenschaften von TRAP-Substraten genutzt werden.

Das Ergebnis der Transportexperimente für mut-PPIB (E, F) machte deutlich, dass bereits die Einzeldepletion von *TRAPB* oder BiP zur Reduktion an prozessiertem PPIB bei gleichzeitiger Zunahme des Anteils an Vorläufer führt. Der nachgewiesene Translokationsdefekt wurde durch simultane Depletion von *TRAPB* und BiP sowie *TRAPA* verstärkt. Der stärkste Transportdefekt war aufgrund der RNAi-vermittelten Reduktion von *SEC61A1* nachweisbar.

Mut-TMED5 (G, H) wurde auch nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* und *TRAPA* effizient transportiert und prozessiert. Allerdings hatte die Depletion von BiP mittels SubAB-Toxin einen negativen Effekt auf den Transport von mut-TMED5, was durch zusätzliche Reduktion des TRAP-Komplexes verstärkt wurde.

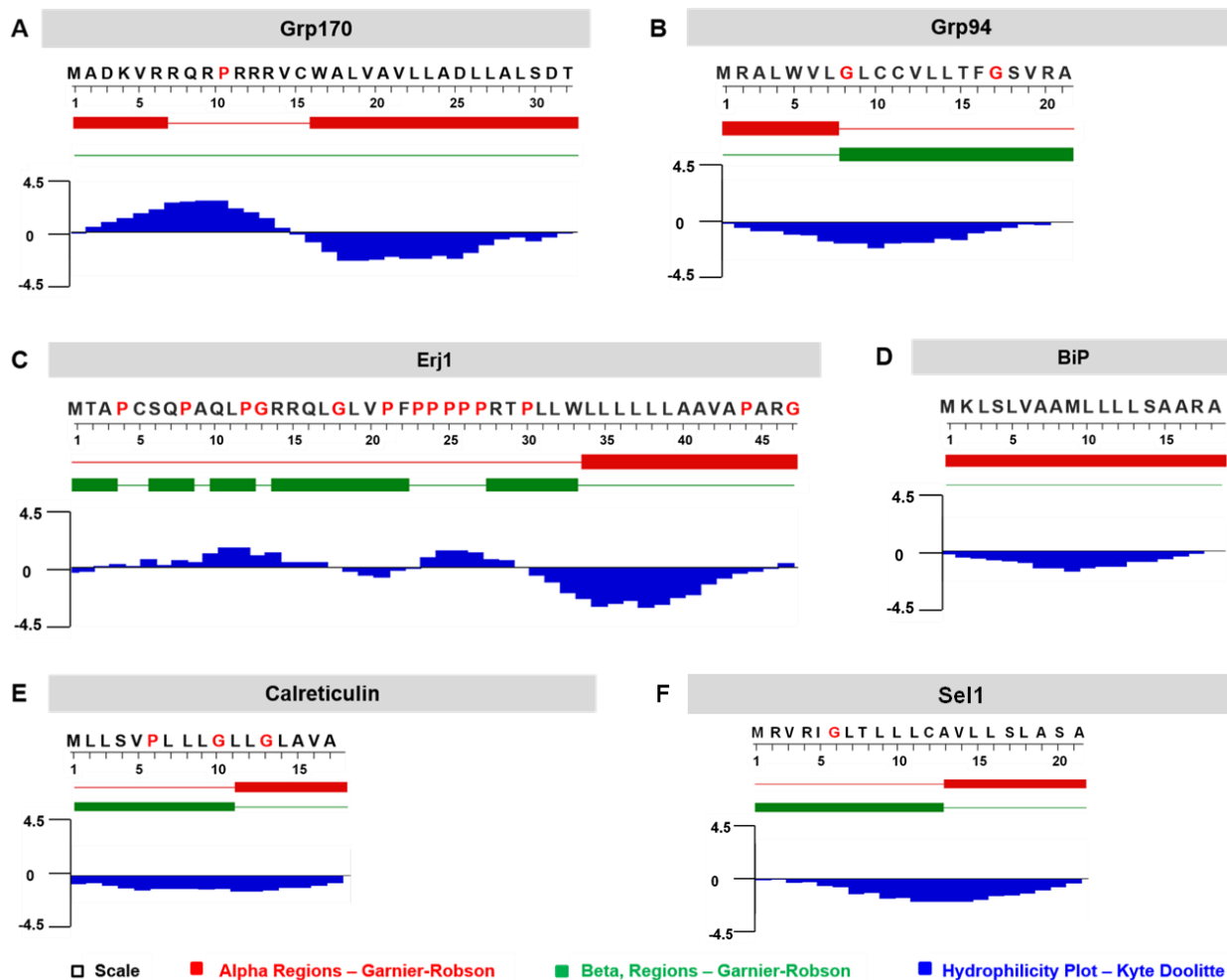
Tabelle 27 fasst die Eigenschaften der Signalpeptide von Modells substraten, die im Transportassay in lebenden Zellen verwendet wurden zusammen. Diese Liste ist um die Modellproteine erweitert, welche zur Validierung der TRAP-Substrate auf endogener Ebene genutzt wurden, allerdings selbst nur von der siRNA vermittelten Depletion *SEC61A1* quantitativ negativ betroffen waren.

**Tabelle 27: Aminosäuresequenzen und Eigenschaften von Signalpeptiden**

Die Aminosäuresequenzen von Signalpeptiden, die zur Evaluierung von Signalpeptideigenschaften mittels Transport-Assay in lebenden Zellen eingesetzt wurden, sind zusammen mit UniProtID des Proteins und Genname gelistet. Das Vorhandensein von N-Glykosylierungen (N-Glyk.) und Transmembrandomänen ist angezeigt. Der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin (GP [%]) ist angegeben genauso wie der Hydrophobizitätsscore (Hph) jeweils das Signalpeptid betreffend. Signalpeptidsequenzen sind unterteilt in N-terminalen, hydrophoben und C-terminalen Teil ([www.phobius.sbc.su.se](http://www.phobius.sbc.su.se)), \*, negativ beeinflusste Proteine nach Depletion des Sec61-Komplexes; \*\*, validierte Proteine laut 3.2, mutierte Varianten von TMED5 und PPIB gemäß 2.3.2.2. (Daten veröffentlicht in Nguyen, Stutz et al., 2018, Inhalt durch „Creative Common Attribution 4.0 International License“ geschützt, <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

UniProt ID	Gen	Signalpeptid	TM	N-Glyk.	GP [%]	Hph
Q9H173 */**	<i>SIL1</i>	MAPQSLPSSRM <u>APLGM</u> LLGLLMA ACFTFCLS	-	+	16,1	0,992
P23284 *	<i>PPIB</i>	MLRLSERNMKV <u>LLAAALIAGSVFFL</u> LLPGPSAA	-	+	12,1	0,961
Q99M71	<i>EPDR1</i> (murin)	MPARAPRRLVQGPRTWLLGSL WVWVLCGLGMAGSLG	-	+	27,0	0,310
P45877	<i>PPIC</i>	MGPGR <u>LLLLALVLCVALAALVFSS</u> GAEGF	-	+	32,1	1,063
-	mut- <i>PPIB</i>	MLRLGPRNMKV <u>LLPPALIAGSVFF</u> LLPGPSAA	-	+	24,2	0,814
Q9Y3A6 */**	<i>TMED5</i> (human)	MGDKIWLFPFV <u>LLLLAALPPVLLPG</u> AAG	+	-	29,6	1,074
-	mut- <i>TMED5</i> (human)	MGDKIWLFPFV <u>LLLLAALPPVLLAAA</u> AG	+	-	22,2	1,250
Q9CXE7	<i>TMED5</i> (murin)	MGGRMWLFPFV <u>LLLSALPAALLR</u> GAAG	+	-	25,9	0,870
P11021	<i>HSPA5</i>	MKLSLVAAMLLLLSAARA	-	-	0	1,449
P14625 *	<i>HSP90B1</i>	MR <u>ALWVLGLCCVLLT</u> FGSVRA	-	+	9,52	1,446
Q9Y4L1 *	<i>HYOU1</i>	MADKVRQRPRRR <u>VCWALVAVLL</u> ADLLALSDT	-	+	3,12	-0,101
Q96KC8	<i>DNAJC1</i>	MTAPCSQPAQLPGRRLGLVPFP PPPPRTPLLWLLLLLLAAVAPARG	+	-	29,8	0,157
P27797	<i>CALR</i>	<u>MLLSVPLLLGLLGLAVA</u>	-	+	17,6	2,307

Für letztere sind in Abbildung 70 ebenfalls die Signalpeptide hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften verglichen. Dazu gehört die Aminosäuresequenz, in welcher helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) rot markiert sind. Mit Hilfe des Protean Vorhersage-Tools (DNASTAR / Lasergene 12) wurden alpha-helikale (rot) und beta-Faltblattstrukturen (grün) sowie das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle (blau) bestimmt.



**Abbildung 77: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der Proteine Grp170, Grp94, ERj1, BiP, Calreticulin & Sel1**

Die Aminosäuresequenz der Signalsequenz der aufgrund der Depletion von *TRAPB* unbeeinflussten Proteine **A** Grp170, **B** Grp94, **C** ERj1 & **D** BiP, sowie der TRAP-abhängigen Substrate **E** Calreticulin und **F** Sel1 ist in dieser Abbildung dargestellt. Helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) sind rot markiert, mutierte Aminosäuren grün. Darunter sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche laut Protean Vorhersage-Tool (DNASTAR / Lasergene 12) alpha-helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen ausbilden. In blau ist das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle gezeigt.



### 3.7. Einfluss des TRAP-Komplexes auf die Biogenese von Membranproteinen

Innerhalb der Studie von Sommer et al. (2013) wurde der TRAP-Komplex damit in Verbindung gebracht in Zusammenhang mit der Biogenese von Membranproteinen zu stehen. Daher erfolgte an dieser Stelle die Untersuchung der Membranproteine, welche anhand der quantitativen Proteomanalyse in ihrem Gehalt negativ gegenüber der Kontrolle beeinflusst waren. Dabei wurden die Daten der chronisch TRAP-defizienten CDG-Patientenzellen sowie die Daten der transient von *TRAPB*-depletierten HeLa-Zellen. Letztere Gruppe wurde zudem unterteilt in die beiden Subgruppen „Membranproteine mit Signalpeptid“ und „Membranproteine ohne Signalpeptid“. Die Untersuchung der einzelnen Gruppen erfolgte dahingehend ein Muster zu erkennen, z.B. welche Art der Membranproteine primär von der Depletion der TRAP-Komplexes betroffen ist und somit innerhalb ihrer Biogenese Abhängigkeiten zu TRAP-Komplex zeigen.

Zunächst erfolgte die Subgruppierung anhand der Anzahl der Transmembrandomänen im reifen Teil der TRAP-abhängigen Membranproteine. Zusammenfassend ist dies in Abbildung 78 dargestellt. Die Analyse stützt sich dabei auf die Vorhersage mittels TMHMM Server 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)).

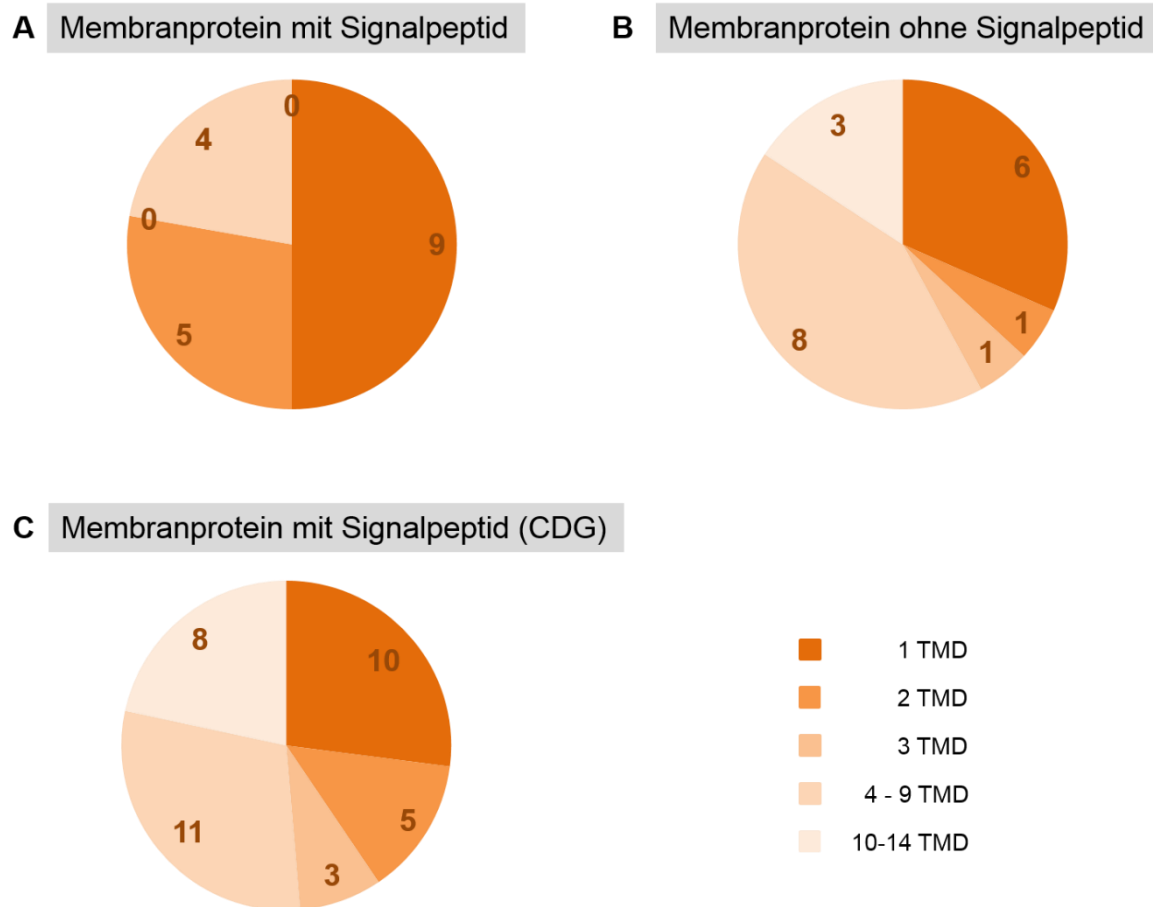
In Abbildung 78 ist das Ergebnis der Untersuchung der Membranproteine, welche aufgrund der Depletion des TRAP-Komplexes quantitativ vermindert nachgewiesen wurden, hinsichtlich Anzahl der Transmembrandomänen. Die Gruppe der negativ beeinflussten Membranproteine aufgrund der siRNA vermittelten Depletion von *TRAPB* wurde weiterhin unterteilt in Proteine mit Signalpeptid (A) und Proteine ohne Signalpeptid (B). Erstere zeigte folgendes Ergebnis: Neun der Vorläufer Polypeptide mit Signalpeptid weisen eine Transmembranhelix im reifen Teil auf, sieben davon sind Typ-I-Membranproteine, d.h. der reife N-Terminus ragt in das ER-Lumen oder in den Extrazellularraum. Zehn der Vorläuferpolypeptide mit Signalpeptid umfassen mehr als eine Transmembranhelix in ihrer reifen Domäne. Somit sind insgesamt 50 % der TRAP-abhängigen Vorläuferpolypeptide mit spaltbarem Signalpeptid Membranproteine.

Gemäß den Vorhersagen des TMHMM Server 2.0 besitzen sechs der Vorläuferpolypeptide ohne abspaltbare Signalsequenz lediglich eine (in Tabelle 24 notierte) Transmembranhelix. Fünf von diesen sind Typ-II-Membranproteine, d.h. der N-Terminus ragt ins Cytosol. Die restlichen 16 Vorläuferpolypeptide weisen mehr als eine Transmembranhelix auf.

Für die Untersuchungen der im CDG-Patienten-Proteom (C) quantitativ verminderten Membranproteine erfolgte die Untersuchung nur hinsichtlich solcher Proteine mit Signalpeptid. Diese Gruppe zeigt die gleichen Tendenzen wie bereits für solche Vorläuferpolypeptide mit

abspaltbarem Signalpeptid (A) gezeigt, allerdings nach siRNA-vermittelter Depletion von *TRAPB*. Jedoch ist festzuhalten, dass in der Gruppe der TRAP-abhängigen Membranproteine der CDG-Patienten generell eine homogenere Verteilung der Proteine hinsichtlich Anzahl der Transmembrandomänen sowie des jeweiligen Typs zu beobachten ist.

Eine Auflistung der untersuchten Membranproteine sowie den jeweiligen Eigenschaften sind Tabelle 28 bis Tabelle 30 zu entnehmen.



**Abbildung 78: Untersuchung der Membranproteine, welche aufgrund der Depletion des TRAP-Komplexes quantitativ vermindert nachgewiesen wurden, hinsichtlich Anzahl der Transmembrandomänen**

Membranproteine nachgewiesen in HeLa-Zellen (A) mit abspaltbarem Signalpeptid, (B) ohne abspaltbares Signalpeptid und (C) Membranproteine mit Signalpeptid identifiziert in CDG-Fibroblasten wurden hinsichtlich der Anzahl ihrer Transmembrandomänen untersucht. Diese wurden mittels TMHMM Server 2.0 identifiziert ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)).

**Tabelle 28: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine nach siRNA vermittelter *TRAPB* Depletion mit abspaltbarer Signalsequenz.**

Aufgelistet sind Gennamen und Eigenschaften von Membranproteinen mit abspaltbarer Signalsequenz, welche nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* mittels Proteomanalyse als quantitativ negativ beeinflusst nachgewiesen wurden. Die Signalpeptidvorhersage erfolgte mit Hilfe von SignalP 4.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)). Das Vorhandensein einer N-Glykosylierung (N-Glyk) ist angezeigt, sowie die, Lokalisation und Länge [AS] des gesamten Proteins. Anzahl und Orientierung an Transmembrandomänen wurde mittels TMHMM Server 2.0 identifiziert ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)). UniProtKB-ID des Proteins sowie Aminosäuresequenzen von N-terminalen Transmembrandomänen plus benachbarte Regionen sowie der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin und Hydrophobizitätsscore sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Gen	N-Glyk.	Anzahl TMD	Orientierung	Lokalisation	Länge [AS]
<i>ANTXR1</i>	+	1	N in (1-320), C out (344-564)	Plasmamembran	564
<i>MUC1</i>	+	1	N out (1-1158), C in	Golgi, Plasmamembran	1255
<i>LMAN2</i>	+	1	N out (1-322), C in	ER / Golgi	356
<i>ACP2</i>	+	1	N out (1-381), C in	Lysosom	423
<i>ADAM10</i>	+	1	N out (1-673) C in	Golgi	748
<i>SEL1L</i>	+	1	N out (1-738), C in	ER	794
<i>IGF1R</i>	+	1	N out (1-935), C in	Plasmamembran	1367
<i>ITGAV</i>	+	1	N out (1-993), C in (1017 – 1048)	Plasmamembran	1048
<i>NCEH1</i>	+	1	N in (1-8), C out (28-408)	ER	408
<i>TMEM256</i>	-	2	N in, C in	Plasmamembran	113
<i>NCLN</i>	+	2	N in, C in, Loop 35 - 520	ER	563
<i>DDOST</i>	-	2	N in, C in Loop 44-424	ER (OST)	456
<i>TMED5</i>	-	2	N out, C out, Loop 28-194	Golgi	229
<i>EGFR</i>	+	2	N out, C out		1210
<i>TUSC3</i>	-	5	N in, C out Loop	ER (OST)	348
<i>MAGT1</i>	+	5	N in, C out Loop 30 - 185	ER (OST)	335
<i>SLC39A10</i>	+	7	N out (1-403), C in Loop (516-684)	Plasmamembran	831
<i>SLC35B2</i>	-	8	N in, C in Loop 57-233	ER / Golgi	432

**Tabelle 29: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine nach siRNA vermittelter *TRAPB* Depletion ohne abspaltbare Signalsequenz.**

Aufgelistet sind Gennamen und Eigenschaften von Membranproteinen ohne abspaltbare Signalsequenz, welche nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* mittels Proteomanalyse als quantitativ negativ beeinflusst nachgewiesen wurden. Das Vorhandensein einer N-Glykosylierung (N-Glyk) ist angezeigt, sowie die Lokalisation und Länge [AS] des gesamten Proteins. Anzahl und Orientierung an Transmembrandomänen wurde mittels TMHMM Server 2.0 identifiziert ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)). UniProtKB-ID des Proteins sowie Aminosäuresequenzen von N-terminalen Transmembrandomänen plus benachbarte Regionen sowie der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin und Hydrophobizitätsscore sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Gen	N-Glyk	Anzahl TMD	Orientierung	Lokalisation	Länge [AS]
<i>LNPEP</i>	+	1	N in (1-111, C out (132 – 1025)	Plasmamembran	1025
<i>GLT8D1</i>	+	1	N in, C out (25–371)	Golgi	371
<i>NEU1</i>	+	1	N in, C out (43-415)	Lysosom	415
<i>WNT5A</i>	+	1	N in, C out (48-380)	ER / Golgi	380
<i>LPCAT4</i>	+	1	N in, C out (63 – 524)	ER	524
<i>MOSPD2</i>	-	1	N out (1-492)	Plasmamembran	518
<i>SPCS2</i>	-	2	N in (1-79), C in (135 – 226)	ER	226
<i>DAD1</i>	-	3	N out, C in	ER	113
<i>TMEM205</i>	-	4	N out, C out		189
<i>TMBIM6</i>	-	6	N in, C in	ER	237
<i>DEGS1</i>	-	6	N out, C out	ER / Mito	323
<i>HM13</i>	+	7	N out, C in	ER, Plasmamembran	377
<i>SOAT1</i>	-	8	N in (1-130), C in	ER	550
<i>ANO10</i>	-	8	N in (1-206), C in	Plasmamembran	660
<i>WLS</i>	-	8	N in, C in, Loop 36–232 (out)		541
<i>TRAM1</i>	+	8	N out, C out	ER	374
<i>STT3B</i>	+	10	N out, C out (463 – 826)	ER	826
<i>SLC4A2</i>	+	11	N out (1-699), C in	Plasmamembran	1241
<i>SLC2A1</i>	+	12	N in , C in	Plasmamembran	492

**Tabelle 30: Übersicht und Eigenschaften der Membranproteine, welche im Proteom der CDG-Patientenzellen quantitativ als vermindert nachgewiesen wurden.**

Aufgelistet sind Gennamen und Eigenschaften von Membranproteinen mit abspaltbarer Signalsequenz, welche mittels Proteomanalyse von CDG-Patientenzellen als quantitativ negativ beeinflusst nachgewiesen wurden. Die Signalpeptidvorhersage erfolgte mit Hilfe von SignalP 4.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)). Die Lokalisation und Länge [AS] des gesamten Proteins ist angezeigt. Anzahl und Orientierung an Transmembrandomänen wurde mittels TMHMM Server 2.0 identifiziert ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)).

Gen	Anzahl TMD	Orientierung	Lokalisation	Länge [AS]
<i>C17orf62</i>	1	N in, C out	?	187
<i>ARMC10</i>	1	N out (1-4), C in (28-343)	ER	343
<i>EXT2</i>	1	N in (1-23), C out (47-718)	ER, Golgi	718
<i>POM121C;POM121</i>	1	N in, C out (59 – 1229)	ER, Nukleus	1229
<i>JPH2</i>	1	TA (out)	ER, Plasmamembran	696
<i>FAM20B</i>	1	N in (1-6), C out (26-409)	Golgi	409
<i>C1GALT1</i>	1	N in (1-6), C out (30-363)	Golgi	363
<i>TPST2</i>	1	N in, C out (30 – 377)	Golgi	377
<i>ARMCX6</i>	1	N in (1-6), C out (30-300)	Mito	300
<i>TENM3</i>	1	N in, C out (332-2700)	Plasmamembran	2700
<i>TMEM55B</i>	2	N in (1-211), C in	Endosom, Lysosom	377
<i>TMEM199</i>	2	N out (1-144), C out	ER	208
<i>KCNJ2</i>	2	N in (1-84), C in (180 – 427)	ER, Golgi	427
<i>TMEM261</i>	2	N in, C in	Mitochondrium	116
<i>STX17</i>	2	N in (1-228), C in	überall	302
<i>TMEM159</i>	3	N out, C in	?	161
<i>TMEM189</i>	3	N out, C in (183-270)	ER	270
<i>TSPAN10</i>	3	N in, C out (179-355)	Plasmamembran	355
<i>SSR3</i>	4	N in, C in	ER	185
<i>CDIPT</i>	4	N in, C out	ER, Golgi, Plasmamembran	213
<i>SGMS2</i>	6	N in, C in	Golgi, Plasmamembran	365

**Tabelle 30 (Fortsetzung): Übersicht und Eigenschaften der Membranproteine, welche im Proteom der CDG-Patientenzellen quantitativ als vermindert nachgewiesen wurden**

Gen	Anzahl TMD	Orientierung	Lokalisation	Länge [AS]
<i>ATP2A3</i>	7	N in, C out, Loop 322-759	ER	1043
<i>SGPP1</i>	7	N in (1-130), C out	ER, Plasmamembran	441
<i>CHRM2</i>	7	N out, C in, Loop 209 – 388 in	Plasmamembran	466
<i>ATP1A2</i>	8	N in, C in, Loop 343-785 in	Plasmamembran	1020
<i>TMEM39A</i>	8	N in, C in	Plasmamembran	488
<i>TMEM168;FLJ13576</i>	9	N in, C out (379-697)	?	697
<i>LMBRD2</i>	9	N out (1-3), C in, Loop 208-388	?	695
<i>SLC38A10</i>	9	N in, C out (398-1119)	Golgi	1119
<i>ATP13A3</i>	10	N in, C in, Loop 469 – 930 in	Plasmamembran	1226
<i>MFSD10</i>	10	N in, C in	Plasmamembran	455
<i>SLC22A18</i>	10	N in, C in	Plasmamembran	424
<i>PIGG</i>	11	N out (1-431), C in	ER	983
<i>SLC44A2</i>	11	N in, C out	Lysosom, Plasmamembran	706
<i>SLC9A6</i>	12	N in, C in (505-669)	ER, Endosom	669
<i>SLC2A10</i>	12	N in, C in	Plasmamembran	541
<i>SLC7A14</i>	14	N in, C in	Lysosom	771

### 3.8. Untersuchung des Substratspektrums von BiP

Untersuchungen von Schäuble et al. (2013) zum Polypeptidtransport haben gezeigt, dass das ER-luminale Chaperon BiP mit Sec61 $\alpha$  (Loop 7) interagiert und dadurch am Gating des Kanals maßgeblich beteiligt ist. In aktuellen Studien wurden mittels CET die strukturellen Eigenschaften des Translokons und assoziierten Komponenten wie dem OST- und dem TRAP-Komplex untersucht (Pfeffer, et al., 2014, 2016, 2017). Aus diesen geht hervor, dass die  $\alpha$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes in räumlicher Nähe zum Loop 5 von Sec61 $\alpha$  steht. Innerhalb dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass TRAP maßgeblich an der korrekten Translokation bestimmter Polypeptide zur weiteren Prozessierung im ER beteiligt ist. Dadurch resultiert die Frage, ob der TRAP-Komplex und BiP redundante Funktionen im Gating des Sec61-Kanals innehaben und füreinander kompensieren könnten. Eine Frage, die bereits in 3.6 innerhalb der Untersuchung der Charakteristika einiger TRAP-Substrate adressiert wurde.

Zusätzlich wurde neben der Analyse des Substratspektrums von TRAP deshalb auch jenes des multifunktionalen Chaperons BiP untersucht. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen erläutert.

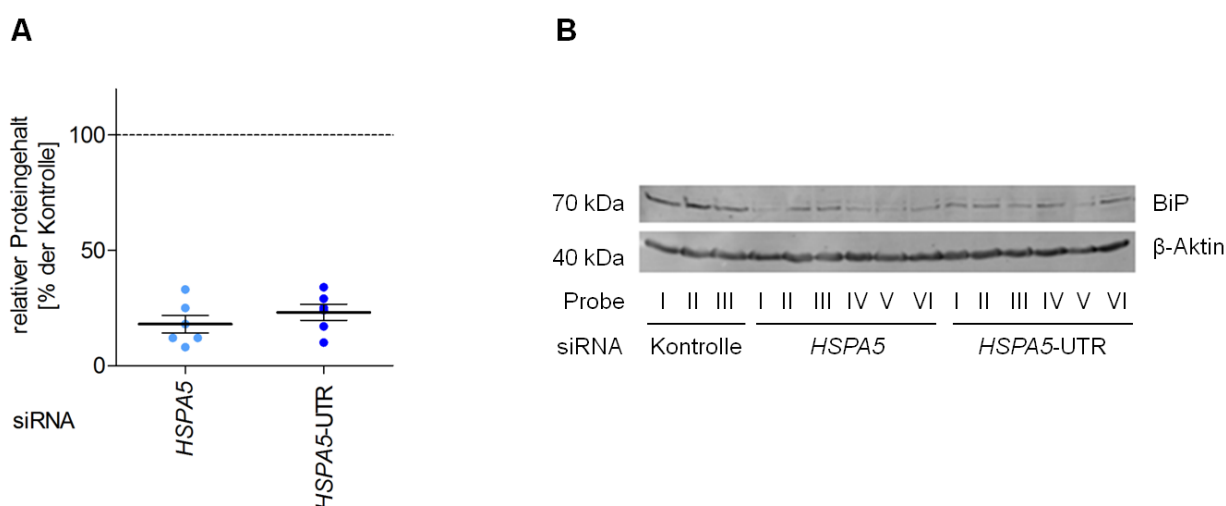
#### 3.8.1. Identifizierung potentieller BiP-Substrate

Analog zur Strategie im Hinblick auf die Identifizierung potentieller Substrate wurden HeLa-Zellen nach siRNA vermittelter Depletion von BiP (*HSPA5*) einer Proteomanalyse gemäß 3.1 unterzogen. Frühere Studien belegen, dass BiP eine maßgebliche Rolle im Transport von Polypeptiden in das ER zu Teil wird (1.3.5.1)

Aufgrund der Manipulation der *HSPA5*-Genexpression in siRNA transfizierten Zellen wird daher provoziert, dass betreffende Polypeptide nicht in das ER-Lumen transportiert werden. Dies resultiert in der Akkumulation der nicht-transportierten Polypeptide im Cytosol und deren proteasomalem Abbau (1.5.1, 2.4.6.1). Demnach ist anzunehmen, dass die Depletion von *HSPA5* bewirkt, dass vor allem Proteine des sekretorischen Wegs innerhalb des massenspektrometrisch quantifizierten Proteoms vermindert nachgewiesen werden.

Die Zellkulturexperimente zur Vorbereitung der Proteomanalyse wurden von Monika Lerner im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie folgendermaßen durchgeführt: HeLa-Zellen wurden in zwei biologischen und jeweils drei technischen Replikaten für BiP kodierendes *HSPA5* gemäß 2.4.4.1 depletiert. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät, mit 20 nM *HSPA5* bzw. *HSPA5*-UTR sowie Kontroll-siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Im Anschluss an die Zellernte erfolgte die Aufbereitung der Zellen zur Proteomanalyse (2.6).

Hierbei lag der Erntezeitpunkt und somit die Transfektionsdauer der HeLa-Zellen mit siRNA anders als bei der siRNA vermittelten Depletion von *TRAPB* nicht bei 96 h sondern bei 72 h. Nach diesem Zeitraum kann der Gehalt des Hsp70-Chaperons BiP auf einen minimalen Wert von etwa 25 % reduziert werden, wohingegen nach 96 h ein erneuter Anstieg der BiP-Konzentration nachweisbar ist (Schäuble, 2013). Mittels semi-quantitativem Western Blot wurde die verringerte Genexpression von *HSPA5* kontrolliert (2.4.5). In Abbildung 79 ist das Ergebnis zur Untersuchung hinsichtlich der Depletionseffizienz dargestellt. In allen sechs Proben wurde der BiP-Restproteingehalt mit unter 30 % nachgewiesen (A). B zeigt einen repräsentativer Blot eines Experiments nach immunologischer Detektion von BiP sowie  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle.



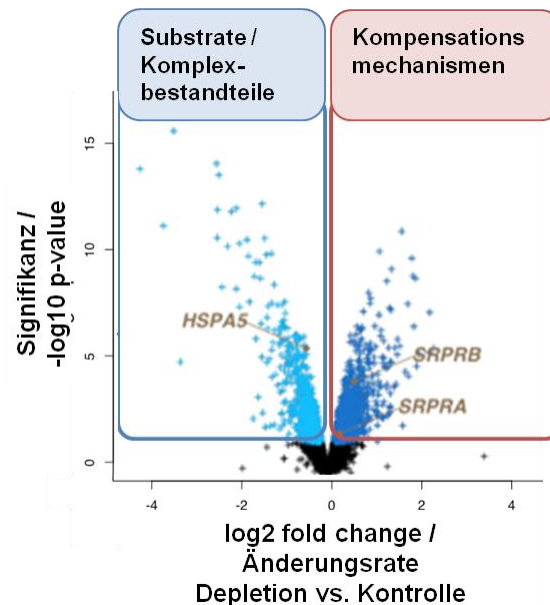
**Abbildung 79: Überprüfung der Depletionseffizienz von BiP mittels Western Blot.**

In drei biologischen Replikaten wurden HeLa-Zellen jeweils in Triplikaten gemäß 2.4.4.1 für 96 h mit *HSPA5* siRNA (#4), *HSPA5*-UTR siRNA (#5) bzw. Kontroll-siRNA behandelt und die Depletionseffizienz mittels Western Blot überprüft. **A** zeigt sowohl die Einzelwerte als auch den Mittelwert des jeweils quantifizierten Restproteingehalts von BiP. **B** zeigt einen repräsentativen Blot eines Experiments mit drei technischen Replikaten. Dazu wurden  $5,2 \cdot 10^6$  HeLa-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und mit 20 nM der jeweiligen siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h behandelt. Die Ernte erfolgte nach 72 h, anschließend wurden die Zellen gezählt und zur weiteren Analyse aufbereitet. Zur Überprüfung der Depletionseffizienz wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12 %), die Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von BiP erfolgte über einen passenden Antikörper aus dem Kaninchen, als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt an Cy5.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle und wurde über einen monoklonalen Primärantikörper Maus-anti- $\beta$ -Aktin und einen sekundären Ziege-anti-Maus-Cy3-Antikörper. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt. Zur weiteren Analyse wurden die Signale mittels Densitometrie quantifiziert, der relevante Proteingehalt auf den von  $\beta$ -Aktin normiert und die Kontrolle gleich 100 % gesetzt.

Um signifikante Veränderungen im Proteingehalt durch die *HSPA5* Depletion zu detektieren, wurden Daten der beiden Gruppen, d.h. der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen und der mit *HSPA5* siRNA behandelten Zellen statistisch untersucht ( $q < 0,05$ ).



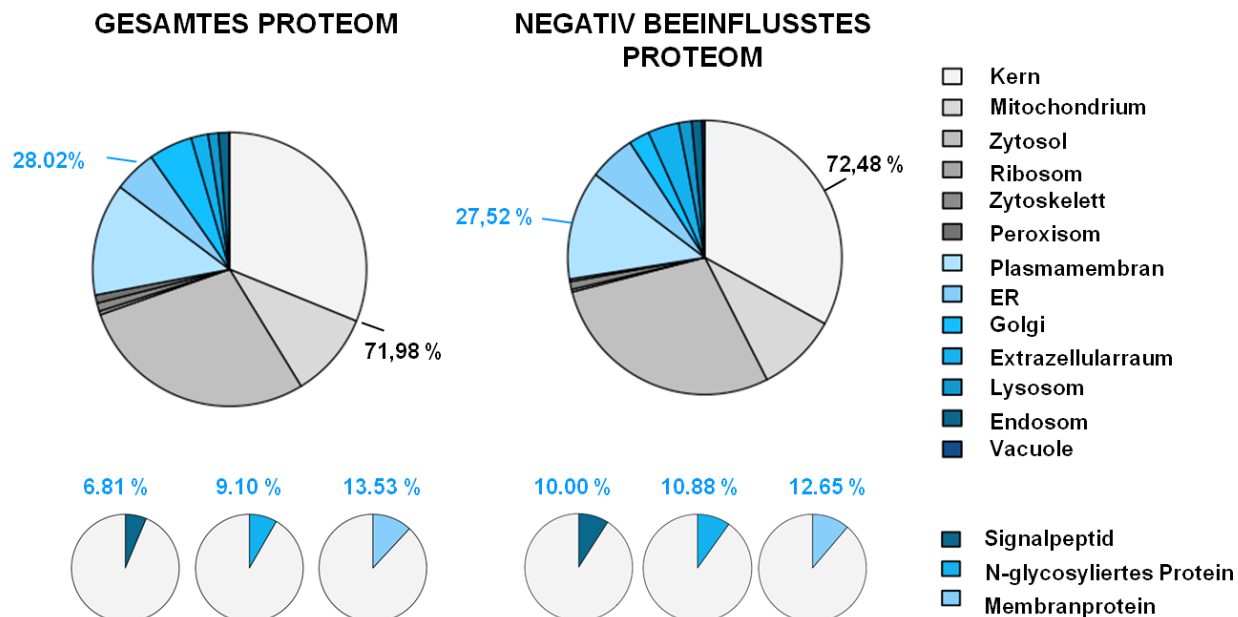
Dem Volcano Plot (Abbildung 80) ist die unterschiedliche Beeinflussung der nachgewiesenen Proteine innerhalb der massenspektrometrischen Analyse nach BiP Depletion im Vergleich zur Kontrolle zu entnehmen. „Log2 fold change“ bezeichnet dabei das Maß der Abweichung, „-log10 p-value“ ist das Maß der Signifikanz. Positiv beeinflusste Proteine nach BiP Depletion sind in dunkelblau, negativ beeinflusste in hellblau dargestellt.



**Abbildung 80: Volcano Plot zum Experiment nach siRNA vermittelter Depletion von *HSPA5***

Die Punkte im Volcano Plot repräsentieren alle massenspektrometrisch quantifizierten Proteine. Diese wurden dabei anhand der unterschiedlichen Beeinflussung nach *HSPA5* Depletion im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. „Log2 fold change“ bezeichnet dabei das Maß der Abweichung, „-log10 p-value“ ist das Maß der Signifikanz. Positiv beeinflusste Proteine nach *TRAPB* Depletion sind in dunkelgrün, negativ beeinflusste in hellgrün dargestellt.

In Abbildung 81 ist die subzelluläre Lokalisation der innerhalb der Proteomanalyse quantifizierten Proteine basierend auf Gene Ontology (GO) Annotationen dargestellt. Innerhalb des gesamten Proteoms konnten 28 % der Proteine dem sekretorischen Transportweg zugeordnet werden. Dieser Anteil wurde innerhalb der Gruppe negativ beeinflusster Proteine nicht verändert. Des Weiteren blieben auch der Anteil der Membranproteine sowie der Anteil der Glykoproteine konstant. Der Anteil derer Proteine, die ein Signalpeptid aufweisen, erhöht sich von 6 % auf 10 %.



**Abbildung 81: Subzelluläre Lokalisation der massenspektrometrisch quantifizierten Proteine nach *HSPA5* Depletion**

Dargestellt ist der Anteil der subzelluläre Lokalisation des gesamten Proteoms sowie des negativ beeinflussten Proteoms nach *HSPA5* Depletion basierend auf UniProtKB Daten. In blau sind die Organellen des sekretorischen Transportwegs gekennzeichnet. Zudem ist der Anteil derer Proteine markiert, die innerhalb der Gruppen ein Signalpeptid oder eine N-Glykosylierung aufweisen bzw. es sich um Membranproteine handelt.

### 3.8.2. Charakterisierung und Validierung identifizierter BiP-Substrate und Untersuchung auf TRAP-Abhängigkeit

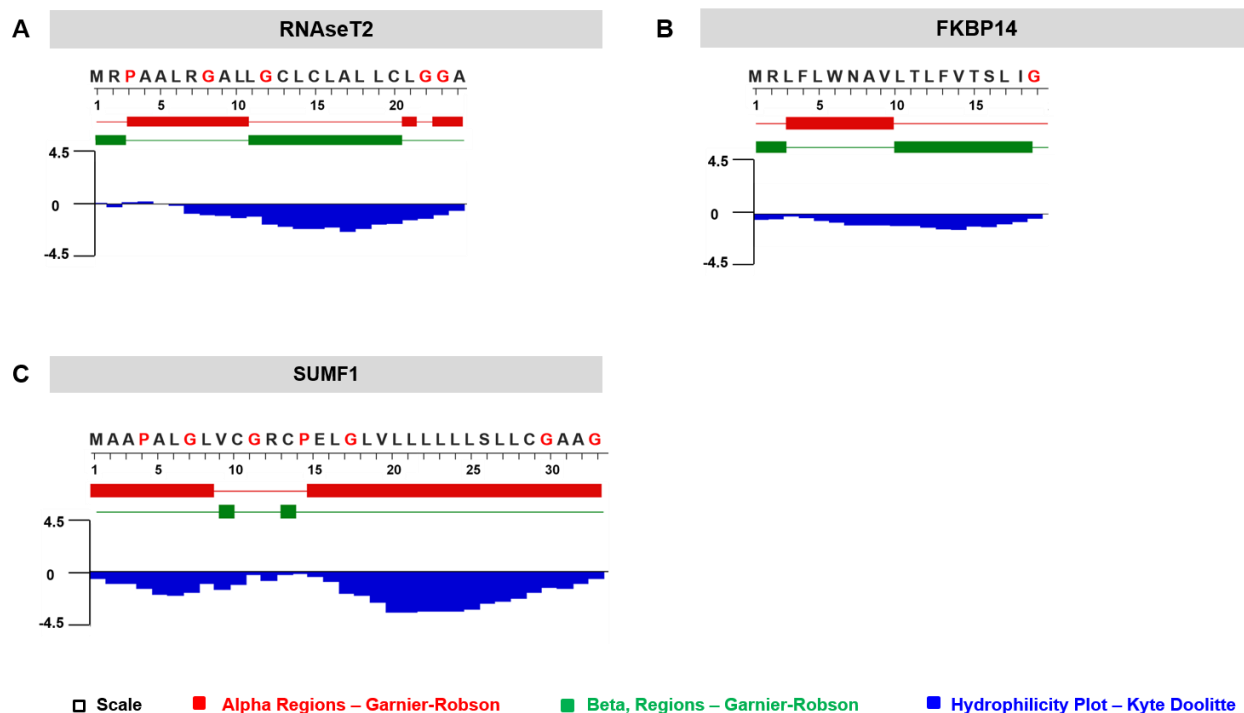
Die bioinformatisch gestützte Analyse der Proteine, die nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* quantitativ vermindert nachgewiesen wurden, zeigte gemeinsame Eigenschaften der Proteine in dieser Gruppe auf (3.3).

Auf die Validierung der innerhalb der Proteomanalyse identifizierten potentiellen BiP-Substrate auf endogener Ebene analog zu 3.2 wurde an dieser Stelle aus Zeitgründen verzichtet. In 3.6.1.3 und 3.6.2.2 wurde jedoch gezeigt, dass Transport und Prozessierung verschiedener plasmidkodierter Modellpolypeptide nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB* gehemmt wird. Gleichzeitig erfolgte der Nachweis der Effektverstärkung nach Depletion des Chaperons BiP mittels Subtilase AB Toxins.

Sowohl die Reduktion der Genexpression von *HSPA5* als auch die Spaltung des BiP-Proteins durch die Applikation des SubtilaseAB-Toxins zielen auf eine effiziente Reduktion des Gehalts von BiP in der Zelle ab. Die Stärken und Schwächen beider Vorgehensweisen wurden von Lang (2012) hinreichend diskutiert.

An dieser Stelle wichtig ist jedoch, dass die Reduktion des BiP-Gehaltes für eine nachfolgende Proteomanalyse und im Zuge weiterführender Untersuchungen mittels Transportassay in lebenden Zellen nicht mit gleicher Strategie durchführbar war. Aufgrund der sensiblen Handhabung des Toxins wurde der Gehalt von BiP in solchen Proben, welche extern der Proteomanalyse unterzogen wurden, durch 72-stündige Reduktion siRNA-vermittelte Depletion von *HSPA5* erreicht. Andererseits wurde mit Hilfe des Transportassay in lebenden Zellen zusätzlich zu BiP auch die Genexpression *TRAPB* durch RNAi reduziert. Hierbei war es wichtig lediglich Effekte, die primär auf der Reduktion der beiden Translokasekomponenten TRAP und BiP beruhen, zu beurteilen. Aufgrund der tragenden Rolle, welche BiP im Rahmen der UPR zu Teil wird (1.3.5.1 und 1.5), sollte die Reduktion des BiP-Gehalts möglichst schnell erreicht werden. Um solche Sekundäreffekte zu vermeiden, war die Anwendung des SubtilaseAB-Toxins für diese Experimente unabdingbar.

So wurden auch nach Proteomanalyse und bioinformatisch basierter Häufigkeitsanalyse *HSPA5*-depletierter HeLa-Zellen drei Modellproteine ausgewählt, um sie analog zur Untersuchung der TRAP-Modellsubstrate nach Überexpression hinsichtlich ihres Verhaltens nach Depletion von Translokasekomponenten zu analysieren. Daher wurden die Eigenschaften der Signalpeptide der zu untersuchenden Substrate in Abbildung 82 sowie Tabelle 31 verglichen. Dazu gehört die Aminosäuresequenz, in welcher helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) rot markiert sind. Mit Hilfe des Protean Vorhersage-Tools (DNASTAR / Lasergene 12) wurden alpha-helikale (rot) und beta-Faltblattstrukturen (grün) sowie das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle (blau) bestimmt.



**Abbildung 82: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der potentiellen BiP-Substrate RNaseT2, FKBP14 und SUMF1**

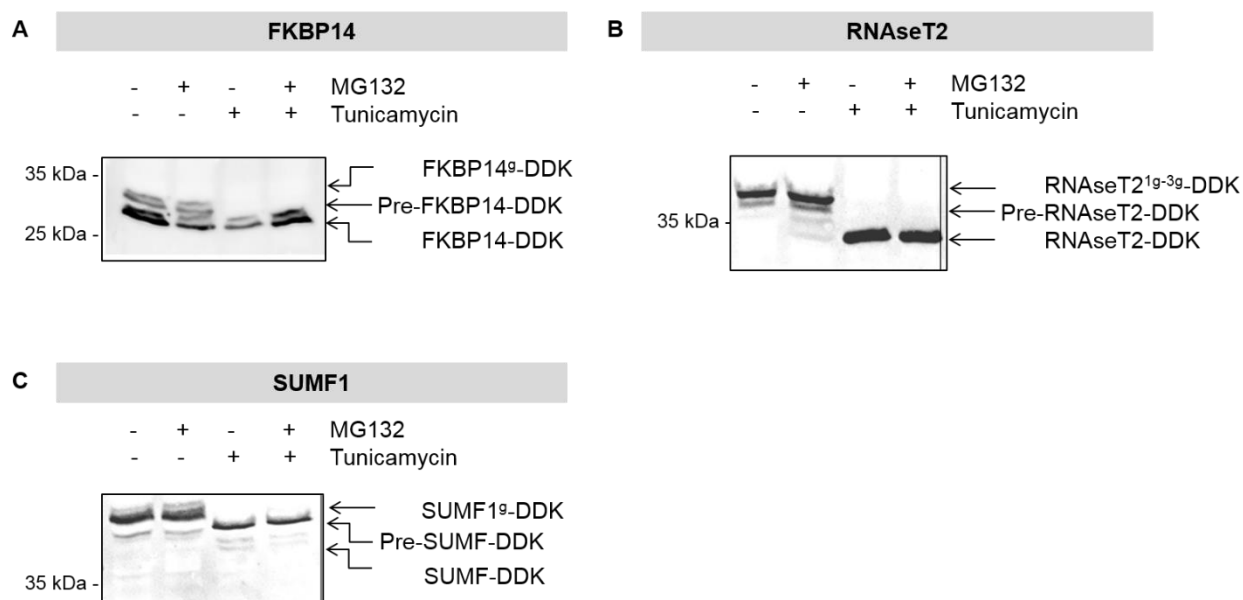
Die Aminosäuresequenz der Signalsequenz der Modellsubstrate **A** RNaseT2, **B** FKBP14 und **C** SUMF1 ist in dieser Abbildung dargestellt. Helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) sind rot markiert, mutierte Aminosäuren grün. Darunter sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche mit Hilfe des Protean Vorhersage-Tool (DNASTAR / Lasergene 12) alpha-helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen ausbilden. In blau ist das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle gezeigt

**Tabelle 31: Eigenschaften potentieller BiP-Substrate mit abspaltbarer Signalsequenz**

Die Aminosäuresequenzen von Signalpeptiden potentieller TRAP-Substrate sind zusammen mit der zugehörigen UniProtKB-ID des Proteins und Gennamen gelistet. Das Vorhandensein einer N-Glykosylierung (N-Glyk) oder Transmembrandomäne (TM) ist angezeigt. Der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin ist angegeben (GP [%]) genauso wie der Hydrophobizitätsscore (Hph) jeweils das Signalpeptid betreffend. Auf Grundlage der Phobius-Vorhersage ([www.phobius.sbc.su.se](http://www.phobius.sbc.su.se)) sind die Aminosäuresequenzen unterteilt in N-terminale, hydrophobe und C-terminale Domänen. Markiert sind außerdem Proteine, die ebenfalls nach Depletion von *SEC61A1* als vermindert nachgewiesen wurden (\*).

UniProt ID	Gen	Signalpeptid	TM	N-Glyk.	GP [%]	Hph
Q8NBK3*	SUMF1	MAAPALGLVCGRCPELGLVLLLLLLLSLLCGAAG	-	+	21,1	1,6
Q9NWM8*	FKBP14	MRLFLWNAVLTLFVTSLLIG	-	+	5,3	1,5
O00584*	RNASET2	MRPAALRGALLGCLCLALLCLGGA	-	+	20,8	1,3

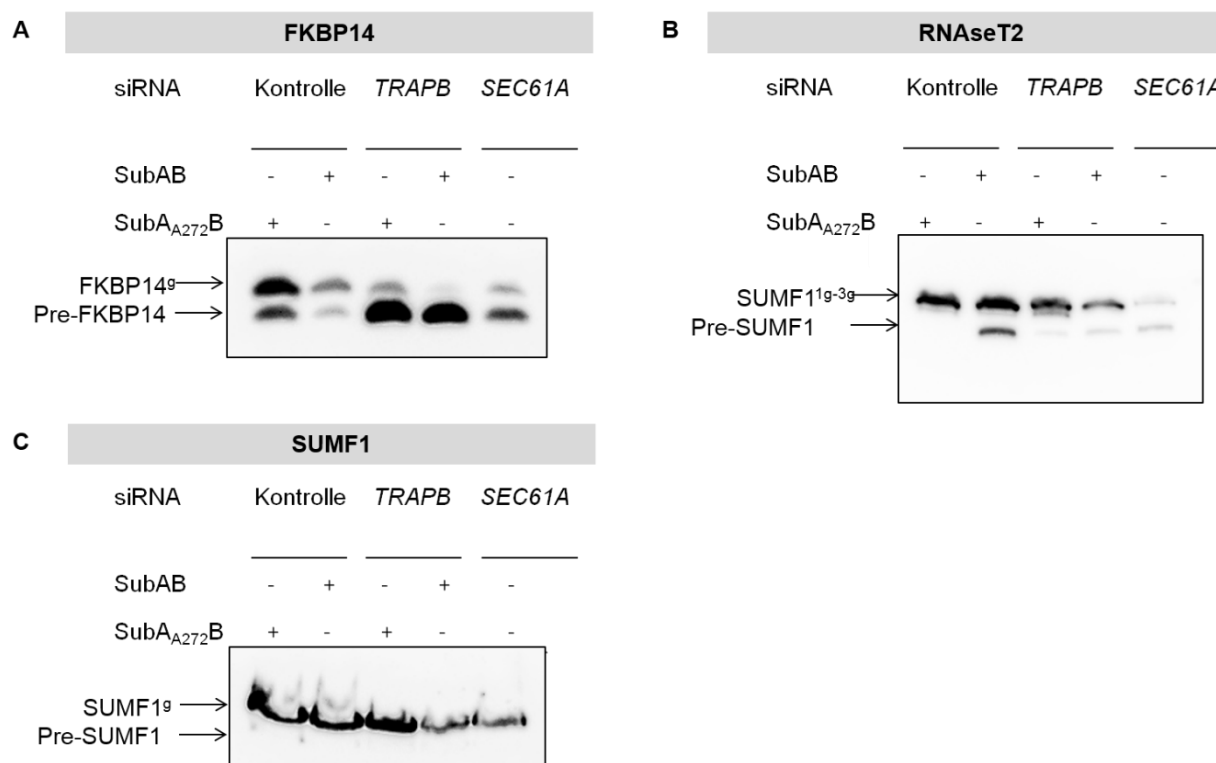
Um auf Basis des Western Blots die Signale einzelner Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modellsubstrate mit *Myc*-DDK-Tag zuordnen zu können, wurden diese im ersten Schritt charakterisiert gemäß 2.4.6.2. Das Ergebnis dieser Charakterisierungsstudie ist in Abbildung 83 dargestellt. HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Hemmung der N-Glykosylierung wurden die Zellen zusätzlich 2 h nach der Plasmid-Transfektion zusätzlich mit Tunicamycin manipuliert. Zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt. Nach 25-stündiger Expression des Plasmids erfolgte die Zellernte. Beispielhaft für FKBP14 (A) ist somit die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-FKBP14-DDK), importiertem FKBP14 nach Signalsequenzabspaltung (FKBP14-DDK) und der glykosylierten Form (FKBP14<sup>g</sup>-DDK) möglich.



**Abbildung 83: Charakterisierung der Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufer FKBP14, RNaseT2 und SUMF1.**

Mittels Western Blot werden unterschiedliche Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modellsubstrate FKBP14 (A), RNaseT2 (B) und SUMF1 (C) charakterisiert. Somit ist die Unterscheidung zwischen Vorläufer (Pre-FKBP14-DDK / Pre-RNaseT2-DDK / Pre-SUMF1-DDK), importiertem Polypeptid nach Signalsequenzabspaltung (FKBP14-DDK / RNaseT2-DDK / SUMF1-DDK) und den glykosylierten Formen FKBP14<sup>g</sup>-DDK / RNaseT2<sup>19-39</sup>-DDK / SUMF1<sup>9</sup>-DDK möglich. HeLa-Zellen wurden dazu ausgesät und gemäß 2.4.4.3 mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Hemmung der N-Glykosylierung wurden die Zellen zusätzlich 2 h nach der Plasmid-Transfektion zusätzlich mit Tunicamycin manipuliert. Zur Akkumulation des Vorläufers im Cytosol wurden die Zellen 8 h vor Ernte mit dem Proteasominhibitor MG132 versetzt. Nach 25-stündiger Expression des Plasmids erfolgte die Zellernte und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %, 6 \* 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur), die Proteine über *Semidry*-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis der Varianten mit *Myc*-DDK-Tag von FKBP14, RNaseT2 und SUMF1 erfolgte über einen anti-DDK-Antikörper von Origene aus dem Kaninchen. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt

Anschließend erfolgte eine Untersuchung der Transport- und Glykosylierungseffizienz nach plasmidkodierter Überexpression der charakterisierten Modellsubstrate nach Depletion von Translokasekomponenten. Dazu wurde der Transport-Assay gemäß Kapitel 2.4.6 nach Depletion von *TRAPB*, BiP oder *SEC61A1* verwendet. Abbildung 84 zeigt die Ergebnisse der Translokationsuntersuchung mit einem Experiment.



**Abbildung 84: Analyse der Translokation plasmidgetriebener Modell-Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten**

Gemäß 2.4.6 wurde die Translokation und Prozessierung plasmidgetriebener Modell-Substrate nach Depletion von Translokasekomponenten untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Kontroll-, *TRAPB*-UTR oder *SEC61A1* siRNA zum Zeitpunkt 0 h und 24 h manipuliert. Nach 72 h erfolgte die Plasmidtransfektion. 9 h vor Ernte wurden die Zellen mit dem Toxin Subtilase AB zur Spaltung des Chaperons BiP oder seiner inaktiven Form SubA<sub>A272</sub>B als Kontrolle versetzt. Eine Stunde später wurde der Proteasominhibitor MG132 zu allen Proben hinzugegeben. Zum Zeitpunkt 96 h erfolgte die Ernte der Zellen und Aufbereitung des Zelllysats. Dieses wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (15 %), die Proteine über Tank-Blot-Verfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert und durch immunologische Detektion analysiert. Der Nachweis von (A) FKBP14, (B) RNaseT2 und (C) SUMF1 mit *Myc*-DDK-Tag erfolgte über einen Kaninchen-anti-DDK-Antikörper von Origene. Als Sekundärintikörper wurde ein Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt an POD verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden gemäß Tabelle 4 in 5 % Magermilchlösung verdünnt.

Wie sich bereits durch den Western Blot des Charakterisierungsexperiments zu SUMF1 andeutete, war die Expression der plasmidgetriebenen Variante von SUMF1 zu schlecht um Aussagen über das Prozessierungsverhalten des Proteins nach genetischer Manipulation der Zellen zu treffen. Hinsichtlich FKBP14 (A) konnte eine verminderte Proteinprozessierung nach Einzeldepletion der Translokasekomponenten BiP und *TRAPB* nachgewiesen werden. Dieser Effekt verstärkte sich durch die simultane Depletion beider Komponenten. In Bezug auf RNAseT2 ist lediglich ein negativer Einfluss auf die Proteinprozessierung nach der Spaltung von BiP nachweisbar (B).

## 4. Diskussion

### 4.1. Charakterisierung des TRAP-Substratspektrums

#### 4.1.1. Der TRAP-Komplex ist an der Translokation bestimmter Polypeptide in das ER-Lumen beteiligt

Proteine, welche dem sekretorischen Weg angehören, müssen nach ihrer Synthese zunächst in das ER transportiert, dort prozessiert und schließlich zum Zielort innerhalb der Zelle weitergeleitet werden, wo sie ihre Funktion ausüben (Blobel & Dobberstein, 1975 I & II).

Durch den Sec61-Komplex wird die co- oder posttranslationale Translokation von Polypeptiden mit N-terminaler Signalsequenz oder Transmembrandomäne in das ER ermöglicht (Dudek et al., 2015; Pfeffer et al., 2016).

Der Sec61-Komplex ist zur effizienten Translokation jedoch auf Hilfskomponenten angewiesen, mit welchen gemeinsam der Translokase-Komplex gebildet wird. Solche unterstützenden Komponenten fungieren meist in substratspezifischer Art und Weise, wie z.B. der TRAP-Komplex (Fons et al., 2003). Die genauen substratspezifischen Funktionen des TRAP-Komplexes blieben bisher jedoch weitestgehend unverstanden (Pfeffer et al., 2017). Im Zuge der hier vorliegenden Arbeit galt es diese Fragestellung aufzugreifen und das Substratspektrum zu analysieren, welches in Abhängigkeit zu TRAP während der Translokation in das ER steht.

Bisher erfolgten Transportuntersuchungen hinsichtlich der substratspezifischen Eigenschaften des TRAP-Komplexes im Säuger in vitro an rekonstituierten ER-Membranen mit einer stark begrenzten Auswahl an artifiziellen Modellsubstraten (Fons et al., 2003). Alternativ dazu erfolgten pulse-chase Experimente in intakten humanen Zellen, in welchen Modellsubstrate überexprimiert wurden (Sommer et al., 2013). Diese Ansätze zum Studium der Eigenschaften einzelner Bestandteile des Translokase-Komplexes sind nützlich, um für einzelne, bestimmte Substrate zu untersuchen, inwiefern eine Beteiligung während des ER-Imports oder der Prozessierung vorliegt. Ungeeignet sind diese Methoden jedoch für eine grundlegende und umfassende Beurteilung der determinierenden Eigenschaften, die zur Abhängigkeit der Substrate führen.

Aus diesem Grund wurde innerhalb dieser Arbeit eine Studie zur Identifizierung und Charakterisierung des nativen Proteinspektrums, welche in Abhängigkeit zum TRAP-Komplex stehen, in humanen Zellen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Die Vorgehensweise zur Charakterisierung der TRAP-abhängigen Vorläuferpolypeptide ist in Abbildung 25 (Kapitel 3.1) schematisch dargestellt.



Die zu untersuchende Komponente, in diesem Fall der TRAP-Komplex, wurde mittels RNAi in humanen HeLa-Zellen depletiert. Resultierende quantitative Veränderungen des Gehalts von Proteinen wurden anschließend mittels markierungsfreier Proteomanalyse sowie bioinformatischer Proteinhäufigkeitsbestimmung identifiziert.

#### **4.1.2. Konzept und Machbarkeitsstudie als Grundlage zur Identifizierung der TRAP-Substratspektrums**

Die grundlegende Idee zur Identifizierung des TRAP-Substratspektrums beruht darauf, dass Proteine, die zur korrekten Prozessierung auf den TRAP-Komplex angewiesen sind, in dessen Abwesenheit im Cytosol akkumulieren und schließlich proteasomal abgebaut werden (Brodsky & McCracken, 1999). Nach diesem Mechanismus wären betroffene Substrate quantitativ vermindert innerhalb des Proteoms im Gegensatz zu den nicht-manipulierten Kontrollzellen, welche weiterhin über den TRAP-Komplex verfügen. Im Zuge der Transportuntersuchungen nach plasmidkodierter Überexpression von Substraten erfolgte die Bestätigung dieses Mechanismus. Nach der Depletion einer zur Translokation notwendigen Komponente in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG132 wurden Vorläufer von Proteinen mittels Western Blot nachgewiesen. Diese Depletion hatte den inhibierten Import des Substrats in das ER zur Folge, sodass das Signalpeptid nicht mit Hilfe des Signalpeptidase-Komplexes vom reifen Teil des Proteins entfernt wurde. Im Western Blot resultierte daraus ein Massenshift des Proteinsignals um die Größe des Signalpeptids, was daher für die Akkumulation des Vorläufers im Cytosol spricht.

Die Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung des TRAP-Substratspektrums basieren auf einer Vorgehensweise, welche in diesem Zusammenhang noch nie angewendet wurde. Aus diesem Grund war es zunächst nötig, die Methode an sich im Vorfeld zu prüfen, um den Nutzen für die eigentliche Anwendung, der Identifizierung des TRAP-Substratspektrums, zu beurteilen.

Die prinzipielle Durchführbarkeit des Vorhabens wurde zu diesem Zweck anhand der Identifizierung und Charakterisierung des Sec61-Substratspektrums belegt. Der Sec61-Komplex ist durch eine Vielzahl funktioneller Untersuchungen bis dato sehr gut charakterisiert (Dudek et al., 2015; Lang et al., 2017). Aus diesem Grund ließen sich die Ergebnisse der Proteinhäufigkeitsbestimmung basierend auf den Daten der Proteomanalyse nach *SEC61A1*-Depletion einordnen und innerhalb dieser Machbarkeitsstudie hinsichtlich der Sinnhaftigkeit bewerten. Die siRNA vermittelte Depletion des Sec61-Komplexes ist in der Arbeitsgruppe eine etablierte Methode. Dabei wird eine Reduktion der *SEC61A1* Genexpression auf etwa 10 % Restproteingehalt erreicht.

Lang et al. (2012) konnten zeigen, dass die effiziente Depletion von *SEC61A1* für 96 h nicht zu Veränderungen in Zellwachstum und Viabilität oder morphologischen Veränderungen von ER oder der gesamten Zelle führt.

Die Depletionseffizienz des Sec61-Komplexes wurde sowohl durch Western Blot Analyse als auch durch die Proteinhäufigkeitsbestimmung der MS-Daten innerhalb dieser Arbeit verifiziert. Insgesamt wurden durch die massenspektrometrische Analyse etwa 50 % des Proteoms der HeLa-Zellen quantitativ nachgewiesen. Gleichzeitig repräsentierten auch die Anteile der identifizierten Membran- und Glykoproteine sowie der Proteine mit Signalpeptid ein vergleichbares Abbild des Gesamtproteoms der HeLa-Zellen (Landry et al., 2013; Nagaraj et al., 2011).

Durch die vergleichende statistische Auswertung der Proteomdatensätze der beiden mit zwei verschiedenen siRNAs an Sec61 $\alpha$ -depletierten HeLa-Zellen gegenüber Kontrollzellen wurden quantitative Veränderungen bestimmter Proteine nachgewiesen. Im Zuge dessen konnte bestätigt werden, dass alle Untereinheiten des Sec61-Komplexes,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , aufgrund der *SEC61A1* Depletion degradiert werden (Lang, et al., 2012). Die restlichen quantitativ negativ beeinflussten Proteine konnten überwiegend Organellen des sekretorischen Wegs zugeordnet werden. Da der Sec61-Komplex für die Biogenese von Proteinen, welche diesem Wege zugehörig sind, als eine Schlüsselkomponente fungiert, war es zu erwarten, dass z.B. sekretorische Proteine durch die Degradation des Translokationskomplexes weder in das ER zur vollständigen Prozessierung gelangen noch anschließend zu ihrem Zielort, sondern bereits im Cytosol proteasomal abgebaut werden, was zu einer quantitativen Verminderung innerhalb des Proteoms führt.

Im experimentellen Ansatz mittels Proteomanalyse nach siRNA vermittelter Depletion von *SEC61A1* war der Anteil der Sec61 Substrate geringer als mit 30 % des Gesamtproteoms erwartet (Chen et al., 2005; Wallin & von Heijne, 1998). Ein möglicher Grund dieser Beobachtung könnte sein, dass einige Vorläuferpolypeptide eine deutlich längere Halbwertszeit als *SEC61A1* haben und daher nach 96-stündiger Depletionszeit noch nicht signifikant in ihrer Abundanz reduziert waren. Andererseits könnten die nicht identifizierten Sec61-Substrate im Vergleich zu den identifizierten im Durchschnitt eine höhere Affinität zum Sec61-Komplex haben und somit auch bei einer verminderten Menge zugänglicher Translokons weiterhin effizient transportiert und prozessiert werden.

Darüber hinaus wurden aufgrund der Depletion des Sec61-Komplexes auch einige Proteine quantitativ positiv beeinflusst nachgewiesen. Darunter sind solche Proteine zu finden, welche kompensatorisch auf den Verlust des Sec61-Komplexes wirken könnten, wie z.B. die beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des SRP-Rezeptors, was bereits in früheren Studien beobachtet wurde (Lang, et al., 2012).

Zusammenfassend wurde die experimentelle Strategie in humanen Zellen erfolgreich dahingehend bewertet, das Substratspektrum des Sec61-Komplexes zu charakterisieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Voraussetzungen erfüllt sind, um eine nachfolgende Analyse hinsichtlich des Substratspektrums des TRAP-Komplexes durchzuführen.

#### **4.1.3. Identifizierung von TRAP-Substraten nach siRNA vermittelter Depletion von *TRAPB***

Zur Identifizierung des Sec61-Substratspektrums wurde die in Abbildung 25 dargestellte Strategie innerhalb der Machbarkeitsstudie positiv bewertet. Auf dieser Grundlage wurde die gleiche Strategie zur Charakterisierung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes angewendet. Die Depletion des TRAP-Komplexes erfolgte unter Verwendung von zwei unterschiedlichen *TRAPB* siRNAs sowie einer Kontroll-siRNA.

Die effiziente Depletion von *TRAPB* wurde bereits in früheren Studien angewandt und führte nachweislich zu keiner Veränderung hinsichtlich Wachstum und Viabilität der Zellen sowie morphologischen Veränderungen des ER bzw. der gesamten Zelle. Gleichzeitig konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Depletion der  $\beta$ -Untereinheit zur Destabilisierung des gesamten Komplexes führt (Pfeffer, et al., 2014).

Die Daten der massenspektrometrischen Analysen der insgesamt neun Proben wurden hinsichtlich der quantitativen Veränderungen mittels Proteinhäufigkeitsbestimmung analysiert. Wie erwartet wurde unter den negativ beeinflussten Proteinen die zu depletierende  $\beta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes nachgewiesen, sowie die restlichen Komponenten TRAP $\alpha$ , TRAP $\gamma$  und TRAP $\delta$ . Dies wurde parallel auch mittels Western Blot verifiziert. Des Weiteren umfasst die Gruppe der nach *TRAPB* Depletion verminderten Proteine potentielle TRAP-Substrate, welche aufgrund der Abhängigkeit zum TRAP-Komplex zur effizienten Translokation in das ER dem proteasomalen Abbau im Cytosol unterlagen.

Der Nachweis von etwa 6000 Proteinen mit Hilfe der MS-Analyse zeigte ein ähnlich gutes Ergebnis wie zuvor innerhalb der Machbarkeitsstudie zur Identifizierung des Sec61-Substratspektrums. Gleichmaßen wurde innerhalb der Proteinhäufigkeitsbestimmung eine Zuordnung der Proteine nach GO-Annotationen hinsichtlich Lokation innerhalb der Zelle sowie Vorhandensein von Signalpeptid, Transmembrandomänen oder N-Glykosylierungen vorgenommen. Der quantifizierte Anteil der einzelnen Gruppen deckt sich mit den Ergebnissen zu Untersuchungen des HeLa-Proteom und –Genom betreffend (Nagaraj et al., 2011; Landry et al., 2013).

Jedoch konnten allein durch diese Zuordnungen keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob beispielsweise Proteine eines bestimmten Kompartiments oder etwa Glykoproteine vorrangig vom Fehlen des TRAP-Komplexes betroffen sind.

Da vor allem Proteine des sekretorischen Wegs negativ von der Depletion von *TRAPB* beeinflusst waren, konnte angenommen werden, dass die Vorläuferpolypeptide dieser Gruppe (38 Proteine mit Signalpeptid, 22 Proteine Membranproteine) Substrate des TRAP-Komplexes sind. Da dieser effizient depletiert wurde, könnten die Vorläuferpolypeptide im Cytosol durch das Proteasom abgebaut werden, da sie die Unterstützung des TRAP-Komplexes benötigen um in das ER-Lumen durch den Sec61-Kanal transloziert zu werden. Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, dass die Anzahl negativ betroffener Proteine geringer war im Vergleich zu derer nach *SEC61A1* Depletion.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die Gruppen der Proteine, die aufgrund der Depletion negativ in ihrer Quantität beeinflusst wurden, nach *TRAPB* oder *SEC61A1* Depletion nur zu 40 % überschneiden. Diese Beobachtung könnte mit den Ergebnissen einer früheren Studie in Verbindung stehen: Hierbei wurde für bestimmte Modellsubstrate gezeigt, dass es einen inversen Zusammenhang zwischen der Effizienz des Sec61-Gating und der Abhängigkeit zum TRAP-Komplex gibt (Fons et al., 2003).

Dabei ist jedoch zu bedenken, dass der essentielle Sec61-Komplex für die Translokation aller sekretorischer Proteine nötig ist, der nicht essentielle TRAP-Komplex als Hilfskomponente nur an der Prozessierung einer bestimmten Gruppe von Substraten beteiligt ist. Dementsprechend ist der TRAP-Komplex nicht in jeden Proteintransportvorgang involviert. Des Weiteren ist auch im Zusammenhang zum TRAP-Komplex zu beachten, dass nur Proteine mit vergleichsweise kürzerer Halbwertszeit als *TRAPB* als potentiell TRAP-abhängige Substrate identifiziert werden konnten. Solche unterlagen der Anforderung in allen Experimenten als signifikant vermindert nachgewiesen zu sein. Einige Proteine, wie z.B. die ER-luminalen Proteine *Sil1* und *Calreticulin*, wurden nach 96-stündiger Depletion des TRAP-Komplexes nur in einzelnen Experimenten als signifikant reduziert eingestuft und wurden daher in erster Instanz nicht in weitere bioinformatische Analysen miteinbezogen. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Anzahl der potentiellen TRAP-Substrate als beachtlich einzuordnen. Möglicherweise hätte die massenspektrometrische Analyse mit folgender Proteinhäufigkeitsbestimmung nach verlängerter Depletionszeit von *TRAPB* dazu geführt, dass noch weitere Proteine quantitativ vermindert und somit das Substratspektrum erweitert würde. In vorhergehenden Studien wurde nachgewiesen, dass die 96-stündige Depletion zur nahezu vollständigen Reduktion von TRAP $\beta$  ohne Beeinflussung wichtiger Zellparameter führt (Pfeffer, et al., 2017).

Die Verlängerung der Depletionszeit erfordert eine erneute siRNA-Transfektion nach 120 h, wie sie im Zuge der kinetischen Analysen der Validierungsexperimente durchgeführt wurde. Hierbei konnte für keines der untersuchten Substrate eine maßgeblich stärkere Reduktion der Proteinmenge für die Zeitpunkte 120 h und 144 h nachgewiesen werden. Von daher ist der gewählte Zeitpunkt zur massenspektrometrischen Analyse mit 96 h nach siRNA-Ersttransfektion als passend zu bewerten, um unter weitestgehend physiologischen Bedingungen die Veränderungen des Proteoms zu untersuchen, die auf den Verlust des TRAP-Komplexes zurückzuführen sind.

Wie in jedem biologischen Experiment spielen Artefakte eine Rolle, welche auf die Vielzahl an jeweils fehleranfälligen Teilschritten zurückzuführen sein können. Diesen Gründen könnten auch die Diskrepanzen in der Anzahl identifizierter Proteine vergleichend zwischen den einzelnen Experimenten geschuldet sein. Sich den potentiell resultierenden falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse bewusst zu sein, ist an dieser Stelle unerlässlich, um ein System innerhalb der Gruppe potentieller TRAP-Substrate zu erkennen und dieses auf Gültigkeit zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden im Zuge der Proteinhäufigkeitsbestimmung Einschränkungen der möglichen Ergebnisse hinsichtlich der Proteineigenschaften vorgenommen: Die Gruppe derer Proteine, welche quantitativ negativ durch den Verlust des TRAP-Komplexes betroffen waren, wies wie bereits erwähnt, kein direkt ersichtliches, einheitliches Bild der Proteineigenschaften auf (Glyko- / Membranproteine, Lokalisation). Aufgrund des beschriebenen Modells in 1.2 und 3.1 wurde jedoch davon ausgegangen, dass in erster Linie Proteine des sekretorischen Wegs direkt vom Verlust des TRAP-Komplexes wie auch des Sec61-Komplexes betroffen sind. Alle anderen Proteine, die zu Organellen außerhalb des sekretorischen Wegs gehören oder keine Erkennungssequenz zum zielgerichteten Transport zum Translokon aufweisen, könnten in sekundärer Art und Weise negativ betroffen sein. So könnte sich z.B. die Depletion und somit fehlende Funktion eines „echten“ TRAP-Substrats als nächsten Schritt negativ auf andere Proteine auswirken. Proteine des sekretorischen Wegs zeichnen sich vor allem durch das Vorhandensein einer N-terminalen Transmembrandomäne oder einer abspaltbaren Signalsequenz aus. Zur Untersuchung der direkten TRAP-Substrate wurde der Fokus der bioinformatischen Untersuchungen auf diese Gruppe gelegt (3.3).

#### 4.1.4. Validierung der TRAP-Substrate

Zur Unterstützung der bisher gewonnenen Ergebnisse, wurden Validierungsexperimente durchgeführt. Diese umfassten unabhängige Experimente, in welchen gleichermaßen zu den MS-Analysen HeLa-Zellen für 96 Stunden mit jeweils einer der beiden *TRAPB* betreffenden siRNAs oder einer Kontroll siRNA transfiziert wurden. Nach passender Aufbereitung der Zellen, wurde mittels semiquantitativem Western Blot eine Quantifizierung bestimmter Proteine vorgenommen. Außerdem wurden die Auswirkungen der siRNA-Behandlung auf transkriptioneller Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Zur finalen Validierung der TRAP-Substrate wurden Experimente zur Rettung des Phänotyps, hervorgerufen durch die Depletion des TRAP-Komplexes, durchgeführt. Durch diese Validierungsexperimente wurde bestätigt, dass die Transfektion der HeLa-Zellen mit der verwendeten *TRAPB* oder *TRAPB*-UTR siRNA dazu führt, dass die restlichen Untereinheiten des TRAP-Komplexes degradiert werden. Dieser Effekt ließ sich durch simultane Expression mit einer siRNA-resistenten für *TRAPB* kodierenden cDNA retten, was bedeutet, dass der Verlust von TRAP $\beta$  einen direkten Effekt auf die Stabilität des TRAP-Komplexes hat. Allerdings war der Restproteingehalt bei unveränderter mRNA-Menge von TRAP $\alpha$  mit etwa 40 % deutlich gegenüber den anderen Komplexbestandteilen erhöht. Andererseits zeigte die Depletion von TRAP $\alpha$  eine gleichartige Wirkung auf den Restproteingehalt von TRAP $\beta$ . Beide Komplexbestandteile wurden durch die reduzierte Genexpression der jeweils anderen Untereinheit quantitativ auf minimal 40 % Restproteingehalt vermindert. Dieser Effekt konnte bereits nach 72-stündiger Depletionszeit beobachtet werden und blieb auch über die nächsten 72 Stunden hinweg konstant. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass TRAP $\alpha$  eine stabilisierende Funktion innerhalb des TRAP-Komplexes inne hat (Pfeffer et al., 2017), spricht diese jedoch gleichermaßen auch TRAP $\beta$  zu.

Als zu validierende TRAP-Substrate wurden verschiedene Proteine ausgewählt, welche dem sekretorischen Weg anhand von GO-Annotationen zugeordnet wurden. Die Untersuchungen mittels qRT-PCR und Western Blot nach Depletion von *TRAPB* sowie Komplementationsanalysen führten zur Validierung der Proteine PPIC, ACP2 und TMED5 als echte TRAP-Substrate.

Innerhalb der Proteomanalyse wurden auch die Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b des OST-Komplexes als potentielle TRAP-Substrate identifiziert. Die zusätzlichen Experimente auf Western Blot Basis identifizierten alle drei zu validierenden Proteine als echte TRAP-Substrate. Die Depletion von *TRAPB* führte somit zur signifikanten Reduktion des jeweiligen Proteingehalts der TRAP-Substrate. Die direkte Abhängigkeit zum TRAP-Komplex konnte durch die Komplementationsanalyse bestätigt werden, da durch die zur Depletion simultane Expression von *TRAPB* siRNA-resistenter *TRAPB* cDNA der Proteingehalt der OST-Komponenten auf

Kontrollniveau wiederhergestellt werden konnte. Die recht hohe Standardabweichung der Western Blot Daten in Bezug auf Dad1 ist auf die z.T. schwache Qualität der Western Blots zurückzuführen. Durch die genügend hohe Anzahl an Experimenten konnte jedoch die Signifikanzgrenze erreicht werden und Dad1 als TRAP-Substrat identifiziert werden. Vergleichend zwischen den Ergebnissen der Proteomanalyse und den Western Blot basierenden Daten fällt eine Diskrepanz des Restproteingehalts der OST-Untereinheiten nach *SEC61A1* siRNA Behandlung auf. So scheinen die Proteine Stt3b und Dad1 fast nicht von der Depletion des Sec61-Komplexes betroffen zu sein. Bei Betrachtung der Rohdatensätze zeigt sich jedoch, dass Dad1 innerhalb eines Experiments nicht in allen Proben der drei technischen Replikate in Experiment 1 nachgewiesen wurde. Zudem fällt auf, dass die quantifizierten Proteinmengen zwischen den beiden durchgeführten Experimenten deutlich unterschiedlich bei gleichzeitiger geringer Standardabweichung waren (Daten nicht gezeigt). Im Falle von Stt3b traten hohe Schwankungen innerhalb der quantifizierten Proteinmenge der Triplikate auf. Aufgrund der Daten, welche mittels Western Blot nach *SEC61A1* Depletion hinsichtlich Stt3b und Dad1 erhoben wurden, konnte jedoch klar eine reduzierte Proteinmenge verifiziert werden.

Die beiden ER-luminalen Proteine Sil1 und Calreticulin wurden innerhalb der Proteomanalyse nur nach Manipulation der HeLa-Zellen mit einer der beiden verwendeten siRNAs zur Depletion von *TRAPB* als potentiell TRAP-Substrat vorgeschlagen.

Aufgrund der wichtigen Funktionen, die die Proteine Sil1 und Calreticulin im ER erfüllen, wurde beide Proteine mit in die Experimente zur Validierung der TRAP-Substrate aufgenommen. Innerhalb der unabhängigen Depletionsexperimente wurden mittels semi-quantitativer Western Blot Analyse sowohl Sil1 als auch Calreticulin als TRAP-abhängiges Substrat validiert. Gleichermaßen erfolgte die Validierung auch hinsichtlich des in den ERAD-Prozess involvierten Proteins Sel1. Bei allen dreien wurde die quantitative Verminderung mit einer der beiden verwendeten *TRAPB* siRNAs hoch signifikant nachgewiesen. Durch Anwendung der jeweils anderen siRNA wurde auf Basis der Western Blot Analyse eine quantitative Reduktion gezeigt, welche jedoch durch die hohen Standardabweichungen zwischen den einzelnen Experimenten statistisch nicht signifikant war.

Unter dem Gesichtspunkt, dass die final dargestellten Daten der MS-Analyse auf dem Mittelwert aller Experimente nach *TRAPB*-Depletion unter Anwendung beider siRNAs basieren, ist die Vergleichbarkeit der massenspektrometrisch und der Western Blot basierten Ergebnisse sehr hoch.

#### **4.1.5. Vergleich der TRAP-Substratspektren transient TRAP-depletierter HeLa-Zellen und chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten**

Zusätzlich zu den Untersuchungen des HeLa-Proteoms nach Manipulation mittels RNAi erfolgten massenspektrometrische Analysen sowie Proteinhäufigkeitsbestimmungen von Fibroblasten dreier CDG-Patienten. Mutationen in den TRAP $\gamma$  bzw. TRAP $\delta$ -Untereinheiten führen dabei zur chronischen Depletion des TRAP-Komplex (Pfeffer et al., 2017; Losfeld et al., 2014; Ng et al., 2015).

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen zeigten, dass es nur wenige Überschneidungen der Substratspektren chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten und transient TRAP-depletierter HeLa-Zellen nach siRNA-Behandlung gab. Innerhalb der Validierungsexperimente auf Western Blot Basis wurde gezeigt, dass sich die Ergebnisse der CDG-Fibroblasten größtenteils mit den Resultaten der mit siRNA manipulierten HeLa-Zellen decken. Grundsätzlich sind diese Ergebnisse mit Vorsicht hinsichtlich der eingeschränkt erhobenen Datenmenge zu beurteilen. Sowohl die massenspektrometrische als auch Western Blot Analyse wurde pro Patient lediglich einmal durchgeführt. Zu den bereits erläuterten methodischen Variabilitäten wurden darüber hinaus z.T. starke Unterschiede hinsichtlich der Proteinkonzentrationen sowohl vergleichend zwischen den CDG-Patientenzellen als auch den beiden kommerziell erworbenen Kontrollfibroblasten nachgewiesen. Letztere betreffend wurde daher eine der beiden zur Verfügung stehenden Kontrollen für weitere Auswertungen außer Acht gelassen.

Zu beachten ist darüber hinaus, dass es sich zwischen beiden untersuchten Zellarten große Unterschiede gibt. So handelt es sich bei den dreien untersuchten CDG-Fibroblasten um Primärzellen. Der Phänotyp aller drei untersuchter chronisch TRAP-defizienter Fibroblasten wurde aufgrund unterschiedlicher SSR3 bzw. SSR4 Mutationen hervorgerufen. Dementsprechend sind unterschiedlich starke Ausprägungen des Phänotyps sowie adaptiver Kompensationsmechanismen auf den Verlust des TRAP-Komplexes zu erwarten. Letztere sind sehr wahrscheinlich viel stärker ausgeprägt im Vergleich zu den HeLa-Zellen, welche maximal 144 h zur Depletion des TRAP-Komplexes mittels RNA-Interferenz verändert wurden. Die Adaptionen der chronisch TRAP-depletierten Fibroblasten verlief dagegen über Jahre hinweg. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine metastasierende Zelllinie eines Adenokarzinoms der Zervix. Kontinuierliche, immortalisierte Zelllinien, wie die verwendeten HeLa-Zellen, sind auch aufgrund der sehr hohen Teilungsraten genetisch variabler als primäre Zellen. Von daher waren bereits generelle Unterschiede zwischen dem HeLa-Proteom und dem Proteom der Fibroblasten zu erwarten.



Wichtig an dieser Stelle ist jedoch die Feststellung, dass die Tendenzen der zuvor als determinierende Eigenschaften der als TRAP-Substrate identifizierten Proteine in HeLa-Zellen nach transienter TRAP-Depletion auch für die negativ beeinflussten Proteine der chronisch TRAP-depletierten Fibroblasten nachvollzogen werden konnten.

#### **4.2. TRAP-Substrate weisen bestimmte Eigenschaften auf**

Durch nähere bioinformatische Untersuchungen der massenspektrometrisch identifizierten TRAP-Substrate konnten determinierende Eigenschaften der Signalpeptide bzw. N-terminale Transmembrandomänen der TRAP-Substrate, welche dem sekretorischen Weg anhand GO-Annotationen zugeordnet wurden, charakterisiert werden. So zeigten abspaltbare Signalpeptide und N-terminale Transmembrandomänen potentieller TRAP-Substrate eine geringere Hydrophobizität im Vergleich zu solchen Proteinen, die nicht negativ vom Verlust des TRAP-Komplexes betroffen waren. Deutlichere Unterschiede fielen darüber hinaus hinsichtlich der Aminosäurekomposition innerhalb der abspaltbaren Signalpeptide auf, da der Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin deutlich erhöht war. Die gleiche Tendenz wurde für N-terminale Transmembrandomänen beobachtet, jedoch weniger stark ausgeprägt. Dieser Unterschied ist hinsichtlich der weiteren Prozessierung nach dem ER-Import schlüssig: N-terminale Transmembrandomänen können wie auch abspaltbare Signalpeptide für einen gerichteten Transport zur ER-Membran kodieren. Allerdings erfolgt nach dem Import in den Sec61-Kanal keine proteolytische Spaltung mittels Signalpeptidase-Komplex, sondern die Integration in die hydrophobe Umgebung einer Doppellipidschicht. Wichtige Faktoren für diese Integration sind die thermodynamischen Eigenschaften der Transmembranhelix. D.h. die Transmembrandomäne muss einen gewissen Hydrophobizitätsscore erreichen, um alpha-helikale Strukturen ausbilden zu können, welche über die Aminosäureseitenketten mit den Membranlipiden hydrophobe Wechselwirkung zur stabilen Integration eingehen (Bernstein, 1998).

Von den rund 3500 humanen Signalpeptiden gemäß UniProtKB weisen 1400 einen GP-Gehalt von über 15 % auf und könnten somit TRAP-Substrate darstellen, deren Vorläufer Polypeptide zum ER-Import durch den Sec61-Kanal auf die regulierende Unterstützung durch den TRAP-Komplex angewiesen sind.

Möglicherweise führen der hohe GP-Gehalt sowie die verminderte Hydrophobizität der Vorläufer zu einer längeren Verweildauer auf cytosolischer Seite, da diese Eigenschaften eines Signalpeptids nicht denen eines klassischen SRP-Substrats entsprechen.

SRP wirkt wie ein cytosolisches Chaperon, das sich durch eine hohe Affinität zu Signalsequenzen mit alpha-helikalen und zugleich hydrophoben Strukturen auszeichnet, um letztere abzuschirmen und translokationskompetent zur ER-Membran zu dirigieren (Nyathi et al., 2013). Der TRAP-Komplex könnte diese verändert ausgeprägten Eigenschaften durch eine stabilisierende Interaktion mit dem Signalpeptid kompensieren.

Dieses Ergebnis war nach transienter siRNA-vermittelter TRAP-Depletion stärker ausgeprägt im Vergleich zu den Untersuchungsergebnissen der negativ betroffenen Proteine der chronisch TRAP-depletierten CDG-Fibroblasten, dennoch ist auch für diese der zuvor erläuterte Trend nachvollziehbar. Diese Unterschiede könnten in Adaptionsmechanismen der CDG-Fibroblasten begründet sein, welche aufgrund der chronischen TRAP-Defizienz ausgeprägt wurden. Die beschriebenen Signalpeptideigenschaften der potentiellen TRAP-Substrate betreffen auch Untereinheiten des OST-Komplexes (Ost48, Stt3b und Dad1). Das Fehlen des TRAP-Komplexes könnte die Ausprägung des CDG-Phänotyps als sekundären Effekt erklären.

### **4.3. Validierung der TRAP-Substrateigenschaften**

Weitere bioinformatische Untersuchungen ergaben, dass Signalpeptide bzw. N-terminale Transmembrandomänen der identifizierten TRAP-Substrate einen vergleichsweise hohen Anteil helixbrechender Aminosäuren (Glycin und Prolin, GP) bei gleichzeitig verminderter Hydrophobizität aufweisen. Mittels benutzerdefinierter Skripte wurden sowohl der Gehalt helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin als auch der Hydrophobizitätsscore nach Kyte-Doolittle in Signalsequenzen bestimmt. Durch Anwendung des Protean Vorhersage Tools erfolgte die *in silico* Bestimmung und grafische Darstellung der Sekundärstrukturen der jeweiligen Signalpeptide sowie dem Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle.

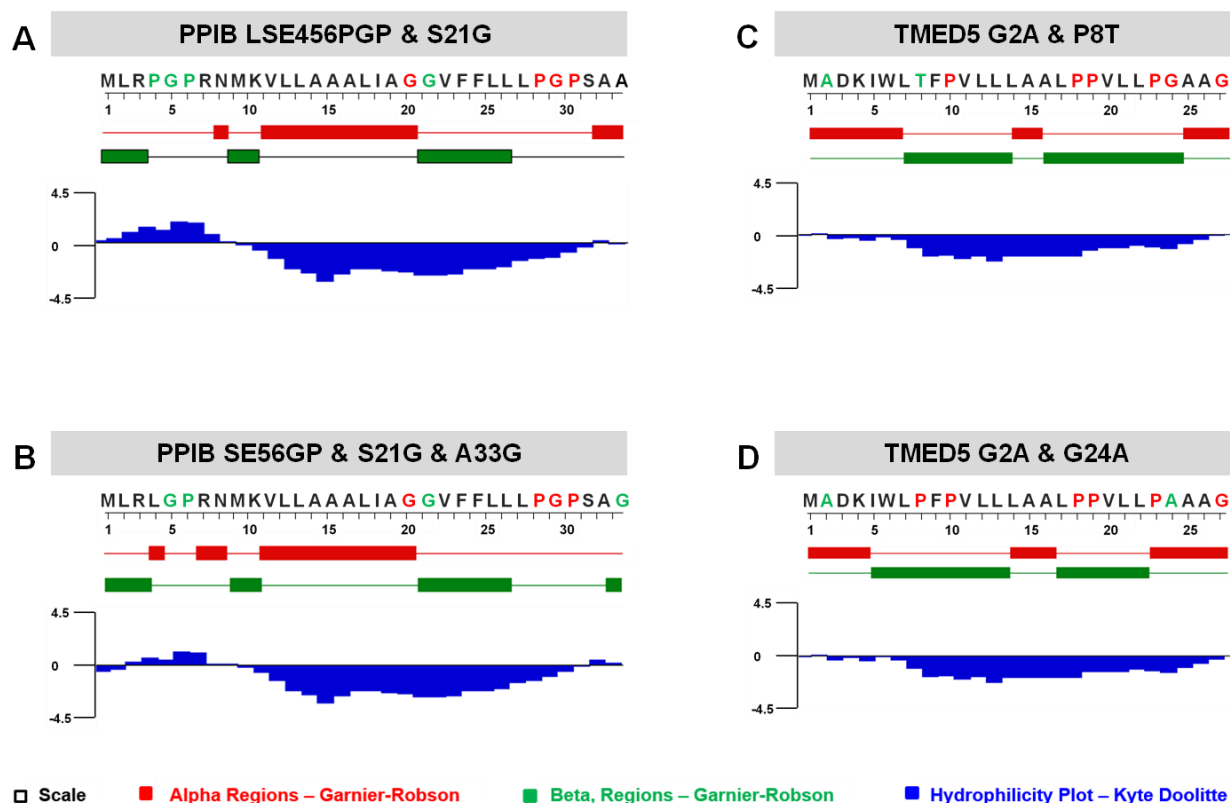
Zur Beurteilung der Ergebnisse der Proteomanalyse, sowie der identifizierten Eigenschaften der TRAP-Substrate wurden unabhängige Experimente zu deren Validierung durchgeführt. Dabei wurden zum einen mittels Western Blot und qRT-PCR nach siRNA-vermittelter TRAP-Depletion die quantitativen Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen überprüft. Zum anderen erfolgten Transportuntersuchungen plasmidkodierter TRAP-Substrate, sowie solcher Substrate, deren Signalpeptide hinsichtlich der potentiell determinierenden Eigenschaften verändert wurden. Dabei zeigte sich im Zuge der Beurteilung der als nicht TRAP-abhängig validierten Proteine, dass ein GP-Gehalt innerhalb des Signalpeptids unter 15 % erwartungsgemäß dazu führt, dass alpha-Helices ausgebildet werden. Dies begünstigt den Transport des Vorläuferpolypeptids über den SRP-Weg zum Translokon.

Zur Gruppe, der TRAP-unabhängigen Proteine gehört die Peptidyl-propyl-cis/trans-Isomerase PPIB. PPIC als TRAP-abhängiges Paralog zu PPIB weist 72 % Aminosäuresequenzidentität im reifen Teil auf, weitere 13 % der Aminosäuren sind vergleichbar. Die deutlichen Unterschiede innerhalb des Signalpeptids zeigen unter den genannten Gesichtspunkten, dass innerhalb des Signalpeptids von PPIC keine alpha-helikalen Bereiche ausgebildet werden, gegensätzlich zu den strukturellen Untersuchungen hinsichtlich PPIB.

Die Translokationsexperimente beider plasmidkodierter Polypeptidvorläufer von PPIB und PPIC nach Depletion des TRAP-Komplexes zeigen ebenfalls einen Transportdefekt in Bezug auf PPIC, jedoch keinen für PPIB. Auf dieser Basis kann sowohl auf endogener Ebene als auch nach plasmidgetriebenem Transport belegt werden, dass der erhöhte GP-Gehalt innerhalb des Signalpeptids mit einem eingeschränkten Transport in Abwesenheit des TRAP-Komplexes zusammenhängt. Die Translokationsversuche der Hybridmutante *PPIC-PPIB* zeigt, dass der Austausch des Signalpeptids direkt zur Ausprägung des Phänotyps führt, welcher für PPIC nach der Depletion des TRAP-Komplexes nachgewiesen wurde. Aufgrund der immens hohen Homologie der Aminosäuresequenzen im reifen Teil kann daher gefolgert werden, dass das Signalpeptid direkten Einfluss auf die TRAP-Abhängigkeit im Translokationsprozess eines Vorläuferpolypeptids hat.

Gleichermaßen wurde auch TMED5 (human) sowohl auf endogener Ebene als auch mit Hilfe des Transport-Assays als TRAP-abhängiges Substrat validiert. Darüber hinaus zeigten die *in silico* Untersuchungen, dass der erhöhte GP-Gehalt innerhalb des Signalpeptids zur Inhibition der Ausbildung einer alpha-Helix führt.

Um den direkten Einfluss der Aminosäuren Glycin und Prolin in Bezug auf die Translokationseffizienz zu untersuchen, wurden in die Signalpeptide plasmidkodierter Substrate Punktmutationen eingebracht, um zu untersuchen, ob der Phänotyp des Wildtyps umgekehrt werden kann. Mit Hilfe der Mutanten *mut-TMED5* und *mut-PPIB* wurde nachgewiesen, dass tatsächlich der erhöhte relative GP-Gehalt eines Signalpeptids eine determinierende Eigenschaft ist von TRAP-abhängigen Substraten ist. Die *in silico* Simulationen zur Entwicklung der Sequenzen von *mut-PPIB* und *mut-TMED5* unterstützten die These, dass neben dem relativen GP-Gehalt gemittelt über die gesamte Signalpeptidsequenz auch die Position der helixbrechenden Aminosäuren determinierend für die vorhergesagte Ausbildung alpha-helikaler Strukturen ist (Abbildung 85 im Vergleich zu Abbildung 74).



**Abbildung 85: Beispiele der in silico Simulationen zur Entwicklung der Sequenzen der Signalpeptide von mut-PPIB und mut-TMED5**

Die Aminosäuresequenz in silico Simulationen zur Entwicklung der Sequenzen der Signalpeptide der Modellsubstrate mut-PPIB (A, B) und mut-TMED5 (C, D) ist in dieser Abbildung dargestellt. Trotz jeweils gleichem GP-Gehalt und sehr ähnlichem Hydrophilizitätsprofil zu mut-PPIB bzw. mut-TMED5 in Abbildung 74 sind deutliche Unterschiede in der Vorhersage zur Ausbildung alpha-helikaler Strukturen erkennbar. Helixbrechende Aminosäuren Glycin (G) und Prolin (P) sind rot markiert, mutierte Aminosäuren grün. Darunter sind jeweils die Bereiche gekennzeichnet, welche laut Protean Vorhersage-Tool (DNASTAR / Lasergene 12) alpha--helikale (rot) und beta-Faltblatt Strukturen ausbilden. In blau ist das Hydrophilizitätsprofil nach Kyte-Doolittle gezeigt.

Darüber hinaus ergaben sich auch Unterschiede zwischen positionsgleichem Einsatz von Glycin oder Prolin. Unterstützt wird diese Beobachtung auch durch die Daten hinsichtlich TMED5, vergleichend zwischen muriner und humaner Aminosäuresequenz sowie den korrespondierenden Untersuchungen der Transporteffizienz nach Depletion der Translokasekomponenten. Der GP-Gehalt beider Signalpeptide, TMED5 (human) und TMED5 (murin) ist nahezu gleich. In der verstärkten Positionierung der helixbrechenden Aminosäuren im N-terminalen Teil des murinen Signalpeptids wurde mit Hilfe des Protean Vorhersage Tools die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix im hinteren Teil des Signalpeptids vorhergesagt. Gleiches gilt für die Proteine Grp170, Grp94 und BiP, welche innerhalb der massenspektrometrischen Proteomanalyse sowie Validierungsexperimente nach Depletion des TRAP-Komplexes keine quantitativen Veränderungen auf endogener Ebene aufwiesen.

Dies könnte der Grund dafür sein, weshalb nach Depletion des TRAP-Komplexes kein Transportdefekt nachgewiesen wurde, da die Translokation von Vorläuferpolypeptiden über die SRP-Route durch die Interaktion von helikalen Strukturen innerhalb des Signalpeptids mit SRP begünstigt wird.

Allerdings belegen die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich ERj1 und Sel1, dass nicht ausschließlich die relative Anzahl helixbrechender Aminosäuren determinierend für die Abhängigkeit zum TRAP-Komplex zur effizienten Prozessierung ist. So weist ERj1 beispielsweise mit den höchsten GP-Gehalt im Signalpeptid im Vergleich zu andern ER-Proteinen auf. Dies wäre prinzipiell ein klares Argument dafür, dass es sich bei ERj1 um ein TRAP-Substrat handelt. Allerdings zeigten die Untersuchungen nach TRAP-Depletion auf endogener Ebene, dass ERj1 vom Verlust der Translokase-Hilfskomponente nicht quantitativ negativ betroffen war. Die *in silico* Untersuchungen zeigten, dass innerhalb des ERj1-Signalpeptids Glycine und Proline gehäuft im vorderen Teil zu finden sind, daher trotz des hohen GP-Gehalts der hintere Teil eine Alpha-Helix aus 14 Aminosäuren ausbilden konnte. Sel1 wurde auf endogener Ebene als TRAP-abhängiges Substrat validiert, weist jedoch mit einer einzigen helixbrechenden Aminosäure Glycin im Signalpeptid einen vergleichsweise geringen GP-Gehalt mit 4,8 % auf. Die Position des Helixbrechers führt jedoch laut Protean Vorhersage dazu, dass lediglich im hinteren Teil des Signalpeptids eine recht kurze alpha-helikale Struktur aus sechs Aminosäuren ausgebildet wurde. Dass die Aminosäurekomposition der Signalsequenzen maßgeblichen einen Einfluss darauf hat, ob ein in das ER zu transportierendes Substrat dabei auf den TRAP-Komplex angewiesen ist, zeigen die zuvor diskutierten Ergebnisse hinsichtlich der Validierung der Eigenschaften von TRAP-Substraten. Die Mehrheit der mittels Proteomanalyse identifizierten TRAP-Substrate entspricht diesem charakteristischen Profil. Bei Betrachtung der Ergebnisse zur Untersuchung von Sil1 und Calreticulin als potentielle TRAP-Substrate zeigen auf, dass es neben dem GP-Gehalt, der Position der Aminosäuren und dem Hydrophobizitätsprofil innerhalb des Signalpeptids vermutlich noch weitere Eigenschaften gibt, die Einfluss auf die TRAP-Abhängigkeit eines Proteins im Zuge der Translokation haben. Beide Proteine wurden innerhalb der Western Blot basierten Experimente nach Depletion des TRAP-Komplexes endogen, Sil1 darüber hinaus auch plasmidkodiert, als TRAP-Substrate nachgewiesen. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse und der folgenden Proteinhäufigkeitsbestimmung identifizierten Sil1 jedoch nur nach Transfektion der HeLa-Zellen mit einer der beiden verwendeten *TRAPB* siRNA als TRAP-Substrat. Die Signalpeptide beider Proteine weisen mit etwa 16 % einen mäßig hohen GP-Gehalt auf, zudem ist der Hydrophobizitätsscore von Calreticulin mit 2,307 vergleichsweise hoch. *In silico* Untersuchungen trafen die Vorhersage der Ausbildung alpha-helikaler Strukturen über etwa die Hälfte des Signalpeptids.

Dies könnte einerseits dafür sprechen, dass die Depletion des TRAP-Komplexes weniger starke Auswirkungen auf die Prozessierung von Calreticulin hat. Möglicherweise könnte Calreticulin zu der Gruppe gehören, welche sekundär vom Verlust des TRAP-Komplexes betroffen ist. So wurde nachgewiesen, dass die Depletion des TRAP-Komplexes auch zur Degradation von Untereinheiten des OST-Komplexes führt, was in nächster Instanz zu Schwierigkeiten der N-Glykosylierung führt. Calreticulin wird innerhalb der korrekten Prozessierung im ER glykosyliert und könnte daher eher auf den Verlust des OST-Komplexes als auf den Verlust des TRAP-Komplexes ansprechen.

Der quantitativ negative Effekt aufgrund der Depletion des TRAP-Komplexes war im Hinblick auf Sil1 innerhalb der Validierungsexperimente jedoch recht stark. Die Untersuchungen der plasmidkodierten Variante von Sil1 zeigten, dass der Verlust des TRAP-Komplexes zum Translokationsdefekt und nicht zu einem Glykosylierungsdefekt führt. Dies spricht andererseits dafür, dass noch weitere Eigenschaften Einfluss auf die TRAP-Abhängigkeit von Vorläuferpolypeptiden während des Translokationsprozesses in das ER haben.

Für die auf endogener Ebene validierten TRAP-Substrate PPIC, EPDR1, ACP2 und TMED5 nach plasmidkodierter Proteinexpression bei gleichzeitiger Depletion von *TRAPB* bzw. *TRAPB* und *TRAPA* ein vergleichsweise schwacher Translokationsdefekt nachgewiesen. Mögliche Erklärungen für die Diskrepanzen der Ergebnisse, welche einerseits für die endogenen Proteine und die plasmidkodierten Proteine andererseits beobachtet wurden könnten folgende sein. Die massenspektrometrischen Experimente sowie die Validierungsexperimente wurden weitestgehend unter physiologischen Bedingungen durchgeführt. Die Anwendung des Transport-Assays in intakten Zellen bringt zwar den Vorteil mit sich, dass durch die Expression plasmidkodierter Substrate die Auswirkungen von z.B. Mutationen beobachtet werden können oder ein immunologischer Nachweis durch einen mit dem Protein verknüpften Tag erbracht werden kann, wenn beispielsweise kein Antikörper gegen das Protein zur Verfügung steht. Der Einsatz dieser Plasmide, des Transfektionsreagens und dem Proteasominhibitor führt jedoch auch dazu, dass die Ergebnisse dieser Experimente weniger physiologische Bedingungen abbilden. Unter diesen Gesichtspunkten ist daher zu erwarten, dass die Effekte für eine extern eingebrachte Komponente nach siRNA vermittelter Depletion von Komponenten der Translokase milder ausfallen, als dies auf endogener Ebene beobachtet wurde. Von daher sollte an dieser Stelle darauf verzichtet werden absolute Werte für ein Substrat nach beiden Methoden zu vergleichen. Allerdings eignen sich beide Vorgehensweisen in Kombination in idealer Weise, um generelle Tendenzen und Konzepte zu erfassen und determinierende Eigenschaften für bestimmte Funktionsweisen zu identifizieren.

#### 4.4. Der TRAP-Komplex und BiP weisen korrespondierende Funktionen bei der Translokation von Proteinen in das ER auf

Mit Hilfe des Transport Assays konnte jedoch die Frage adressiert werden, ob der TRAP-Komplex und BiP während der Translokation füreinander kompensieren können. Diese Überlegung stützt sich zum einen auf die Kenntnis, dass BiP durch Interaktion mit dem Loop 7 von Sec61 $\alpha$  am Gating der Translokationspore beteiligt ist (Schäuble et al., 2012). Zum anderen wurde durch Cryo-EM Untersuchungen nachgewiesen, dass die Untereinheit  $\alpha$  des TRAP-Komplexes in direkter räumlicher Nähe zu Loop 5 von Sec61 $\alpha$  steht, eine Interaktion zur Beeinflussung der Öffnung der Translokationspore ebenfalls möglich ist (Pfeffer et al., 2017).

Bei Betrachtung der Daten hinsichtlich der Translokationsexperimente unter Verwendung plasmidkodierter Polypeptidvorläufer fällt auf, dass die Depletion des ER-luminalen Chaperons BiP Anwendung des SubtilaseAB Toxin eine zusätzliche Auswirkung auf die Translokation hat. So wurde für die Substrate PPIC, EPDR1 und TMED5 aufgrund der Depletion von *TRAPB* weniger prozessiertes Protein nachgewiesen. Dieser Effekt trat während der Untersuchung hinsichtlich Sil1 verstärkt auf. Darüber hinaus führte die simultane siRNA vermittelte Depletion von *TRAPA* dazu, dass weniger reifes Protein nachgewiesen wurde. Jeder dieser genannten Effekte wurde durch die gleichzeitige Depletion von BiP verstärkt.

Der Translokationsdefekt der genannten plasmidkodierten Modellsubstrate aufgrund der Einzeldepletion von BiP wurde jeweils minimal stärker wahrgenommen als nach der siRNA-vermittelten Depletion von *TRAPB*. Im Umkehrschluss führte demnach die zusätzliche Depletion von *TRAPB* und *TRAPA* dazu, dass der Translokationsdefekt nach der Depletion von BiP ebenfalls verstärkt wurde. Diese Beobachtung erfolgte auch für die Mutanten von PPIB: *PPIC-PPIB* und *mut-PPIB*. Beide Mutationen resultierten darin, dass gegensätzlich zum wildtypischen PPIB eine TRAP-Abhängigkeit hervorgerufen wurde. Die Translokation beider Mutanten wurde durch die zusätzliche Depletion von BiP ebenfalls weiter eingeschränkt.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass sowohl TRAP als auch BiP ähnliche Funktionen innerhalb des Translokationsprozesses von Polypeptiden in das ER erfüllen. Beide Proteine könnten somit am Gating der Translokationspore beteiligt sein. Es ist dabei möglich, dass BiP den Verlust des TRAP-Komplexes hinsichtlich des Öffnens der Translokationspore in einem gewissen Maß kompensieren könnte.

Ob nun auch die Depletion des TRAP-Komplexes einen verstärkenden Einfluss auf den Translokationsdefekt nach der Depletion von BiP auf nachgewiesene BiP-Substrate hat, wurde in Kapitel 3.8.2 in einem Experiment untersucht.

So wurde FKBP14 mittels Proteomanalyse nach siRNA-vermittelter Depletion von BiP als dessen Substrat identifiziert. Der Import der plasmidkodierte Form von FKBP14 wurde sowohl durch die jeweils einzelne Depletion von BiP als auch *TRAPB* maßgeblich reduziert. Die simultane Depletion von BiP und *TRAPB* verstärkte die Hemmung der FKBP14-Translokation. Dabei handelt es sich jedoch um die Beobachtung eines Substrats, in einem einzigen Experiment. Dieses gibt zwar Hinweise darauf, dass der TRAP-Komplex auch an der Translokation von solchen Proteinen beteiligt ist, die durch die Depletion von BiP quantitativ negativ betroffen sind, jedoch sind an dieser Stelle umfassendere Experimente nötig, um diese Frage zu adressieren und demnach auch zu beantworten.

#### **4.5. Potentielle Kompensationsmechanismen nach Degradation des TRAP-Komplexes**

Im Zuge der Proteomanalyse sowie der Proteinhäufigkeitsbestimmung nach der Depletion des TRAP-Komplexes bzw. des Sec61-Komplexes wurden neben den jeweils zugehörigen Substraten auch solche Proteine identifiziert, welche in ihrer Quantität erhöht waren. Solche Proteine könnten je nach Funktion kompensatorisch auf den Verlust der Komplexe selbst oder auf die durch negative Beeinflussung der jeweiligen Substrate wirken. Beide Untereinheiten des SRP-Rezeptors, SR $\alpha$  und SR $\beta$ , gehörten zu den in ihrer Quantität positiv beeinflussten Proteinen nach der Depletion sowohl des TRAP-Komplexes als auch des Sec61-Komplexes. Letzteres deckt sich mit den Ergebnissen früherer Studien, in welchen ähnliche Tendenzen aufgrund der Depletion von *SEC61A1* oder *SEC62* beobachtet wurden (Lang et al., 2012). Die signifikant erhöhte Proteinkonzentration war dabei auf verstärkte Proteinsynthese bzw. höhere Proteinstabilität zurückzuführen. Grundlage dessen bilden die Ergebnisse der qRT-PCR Untersuchungen hinsichtlich transkriptioneller Effekte durch die Behandlung mit der jeweiligen siRNA, welche diesbezüglich jedoch keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle zeigten.

Darüber hinaus wurden weitere cytosolische Proteine aufgrund der Depletion beider Komplexe positiv beeinflusst, beispielsweise Midline 1 (MID1) sowie helicase-like transcription factor (HLTF). Interessanterweise haben beide Proteine Ubiquitin-Ligase-Aktivität und wurden zuvor mit Zellmigration und Kollagenbiogenese in Verbindung gebracht (MacKay et al., 2009; Boding et al., 2014). Des Weiteren wurde nach 96-stündiger Transfektion der HeLa-Zellen mit einer *TRAPB* siRNA keine quantitativ positive Beeinflussung der UPR-aktiven Proteine BiP, Grp94 und Grp170 beobachtet. Somit führte die Depletion des TRAP-Komplexes nicht zur Induktion der UPR.



Zur Beurteilung, inwiefern diese Stressreaktion in den darauffolgenden Stunden eintrat, kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, da keine ausreichende Anzahl an Datenpunkten diesbezüglich vorliegt.

Im Zuge der Proteomanalyse nach Depletion des Sec61-Komplexes wurden neben Mid1 und HLTF noch zahlreiche E3-Ubiquitin-Ligasen (11 aus 330) quantitativ positiv beeinflusst nachgewiesen. Darüber hinaus zählten zu den hochregulierten Proteinen in Abwesenheit des Sec61-Komplexes acht cytosolische Chaperone. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass der Verlust des Translokationskanals in das ER zur Akkumulation und Abbau der Proteine, welche unter Normalbedingungen im ER prozessiert würden.

Unter diesen Bedingungen wurden außerdem Protein-Targeting-Komponenten hochreguliert, wie z.B. Untereinheiten von SRP (SRP68, SRP54) sowie des TRC-Rezeptors (GET4). Mit der quantitativ positiven Beeinflussung der mitochondrialen Proteinrezeptor- und Importkomplexe TOM (TOMM6, TOMM7) und TIM (TIMM23), sind die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit übereinstimmend mit früheren Beobachtungen. Diese umfassen zu einen, dass Protein-Targeting-Wege zum ER überlappende Spezifitäten aufweisen (Haßdenteufel et al., 2017) (Haßdenteufel et al., 2018) und zum anderen, dass einige ER-gerichtete Vorläufer-Polypeptide zu Mitochondrien geleitet werden, sofern eine Translokationsstörung am ER vorliegt (Pfeiffer et al., 2013).

Insgesamt stimmen diese Ergebnisse mit der Ansicht überein, dass der Verlust des Sec61-Komplexes für 96 Stunden einen stärkeren Einfluss auf die Proteine des sekretorischen Wegs im Vergleich zur Depletion des TRAP-Komplexes hat. Das bedeutet, dass TRAP als eine Vorläufer-spezifische Hilfstransportkomponente für den Sec61-Komplex dient.

Die Proteomuntersuchungen der TRAP-defizienten CDG-Patientenfibroblasten wiesen dagegen keine quantitative Hochregulation der Proteine SR $\alpha$  und SR $\beta$ . Hinsichtlich E3-Ligasen sowie cytosolische Chaperone waren laut Proteomanalysen nur vereinzelte Proteine quantitativ erhöht. Jedoch erfolgte der Nachweis, dass ebenfalls Untereinheiten von SRP (SRP9, SRP14) sowie Teile der mitochondrialen TIM-TOM-Komplexe (TOMM20, TOMM34, TIMM10) in den untersuchten CDG-Fibroblasten hochreguliert wurden. Darüber hinaus war der Gehalt von SERCA und STIM1 in allen dreien CDG-Fibroblasten-Proben erhöht, gegensätzlich zu den transient TRAP-depletierten HeLa-Zellen. Dies suggeriert, dass in diesen Zellen dadurch der Calcium-Einstrom in das ER-Lumen begünstigt ist, möglicherweise um eine Störung der Homoöstate an anderer Stelle auszugleichen. Beide CDG-Proben mit TRAP $\delta$ -Mutation zeigten darüber hinaus einen erhöhten Gehalt der OST-Untereinheit STT3A, des zentralen, katalytischen Elements hinsichtlich der N-Glykosylierung von Proteinen (Ruiz-Canada, 2009).

Die Proteomdaten der beiden untersuchten Proben TRAP $\delta$ -defizienter CDG-Patientenzellen zeigten einen erhöhten Gehalt von Sel1, einem Protein, welches in den ERAD-Prozess involviert ist (Kaneko et al., 2007). Darüber hinaus war gegensätzlich zu den transient TRAP-depletierten HeLa-Zellen das UPR-aktive Protein Grp170 positiv beeinflusst. Da jedoch die charakteristischen UPR-aktiven Proteine BiP und Grp94 nicht erhöht waren, könnte an dieser Stelle vermutet werden, dass der erhöhte Gehalt von Grp170 nicht ausschließlich auf aktivierte UPR hindeutet. Somit könnte das multifunktionale Protein Grp170 unter den CDG-Bedingungen vermehrt der Funktion als Nukleotidaustauschfaktor nachkommen und möglicherweise den Verlust von Sil1 kompensieren (Behnke, 2015).

#### **4.6. Der TRAP-Komplex erfüllt keine direkte Rolle an der N-Glykosylierung**

Nähere Untersuchungen der massenspektrometrisch identifizierten TRAP-Substrate zeigten auf, dass nicht nur glykosylierte Proteine direkt vom Verlust des TRAP-Komplexes betroffen sind. Mutationen in der  $\delta$  und  $\gamma$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes wurden als Ursache des Auftretens bestimmter CDG-Phänotypen entdeckt (Ng et al., 2015; Losfeld et al., 2014). Aufgrund dessen wurde vermutet, dass TRAP maßgeblich an der Biogenese von Glykoproteinen beteiligt ist. Innerhalb der massenspektrometrischen Untersuchungen und Proteinhäufigkeitsbestimmungen zur Identifizierung der TRAP-Substrate wurden 60 Proteine als solche identifiziert.

Weitere Analysen hinsichtlich Vorhandensein einer Signalsequenz, Transmembranhelices oder N-Glykosylierungen und auch ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle zeigten, dass es keinen Trend zur Einteilung der potentiellen TRAP-Substrate in eine dieser Klassen gibt.

Dementsprechend kann an dieser Stelle gefolgert werden, dass TRAP per se nicht vorrangig an der Biogenese von Glykoproteinen beteiligt ist, wenn schon auch solche Proteine aufgrund der siRNA-vermittelten Depletion von TRAP als Substrate identifiziert wurden. Somit kann eine direkte Funktion des TRAP-Komplexes im N-Glykosylierungsprozess daher nicht bestätigt werden.

Im Zuge der Cryo-EM-Untersuchungen wurde zudem nachgewiesen, dass nicht jedes Translokon mit einem OST-Komplex assoziiert ist. Unter diesem Gesichtspunkt kann die Sinnhaftigkeit der mittels MS erhobenen Daten als positiv bewertet werden. So liegen andererseits zum OST-Komplex der TRAP-Komplex und der Sec61-Komplex in stöchiometrischen Mengen vor. Hätte TRAP vorrangig einen direkten Einfluss auf die N-Glykosylierung von Proteinen, wäre die Menge der quantitativ negativ betroffenen Glykoproteine aufgrund der Depletion des TRAP-Komplexes im Vergleich zu anderen Gruppen vermutlich wesentlich höher.

Der OST-Komplex bildet im ER die zentrale Komponente der N-Glykosylierung von Proteinen. Mutationen in mehreren der OST-Untereinheiten wurden identifiziert, die zur Ausbildung bestimmter Formen der CDG zu führen (Garshasbi et al., 2008; Jones et al., 2012; Shrimal et al., 2013). Die Daten der Cryo-EM-Untersuchungen weisen TRAP $\delta$  nach, die Schnittstelle zwischen TRAP- und OST-Komplex zu bilden. Unter Beachtung des beobachteten CDG-Phänotyps aufgrund des Verlusts dieser TRAP-Untereinheit, kam die Vermutung auf, dass TRAP $\delta$  eine koordinierende Funktion des TRAP- und OST-Komplexes unterhält. Sofern diese koordinierende Funktion nötig zur Glykosylierung bestimmter Proteine ist, könnte auch die Destabilisierung des TRAP-Komplexes in TRAP $\gamma$ -defizienten ausreichend sein, um den resultierenden Phänotyp der CDG zu erklären (Pfeffer 2017). Die erhobenen Daten aus dieser Arbeit lassen neben dieser Vermutung noch weitere Hypothesen zu: Es wurde nachgewiesen, dass der OST-Komplex selbst in negativer Art und Weise vom Verlust des TRAP-Komplexes betroffen ist. Die Untereinheiten Tusc3, Dad1, Stt3b und Ost48 wurden als TRAP-Substrate identifiziert und letztere in unabhängigen Experimenten validiert. Dies führt zu der Annahme, dass der Verlust des TRAP-Komplexes in indirekter Art und Weise auf die Hypoglykosylierung der TRAP-Substrate auswirkt. Statt direkt eine Funktion an der Glykosylierung inne zu haben, könnte das Fehlen des TRAP-Komplexes sekundär zu einer Destabilisierung des OST-Komplexes führen, was dessen Funktionsfähigkeit inhibiert.

#### **4.7. Einfluss des TRAP-Komplexes auf die Biogenese von Membranproteinen**

Mittels Cryo-Elektronentomographie wurde gezeigt, dass TRAP $\gamma$  mit dem Ribosom über dessen kurzes rRNA-Expansionssegment und dem ribosomalen Protein eL38 interagieren kann. Cryo-Elektronenmikroskopie Studien in *E. coli* zeigten kürzlich eine koordinierende Funktion der ribosomalen Proteine uL24 und H59 des naszierenden Signalpeptids zur Bindung von SRP (Jomaa et al., 2016). Im Säuger sind diese Proteine in räumlicher Nähe zu eL38 und TRAP $\gamma$  vorzufinden (Pfeffer et al. 2017). Unter der Annahme einer ähnlichen Position des Signalpeptids im Säugersystem, könnte die N-terminale Signalpeptid-Spitze folglich nahe genug sein, um mit eL38 und der cytosolischen Domäne von TRAP $\gamma$  während der Übergabe des Signalpeptids von SRP zu Sec61 zu interagieren. Daraus folgt die Hypothese, dass TRAP die Insertion von Signalpeptiden in den Sec61-Kanal in der produktiven Loop-Konfiguration unterstützen könnte. Die Orientierung, in welcher das Signalpeptid oder die N-terminale Transmembrandomäne in den Sec61-Kanal integriert wird, hat maßgeblichen Einfluss auf die Topologie von Transmembranproteinen.

So wird angenommen, dass Membranproteine Typ I und Typ II über die Loop-Konfiguration inserieren (Devaraneni et al., 2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass von der Depletion des TRAP-Komplexes überdurchschnittlich viele Membranproteine mit einer oder zwei Transmembrandomänen quantitativ negativ beeinflusst wurden, was mit der Hypothese hinsichtlich der Unterstützung der Loop-Konfiguration durch TRAP konform geht.

#### **4.8. Beteiligung des TRAP-Komplexes am ERAD-Prozess**

Nagasawa et al. (2007) untersuchten den TRAP-Komplex hinsichtlich der Involvierung in den ERAD-Prozess. Dabei erfolgte der Nachweis, dass alle TRAP-Untereinheiten durch den Tunicamycin-induzierten ER-Stress vermehrt exprimiert werden, was die Autoren dahingehend interpretierten, dass der TRAP-Komplex direkt am ERAD-Prozess beteiligt ist. Diese Hypothese wurde im Zuge der Untersuchungen der CDG-Patienten aufgegriffen (Losfeld et al., 2014). Die Mutation der  $\delta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes führt zum Verlust des gesamten TRAP-Komplexes, was die Ausprägung des CDG-Phänotyps zur Folge hat. Es wurde vermutet, dass die verminderte Glykosylierung der Proteine zu ER-Stress führt, jedoch durch die Degradation des TRAP-Komplexes der ERAD-Prozess ebenfalls nur eingeschränkt abläuft und fehlgefaltete Proteine akkumulieren. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass ER-Stress zum Abbau der Zuckergerüstgrundstrukturen führt (Gao & Lehrman, 2013) und weitere Hypoglykosylierungen der Glykoproteine folgen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch andere Vermutungen zu:

Dass der TRAP-Komplex per se nicht an der Glykosylierung von Proteinen beteiligt ist, wird in 4.6 diskutiert. Sel1 ist eine Kernkomponente im ERAD-Prozess (Qi et al., 2017) und wurde durch den siRNA-vermittelten Verlust des TRAP-Komplexes maßgeblich negativ beeinflusst und als TRAP-Substrat validiert (3.2.2.3). Dadurch könnten die Beobachtungen von Nagasawa et al. (2007) insofern unterstützt werden, als dass der TRAP-Komplex den Import von Sel1 als Co-Faktor von Hrd1 (Hosokawa & Wada, 2016) fördert und sich der Verlust des TRAP-Komplexes dementsprechend in sekundärer Art und Weise negativ auf die Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine in Zuge des ERAD-Prozesses auswirkt. Gegensätzliche Ergebnisse lieferten jedoch die massenspektrometrischen Untersuchungen der CDG-Fibroblasten, die eine positive Beeinflussung des Proteins Sel1 nachwiesen.

#### 4.9. Hypothese zur Funktionsweise des TRAP-Komplexes

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zur Interpretation der funktionalen Eigenschaften des TRAP-Komplexes mit den jüngst veröffentlichten Daten hinsichtlich der Architektur der einzelnen Untereinheiten des TRAP-Komplexes folgendermaßen verknüpft werden:

TRAP $\delta$  ist in der Peripherie zwischen dem humanen TRAP-Komplex und sofern vorhanden dem OST-Komplex positioniert. Pfeffer et al. (2017) stellten im Zuge der Strukturuntersuchungen die Vermutung an, dass TRAP $\delta$  eine koordinierende Funktion zwischen TRAP und OST hinsichtlich effizienter N-Glykosylierung von Proteinen zu Teil wird und darin der CDG-Phänotyps begründet sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nachgewiesen, dass der Verlust des TRAP-Komplexes auch zur Destabilisierung des OST-Komplexes führt. Somit scheint die im Säuger beobachtete substratabhängige Kooperation zwischen TRAP und OST in anderen Organismen, welchen TRAP $\delta$  fehlt, nicht erforderlich zu sein.

Anhand dieser Cryo-EM-Analysen wurde die  $\gamma$ -Untereinheit des humanen TRAP-Komplexes als zentrale, membranständige TRAP-Untereinheit zugeordnet. Auf cytosolischer Seite kann TRAP $\gamma$  eine Verbindung mit dem Ribosom eingehen, und die restlichen TRAP-Untereinheiten auf luminaler Seite stabilisieren und koordinieren. Dementsprechend könnte die zentrale Positionierung von TRAP $\gamma$  maßgeblich zur Stabilisierung und Assemblierung des TRAP-Komplexes beitragen. Diese These wird dadurch unterstützt, dass in TRAP $\gamma$ -defizienten Fibroblasten der gesamte TRAP-Komplex destabilisiert und degradiert wird. In Pflanzen und Algen sind jedoch TRAP $\gamma$  und TRAP $\delta$  nicht konserviert. Somit spricht die Fähigkeit des Heterodimers TRAP $\alpha$  / TRAP $\beta$  in Pflanzen und Algen einen stabilen Ribosomen-gebundenen Unterkomplex ohne TRAP $\gamma$  zu bilden gegen diese Funktion. Pfeffer et al. (2017) argumentierten an dieser Stelle damit, dass die verminderte Stabilität des TRAP-Komplexes in TRAP $\gamma$ -defizienten Fibroblasten nicht direkt auf das Fehlen der TRAP $\gamma$ -Untereinheit zurückzuführen ist, sondern viel mehr auf einen indirekten Effekt, denn mit dem Verlust der TRAP $\gamma$ -Untereinheit geht lediglich eine teilweise Depletion und keine vollständige Degradation von TRAP $\alpha$  einher. Somit könnte unter der Annahme, dass TRAP $\alpha$  die stabilisierende Untereinheit des TRAP-Komplexes bildet, dies die Erklärung der verminderten Komplexstabilität der TRAP $\gamma$ -defizienten Fibroblasten sein. Diese These wird zusätzlich zu den Untersuchungsergebnissen der CDG-Fibroblasten durch die Ergebnisse der Depletionsexperimente in HeLa-Zellen mittels siRNA-Behandlung unterstützt. Die Reduktion der Genexpression mittels RNAi für *TRAPB* führt zwar zur fast vollständigen Degradation der TRAP-Komplex-Untereinheiten  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , der Restgehalt an TRAP $\alpha$  bleibt jedoch bei etwa 40 %. Erst die direkte Manipulation von *TRAPA* mittels siRNA führt zur nahezu vollständigen Depletion von TRAP $\alpha$ .

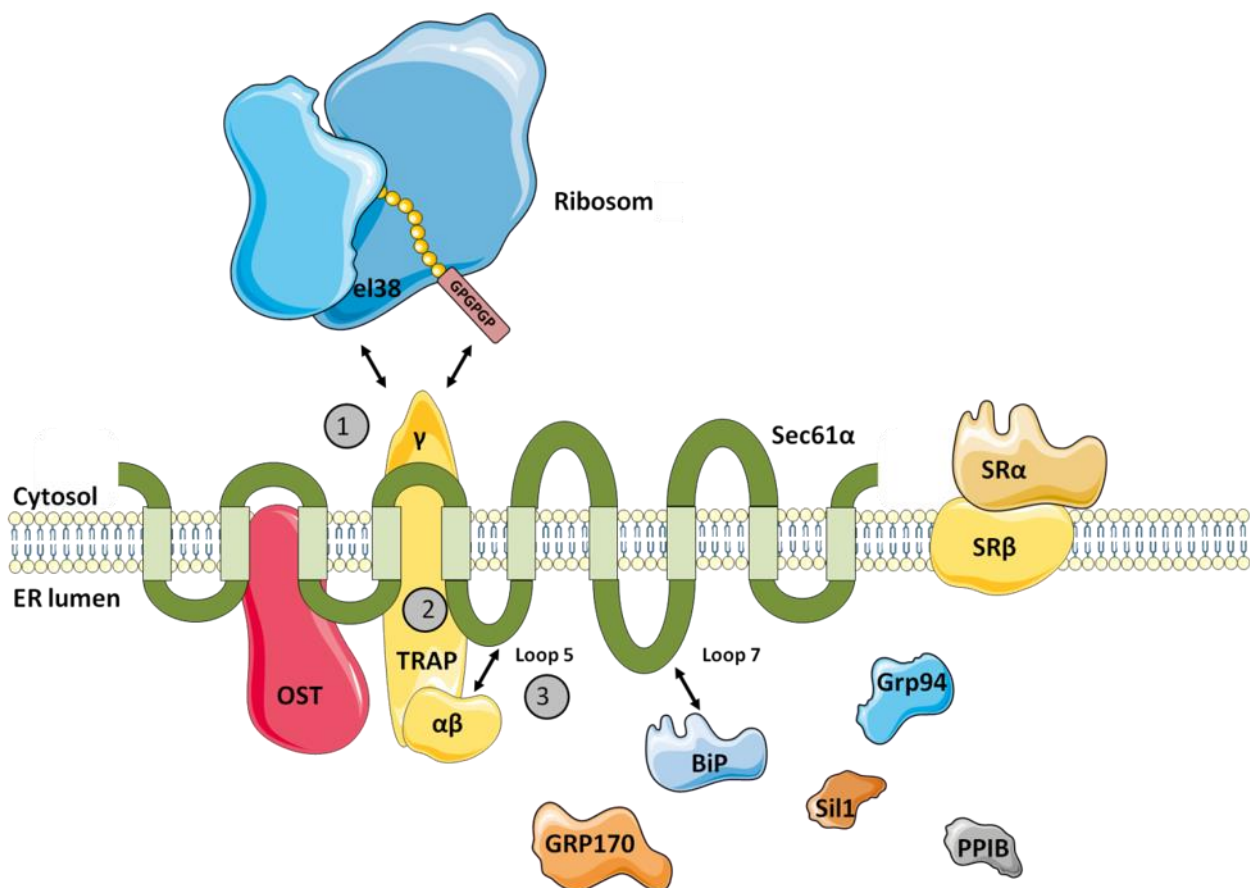
Innerhalb dieser Arbeit wurde jedoch auch gezeigt, dass die Substrate, die auf den TRAP-Komplex zur Translokation in das ER angewiesen sind, einen erhöhten Anteil helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin aufweisen. Der Vergleich des GP-Anteil in der Gesamtheit aller Signalpeptide in *S. cerevisiae*, *E. coli* und des Menschen zeigt, dass die ersten beiden im Gegensatz zum Menschen über fast keine Proteine mit Signalpeptiden verfügen, die einen GP-Gehalt über 15 % aufweisen. Da der TRAP-Komplex weder in *S. cerevisiae* noch in *E. coli* konserviert ist, ist es daher nachvollziehbar, dass das Substratspektrum des humanen TRAP-Komplexes einen erhöhten GP-Gehalt innerhalb der Signalpeptide aufweist. Aufgrund des erhöhten Gehalts helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin sowie der verminderten Hydrophobizität innerhalb der Signalpeptide von TRAP-abhängigen Substraten, könnte deren Interaktion mit TRAP $\gamma$  auf cytosolischer Seite des Translokons stabilisierend auf die Signalpeptide wirken und TRAP folglich die Insertion in den Sec61-Kanal fördern. Hinsichtlich der mittels Cryo-EM untersuchten Algen *C. reinhardtii* verfügen zugängliche Datenbanken über eine nicht genügend große Datenmenge, um auch deren Proteom auf den Anteil des GP-Gehalts der Signalpeptide zu untersuchen. Da *C. reinhardtii* Zellen zwar die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des TRAP-Komplexes besitzen, die anderen beiden Untereinheiten jedoch nicht konserviert sind, wäre die Untersuchung des GP-Gehalts ein interessanter Punkt. Dieser Umstand wäre insofern schlüssig, wenn in diesen Organismen der Anteil an Signalpeptiden mit hohem GP-Gehalt sehr gering wäre. Dementsprechend wäre die Interaktion zwischen einem cytosolischen Teil des TRAP-Komplexes und Ribosomen zur Informationsweiterleitung in das Lumen zur Unterstützung des Polypeptidimports nicht notwendig.

Unter diesen Gesichtspunkten könnte TRAP $\gamma$  weniger als stabilisierender Teil des TRAP-Komplexes fungieren sondern eher die bereits angesprochene koordinierende Funktion ausüben. Zur Unterstützung der Insertion eines solchen Vorläuferpolypeptids müsste jedoch die Information eines Signalpeptid-tragenden Ribosoms zum Sec61-Kanal vermittelt werden um dessen Öffnung einzuleiten. Dieser Mechanismus ist bis dato jedoch ungeklärt. In-vitro-Experimente unterstützen die Auffassung, dass Hilfskomponenten wie etwa TRAP, die Sec61-Kanalöffnung in einer substratspezifischen Weise erleichtern. Mit solchen Substraten sind Vorläuferpolypeptide mit sogenannten schwachen Signalpeptiden gemeint (Lang et al., 2012; Fons et al., 2003; Conti et al., 2015). Darüber hinaus zeigten die strukturellen Untersuchungen des humanen TRAP-Komplex, dass die ER-luminal zugeordneten Domänen TRAP $\alpha$  und TRAP $\beta$  in räumlicher Nähe zum Loop 5 in der Gelenkregion zwischen den N- und C-terminalen Hälften von Sec61 $\alpha$  und damit direkt unter der Kanalpore steht. In dieser Position könnte das TRAP $\alpha\beta$ -Heterodimer sowohl mit naszierenden Polypeptidketten interagieren als auch den Konformationszustand des Kanals beeinflussen.

Beides deckt sich mit Beobachtungen früherer Studien, welche TRAP mit der Topogenese von Membranproteinen sowie der Initiation der Proteintransports in Verbindung brachten (Fons et al., 2003; Sommer et al., 2013). Durch die Interaktion an dieser Stelle könnte somit die Öffnung des Sec61-Kanals erleichtert werden, um die Initiation der Proteintranslokation zu ermöglichen. Berücksichtigt man weiterhin die späteren evolutionären Gewinne der TRAP-Komplex Untereinheiten  $\gamma$  und  $\delta$ , lässt sich daraus schließen, dass diese TRAP $\gamma$  und TRAP $\delta$  keine Rolle in den beschriebenen Funktionen hinsichtlich der Interaktion mit Sec61 oder importierten Substraten auf luminaler Seite des ER erfüllen (Pfeffer et al., 2017). Dieses Modell deckt sich zudem mit erhobenen Daten mittels live cell calcium imaging in intakten HeLa-Zellen. Die Depletion des TRAP-Komplexes, nach der in dieser Arbeit vorgestellten siRNA-basierten Methode, führte dabei zu einem stark eingeschränkten Calciumausstrom aus dem ER in das Cytosol (Schorr, 2014; Nguyen et al., 2018). Der TRAP-Komplex erfüllt nach diesem Modell ähnliche substratspezifische Funktionen, wie es zuvor für BiP in Kooperation mit dem Komplex Sec62/Sec63 beobachtet wurde (Conti et al., 2015; Madas et al., 2012; Jung et al., 2014): So wurde gezeigt, dass Sec62 substratspezifische Funktionen auf cytosolischer Seite ausweist, welche über Interaktion zu Sec63 und schließlich über dessen J-Domäne an BiP weitergeleitet werden. BiP interagiert mit Sec61 $\alpha$  an Loop 7 und unterstützt dadurch die Öffnung des Kanals.

Ferner zeigen Wada et al. (1991), dass TRAP $\alpha$  in vitro sowohl Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden als auch phosphoryliert werden kann. Beides könnten Modifikationen sein, die in die Regulation des TRAP-Komplexes involviert sind und daraus resultierend den Polypeptidimport durch den Sec61-Kanal beeinflussen. Calcium wird in zahlreichen zellulären Prozessen wie Metabolismus, Zellproliferation, UPR, Transkription sowie Phosphorylierung und Dephosphorylierung als Regulator beschrieben (Berridge et al., 2003). Die Chaperone BiP, Grp94 und Calreticulin zählen zu Calcium-bindenden Proteinen im ER-Lumen (Prins & Michalak, 2011). So wurde für BiP gezeigt, dass dessen Assoziation an naszierende Polypeptide unter hoher Calcium-Konzentration im ER stabilisiert wird (Suzuki et al., 1991). Darüber hinaus interagiert BiP auch mit dem Sec61-Komplex, was zum Schließen des Sec61-Kanals und zur Erhaltung der Calcium-Homöostase im ER führt (Schäuble et al., 2012). Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der TRAP-Komplex z.T. ähnliche Funktionen wie das ER-luminale Chaperon BiP erfüllt. Zur funktionalen Charakterisierung der potentiellen Regulationen an TRAP $\alpha$  sollte in der Zukunft untersucht werden, inwiefern TRAP-Substrate aufgrund oder in Abwesenheit der genannten Modifikationen beeinflusst werden. Interessant ist in diesem Bezug auch, ob die intrazelluläre Verteilung von TRAP-Substraten, die in verschiedenen Kompartimenten zu finden sind, wie z.B. Calreticulin, von diesen Modifikationen beeinflusst wird.

Zusammenfassend kann die Funktion des humanen TRAP-Komplexes folgendermaßen erklärt werden: TRAP $\gamma$  kann auf cytosolischer Seite sowohl mit dem Ribosom interagieren als auch als Rezeptor für spezifische Signalpeptide fungieren. Diese weisen einen erhöhten Gehalt helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin sowie eine reduzierte Hydrophobizität auf. TRAP $\gamma$  wirkt dabei stabilisierend und koordinierend auf das Signalpeptid und als Informationsvermittler an das luminaire Heterodimer TRAP $\alpha$ /TRAP $\beta$ . Dieser Teil des TRAP-Komplexes steht in direkter räumlicher Nähe zum Loop 5 von Sec61 $\alpha$  und könnte durch resultierende Interaktion eine Konformationsänderung der Translokationspore hin zum geöffneten Zustand führen. Möglicherweise interagiert der luminaire Teil ferner mit der naszierenden Polypeptidkette in translokationsunterstützender Art und Weise.



**Abbildung 86: Modell zur Funktionsweise des TRAP-Komplexes**

Zusammenfassend kann die Funktion des humanen TRAP-Komplexes folgendermaßen erklärt werden: TRAP $\gamma$  kann auf cytosolischer Seite sowohl mit dem Ribosom interagieren als auch als Rezeptor für spezifische Signalpeptide fungieren. Diese weisen einen erhöhten Gehalt helixbrechender Aminosäuren Glycin und Prolin sowie eine reduzierte Hydrophobizität auf. TRAP $\gamma$  wirkt dabei stabilisierend und koordinierend auf das Signalpeptid und als Informationsvermittler an das luminaire Heterodimer TRAP $\alpha$ /TRAP $\beta$ . Dieser Teil des TRAP-Komplexes steht in direkter räumlicher Nähe zum Loop 5 von Sec61 $\alpha$  und könnte durch Interaktion eine Konformationsänderung der Translokationspore hin zum geöffneten Zustand führen. Möglicherweise interagiert der luminaire Teil ferner mit der naszierenden Polypeptidkette in translokationsunterstützender Art und Weise (Modifiziert aus „Servier Medical Art“, Inhalt durch „Creative Commons Attribution 3.0 Unported License“ geschützt. <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).



#### 4.10. Ausblick

Um die Funktion von TRAP am Translokationsprozess noch genauer beschreiben zu können, sind weitere funktionale Untersuchungen nötig. Von daher wäre zunächst die Bestimmung der genauen Interaktionsstellen zwischen dem luminalen Teil des TRAP-Komplexes und Sec61 $\alpha$  (Loop 5) nötig. Die Frage nach der genauen Position der Protein-Protein-Interaktion könnte zunächst in Studien mit von Hilfe Peptid-Arrays adressiert werden. Dabei werden Peptidbibliotheken durch Immobilisierung von Peptidmatrizen eines Proteins auf einem geeigneten Trägermaterial erstellt. Bindet das potentielle, gereinigte Interaktionsprotein oder – proteindomäne an einem dieser Peptide, kann dieses Signal ausgelesen werden und die Interaktionsstelle des immobilisierten Peptids bestimmt werden. Anschließend könnten Experimente analog zu den Transportexperimenten in 3.6 mit Hilfe von plasmidkodierten Substraten unter Komplementationsbedingungen durchgeführt werden, um in lebenden Zellen die Bedeutung dieser Interaktionen zu überprüfen. Durch Mutation der jeweiligen Interaktionsstelle könnten somit Änderungen hinsichtlich der Transporteigenschaften zum wildtypischen Substrat nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit könnten dabei grundlegende Ansatzpunkte zur Gestaltung der Experimente sowie Beurteilung der Ergebnisse liefern. Gleiches könnte man sich hinsichtlich der Interaktion zwischen TRAP $\delta$  und dem OST-Komplex vorstellen.

Darüber hinaus wäre außerdem die Studie der möglichen Regulationsmechanismen hinsichtlich der Funktion von TRAP $\alpha$  interessant. Wada et al. (1991) wiesen nach, dass TRAP $\alpha$  sowohl Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden als auch phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung passiert meist aufgrund eines spezifischen Stimulus zur Regulation der Funktionsweise eines Proteins. Die Anheftung der Phosphatgruppe führt durch die Addition negativer Ladungen meist zu einer Konformationsänderung des modifizierten Proteins, wodurch die Bindung von Liganden an anderer Stelle beeinflusst werden kann. Im Falle von TRAP $\alpha$  könnte durch diese Modifikation die Interaktion mit der Translokationspore beeinflusst werden. Somit könnten verschiedene Reize dazu führen, dass einerseits die Interaktion gefördert wird, um die Öffnung der Translokationspore im Hinblick auf den unterstützenden Import von Polypeptiden zu fördern. Andererseits könnte genau diese Funktion durch die Phosphorylierung auch inhibiert werden. So zeigen mittels live cell calcium imaging erhobene Daten nach der Depletion des TRAP-Komplexes einen stark eingeschränkten Calcium-Ausstrom aus dem ER, was dafür spricht, dass der Sec61-Kanal durch die fehlende Interaktion mit dem TRAP-Komplex hin zur geschlossener Konformation beeinflusst wird. Dies könnte dazu beitragen, die Calciumhomöostase im ER aufrecht zu erhalten und ungewollten Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus dem ER durch den Sec61-Kanal zu minimieren. Damit einher könnte auch die Fähigkeit von TRAP $\alpha$  Calcium-Ionen zu binden einhergehen.

Um diese Eigenschaften auf funktionaler Ebene zu untersuchen könnte man zunächst gezielt die Calciumhomöostase manipulieren. Unter Normalbedingungen würde kontinuierlich Calcium aus der ER in das Cytosol durch beispielsweise den Sec61-Kanal gelangen und über die ER-ständige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) wieder zurück in das ER-Lumen gepumpt werden. Durch Inhibition der SERCA-Aktivität, beispielsweise durch Applikation des Tumorpromotors Thapsigargin wäre der Calciumeinstrom in das ER gestört (Thastrup et al., 1990). An dieser Stelle könnte man z.B. mittels semi-quantitativem Western Blot untersuchen, ob TRAP $\alpha$  aufgrund der verminderten Calciumkonzentration im ER im Hinblick auf eine Konformationsänderung vermehrt oder vermindert phosphoryliert wird. Des Weiteren könnten die Auswirkungen auf die Abundanz und Verteilung anderer  $\text{Ca}^{2+}$ -bindender Proteine, wie z.B. Calreticulin, in Ergänzung zu früheren Studien untersucht werden (Losfeld et al., 2012).

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sekretorischer Transportweg .....	1
Abbildung 2: Schemata ER-gerichteter Proteine.....	4
Abbildung 3: SRP-abhängiger Proteintransportweg.....	5
Abbildung 4: Schematischer Überblick des SRP-Komplexes und seines membranständigen Rezeptors .....	6
Abbildung 5: SRP-unabhängige Proteintransportwege zum ER.....	8
Abbildung 6: Modell des dynamischen Gleichgewichts und Mechanismen zur Konformationsänderung des humanen Sec61-Komplexes.....	11
Abbildung 7: Gesamtstruktur und Zusammensetzung der Untereinheiten des humanen TRAP- Komplexes.....	13
Abbildung 8: Überblick über den Mechanismus der N-Glykosylierung von Proteinen .....	17
Abbildung 9: Der ATPase-Zyklus des Hsp70-Chaperons BiP .....	20
Abbildung 10: Funktionen des Hsp70-Chaperons BiP während des Polypeptidimports.....	21
Abbildung 11: Unterscheidung CDG Typ I und Typ II .....	27
Abbildung 12: Strukturelle Einteilung integraler Membranproteine .....	29
Abbildung 13: Tank-Blot Verfahren.....	47
Abbildung 14: <i>Semidry</i> -Blot Verfahren .....	47
Abbildung 15: Entfernung einer Linkersequenz durch gerichtete in vitro Mutagenese .....	53
Abbildung 16: Einführen von Punktmutationen mittels Quick-Change PCR .....	54
Abbildung 17: Ablauf der gerichteten in vitro Mutagenese von Plasmid-DNA.....	55
Abbildung 18: Pipettierschema zur Mutagenese.....	56
Abbildung 19: Transportassay in intakten Zellen .....	77
Abbildung 20: HeLa Flp-In™ System .....	82
Abbildung 21: Charakteristika der stabil in das Genom von HeLa Flp-In Zellen zu integrierenden BiP-Mutanten .....	84
Abbildung 22: Test der Expression der BiP-Mutanten in HeLa Flp-In Zellen .....	86
Abbildung 23: Identifizierung von Sec61-Substraten und kompensatorischer Mechanismen nach siRNA vermittelter Depletion von <i>SEC61A1</i> .....	93
Abbildung 24: Identifizierung von TRAP-Substraten und kompensatorischer Mechanismen nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> .....	93
Abbildung 25: Strategie zur Bestimmung des Substratspektrums des TRAP-Komplexes in HeLa-Zellen.....	95
Abbildung 26: Überprüfung der Depletionseffizienz von <i>SEC61A1</i> mittels Western Blot. ....	96
Abbildung 27: Anzahl der nachgewiesenen Proteine innerhalb der MS-Analyse nach Depletion von <i>SEC61A1</i> .....	97
Abbildung 28: Volcano Plot zum Experiment nach <i>SEC61A1</i> siRNA basierter Proteindepletion .....	98
Abbildung 29: Subzelluläre Lokalisation der Proteine nach <i>SEC61A1</i> Depletion. ....	99
Abbildung 30: Überprüfen der Depletionseffizienz von <i>TRAPB</i> mittels Western Blot .....	100
Abbildung 31: Anzahl der nachgewiesenen Proteine innerhalb der MS-Analyse nach Depletion von <i>TRAPB</i> .....	101
Abbildung 32: Volcano Plot zum Experiment nach <i>TRAPB</i> siRNA basierter Zellmanipulation..	102

Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation der massenspektrometrisch quantifizierten Proteine nach siRNA vermittelter <i>TRAPB</i> Depletion.....	103
Abbildung 34: Quantitative Auswertung der mittels MS detektierten Proteine nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> und <i>SEC61A1</i> .....	104
Abbildung 35: Untersuchung des relativen Proteingehalts der Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion (96 h).....	111
Abbildung 36: Rettung des Phänotyps für die $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> .....	112
Abbildung 37: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion (48 h – 144 h). ....	114
Abbildung 38: Analyse des relativen mRNA-Gehalts der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes nach <i>TRAPB</i> Depletion (96 h). ....	115
Abbildung 39: Untersuchung des relativen Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion. ....	118
Abbildung 40: Rettung des Phänotyps von PPIC, ACP2 und TMED5 nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> .....	120
Abbildung 41: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 nach Depletion von <i>TRAPB</i> (48 h – 144 h) ....	122
Abbildung 42: Analyse des relativen mRNA-Gehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 nach <i>TRAPB</i> Depletion (96 h).....	123
Abbildung 43: Untersuchung des relativen Proteingehalts der OST-Komplex-Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion. ....	125
Abbildung 44: Rettung des Phänotyps für die Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b des OST-Komplexes nach Depletion von <i>TRAPB</i> (96 h).....	127
Abbildung 45: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b des OST-Komplexes nach Depletion von <i>TRAPB</i> (72 h – 144 h). ....	129
Abbildung 46: Untersuchung des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Calreticulin, Sil1 und Sel1 nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion. ....	131
Abbildung 47: Rettung des Phänotyps für die ER-luminalen Proteine Calreticulin, Sil1 und Sel1 nach Depletion von <i>TRAPB</i> (96 h). ....	133
Abbildung 48: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Calreticulin, Sil1 und Sel1 nach Depletion von <i>TRAPB</i> .....	135
Abbildung 49: Analyse des relativen Protein- und mRNA-Gehalts von EPDR1 nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion.....	137
Abbildung 50: Untersuchung des relativen Proteingehalts der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion.....	139
Abbildung 51: Rettung des Phänotyps für die $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach Depletion von <i>TRAPB</i> (96 h).....	140
Abbildung 52: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors nach Depletion von <i>TRAPB</i> (72 h – 144 h).....	142
Abbildung 53: Analyse des relativen mRNA-Gehalts der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten des SRP-Rezeptors nach <i>TRAPB</i> Depletion .....	143
Abbildung 54: Untersuchung des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Grp94, Grp170, PPIB und BiP sowie des ER-Membranproteins ERj1 nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion (96 h).....	146

Abbildung 55: Kinetische Analyse des relativen Proteingehalts der ER-luminalen Proteine Grp94, Grp170, PPIB und BiP sowie des ER-Membranproteins ERj1 nach <i>TRAPB</i> - bzw. <i>SEC61A1</i> Depletion (48 h – 144 h).	148
Abbildung 56: Physiko-chemische Eigenschaften der TRAP-Substrate mit Signalpeptid oder N-terminaler Transmembrandomäne.	152
Abbildung 57: Subzelluläre Lokalisation der Proteine TRAP defizienter CDG-Fibroblasten.	154
Abbildung 58: Quantitative Auswertung der mittels MS detektierten Proteine nach siRNA vermittelter Depletion von <i>TRAPB</i> in HeLa-Zellen sowie in chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten.	155
Abbildung 59: Physiko-chemische Eigenschaften der TRAP-Substrate mit Signalpeptid oder N-terminaler Transmembrandomäne chronisch TRAP-defizienter CDG-Fibroblasten und siRNA vermittelt TRAP-depletierter HeLa-Zellen.	156
Abbildung 60: Untersuchung des relativen Proteingehalts der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten des TRAP-Komplexes in Fibroblasten von CDG-Patienten.	158
Abbildung 61: Untersuchung des relativen Proteingehalts von PPIC, ACP2 und TMED5 in Fibroblasten von CDG-Patienten.	160
Abbildung 62: Untersuchung des relativen Proteingehalts der OST-Komplex-Untereinheiten Dad1, Ost48 und Stt3b in Fibroblasten von CDG-Patienten.	162
Abbildung 63: Untersuchung des relativen Proteingehalts von Calreticulin, Sil1 und Sel1 in Fibroblasten von CDG-Patienten.	163
Abbildung 64: Untersuchung des relativen Proteingehalts $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors in Fibroblasten von CDG-Patienten.	165
Abbildung 65: Untersuchung des relativen Proteingehalts von Grp94, Grp170, PPIB, BiP und ERj1 in Fibroblasten von CDG-Patienten.	167
Abbildung 66: Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen Paraloge PPIB und PPIC	179
Abbildung 67: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der Signalpeptide von PPIC und PPIB.	180
Abbildung 68: Charakterisierung der Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufer PPIB und PPIC.	181
Abbildung 69: Analyse der Depletionseffizienz verschiedener Translokasekomponenten bei gleichzeitiger Überexpression plasmidkodierter Polypeptide	182
Abbildung 70: Analyse der Translokation plasmidgetriebener Polypeptidvorläufer von PPIB und PPIC nach Depletion von Translokasekomponenten.	183
Abbildung 71: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der Signalpeptide verschiedener Modell-Polypeptidvorläufer.	185
Abbildung 72: Charakterisierung der Prozessierungsstufen von plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufern.	186
Abbildung 73: Analyse der Translokation plasmidgetriebener Modell-Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten	189
Abbildung 74: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der mutierten Signalpeptide von PPIC und PPIB	190
Abbildung 75: Charakterisierung der Prozessierungsstufen von Modell-Polypeptidvorläufern mit Mutationen innerhalb ihrer Signalsequenz.	191

Abbildung 76: Analyse der Translokation plasmidkodierter Modell-Polypeptidvorläufer mit eingebrachter Mutation in ihrer Signalsequenz nach Depletion von Translokasekomponenten .....	193
Abbildung 77: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der Proteine Grp170, Grp94, ERj1, BiP, Calreticulin & Sel1 .....	195
Abbildung 78: Untersuchung der Membranproteine, welche aufgrund der Depletion des TRAP-Komplexes quantitativ vermindert nachgewiesen wurden, hinsichtlich Anzahl der Transmembrandomänen .....	197
Abbildung 79: Überprüfung der Depletionseffizienz von BiP mittels Western Blot .....	203
Abbildung 80: Volcano Plot zum Experiment nach siRNA vermittelter Depletion von <i>HSPA5</i> ..	204
Abbildung 81: Subzelluläre Lokalisation der massenspektrometrisch quantifizierten Proteine nach <i>HSPA5</i> Depletion .....	205
Abbildung 82: Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Kyte-Doolittle-Hydrophilizität der potentiellen BiP-Substrate RNaseT2, FKBP14 und SUMF1 .....	207
Abbildung 83: Charakterisierung der Prozessierungsstufen der plasmidgetriebenen Modell-Polypeptidvorläufer FKBP14, RNaseT2 und SUMF1. ....	208
Abbildung 84: Analyse der Translokation plasmidgetriebener Modell-Polypeptidvorläufer nach Depletion von Translokasekomponenten .....	209
Abbildung 85: Beispiele der in silico Simulationen zur Entwicklung der Sequenzen der Signalpeptide von mut-PPIB und mut-TMED5 .....	223
Abbildung 86: Modell zur Funktionsweise des TRAP-Komplexes .....	235

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte und dazugehörige Software, Verbrauchsmaterialien ..	32
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	34
Tabelle 3: Liste der verwendeten Enzyme .....	35
Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper. ....	36
Tabelle 5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper.....	38
Tabelle 6: Liste der DNA Oligonukleotidprimer für qRT-PCR-Versuche .....	39
Tabelle 7: Liste der verwendete DNA Oligonukleotide.....	39
Tabelle 8: Liste der verwendeten siRNA Oligonukleotide. ....	41
Tabelle 9: Liste der verwendeten Plasmide zur Überexpression in humanen Zelllinien .....	41
Tabelle 10: Pipettierschema für Tris-Glycin-Gele zur SDS-PAGE.....	45
Tabelle 11: Puffer zur immunologischen Detektion von Proteinen .....	48
Tabelle 12: Pipettierschema für eine Polymerasekettenreaktion (PCR).....	52
Tabelle 13: PCR-Konditionen zur Amplifizierung von Plasmid-DNA .....	52
Tabelle 14: PCR-Bedingungen für Mutagenese von Plasmid-DNA.....	56
Tabelle 15: Bedingungen der qRT-PCR:.....	57
Tabelle 16: Pipettierschema zum präparativen Verdau von Nukleinsäuren .....	59
Tabelle 17: Pipettierschema zum analytischen Verdau von Nukleinsäuren .....	60
Tabelle 18: Puffer zur DNA-Fällung und Lagerung nach Extraktion aus Agarosegelen .....	62
Tabelle 19: Pipettierschema zur Ligation mit Restriktionsendonucleasen behandelte DNA .....	63
Tabelle 20: Puffer zur Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	63
Tabelle 21: Puffer zur DNA-Minipräparation.....	66
Tabelle 22: Transfektionsansätze zur genetischen Herstellung stabiler HeLa Flp-In-Zellen .....	80
Tabelle 23: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Proteine mit abspaltbarer Signalsequenz nach siRNA vermittelter <i>TRAPB</i> Depletion.....	104
Tabelle 24: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine ohne abspaltbarem Signalpeptid nach siRNA vermittelter <i>TRAPB</i> Depletion .....	107
Tabelle 25: Zusammenfassende Übersicht der quantitativen Ergebnisse der Proteomanalysen nach siRNA vermittelter Proteindepletion sowie der CDG-Patientenzellen sowie der anschließenden Validierungsexperimente .....	168
Tabelle 26: Übersicht weiterer Ergebnisse der Proteomanalysen ohne zusätzliche Validierungsexperimente.....	175
Tabelle 27: Aminosäuresequenzen und Eigenschaften von Signalpeptiden.....	194
Tabelle 28: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine nach siRNA vermittelter <i>TRAPB</i> Depletion mit abspaltbarer Signalsequenz.....	198
Tabelle 29: Eigenschaften quantitativ negativ beeinflusster Membranproteine nach siRNA vermittelter <i>TRAPB</i> Depletion ohne abspaltbare Signalsequenz.....	199
Tabelle 30: Übersicht und Eigenschaften der Membranproteine, welche im Proteom der CDG-Patientenzellen quantitativ als vermindert nachgewiesen wurden.....	200
Tabelle 31: Eigenschaften potentieller BiP-Substrate mit abspaltbarer Signalsequenz.....	207

## Literaturverzeichnis

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*. (1833), S. 2430-2437.
- Akopian, D., Dalal, K., Shen, K., Duong, F., & Shan, S. (2013). SecYEG activates GTPases to drive the completion of cotranslational protein targeting. *J Cell Biol.* (200), S. 397-405.
- Ast, T., Cohen, G., & Schuldiner, M. (2013). A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*. (152), S. 1134-1145.
- Aviram, N., Ast, T., Costa, E., Arakel, E., Chuartzman, S., Jan, C., . . . Schuldiner, M. (2016). The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum. *Nature*. (540), S. 134-138.
- Bagola, K., Mehnert, M., Jarosch, E., & Sommer, T. (2011). Protein dislocation from the ER. *Biochim Biophys Acta*. (1808), S. 925-936.
- Barlowe, C., & Miller, E. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*. (193), S. 383-410.
- Baumann, N., Sullivan, D., Ohvo-Rekilä, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., . . . Menon, A. (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry*. (44), S. 5816-5826.
- Behnke, J., Feige, M., & Hendershot, L. (2015). BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol.* (427), S. 1589-1608.
- Benedix, J., Lajoie, P., Jaiswal, H., Burgard, C., Greiner, M., Zimmermann, R., . . . Dudek, J. (2010). BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERj1 for ribosomes. *J Biol Chem*. (285), S. 36427-36433.
- Bernstein, H. (1998). Membrane protein biogenesis: the exception explains the rules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (95), S. 14587-14589.
- Berridge, M., Bootman, M., & Roderick, H. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (4), S. 517-529.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L., Harding, H., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. (2), S. 326-332.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (77), S. 1496-1500.
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* (67), S. 835-851.
- Blobel, G., & Dobberstein, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol.* (67), S. 852-862.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S., Dower, W., Lipshutz, R., Sprang, S., Sambrook, J., & Gething, M. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*. (75), S. 717-728.
- Boding, L., Hansen, A., Nielsen, M., Meroni, G., Braunstein, T., Woetmann, A., . . . Geisler, C. (2014). Midline 1 controls polarization and migration of murine cytotoxic T cells. *Immun. Inflamm. Dis.* (2), S. 262-271.
- Bole, D., Hendershot, L., & Kearney, J. (1986). Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol.* (102), S. 1558-1566.



- Borgese, N., & Fasana, E. (2011). Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta*.(1808), S. 937-946.
- Brodsky, J., & McCracken, A. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol.* (10), S. 507-513.
- Brodsky, J., Goekeler, 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 U S A.* (92), S. 9643-9646.
- Buck, T., Wright, C., & Brodsky, J. (2007). The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol.*(18), S. 751-761.
- Burns, K., Helgason, C., Bleackley, R., & Michalak, M. (1992). Calreticulin in T-lymphocytes. Identification of calreticulin in T-lymphocytes and demonstration that activation of T cells correlates with increased levels of calreticulin mRNA and protein. *J Biol Chem.* (267), S. 19039-19042.
- Carrasco, S., & Meyer, T. (2011). STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu Rev Biochem.* (80), S. 973-1000.
- Carvalho, P., Stanley, A., & Rapoport, T. (2010). Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell.* (143), S. 579-591.
- Cheetham, M., & Caplan, A. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones.* (3), S. 28-36.
- Chen, X., Shen, J., & Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* (277), S. 13045-13052.
- Chen, Y., Zhang, Y., Yin, Y., Gao, G., Li, S., Jiang, Y., . . . Luo, J. (2005). SPD--a web-based secreted protein database. *Nucleic Acids Res.* (33), S. D169-D173.
- Christianson, J., Olzmann, J., Shaler, T., Sowa, M., Bennett, E., Richter, C., . . . Kopito, R. (2012). Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat Cell Biol.* (14), S. 93-105.
- Christianson, J., Shaler, T., Tyler, R., & Kopito, R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant  $\alpha$ 1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol.* (10), S. 272-282.
- Chung, K., Shen, Y., & Hendershot, L. (2002). BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem.* (277), S. 47557-47563.
- Conte, I., Keith, N., Gutiérrez-Gonzalez, C., Parodi, A., & Caramelo, J. (2007). The interplay between calcium and the in vitro lectin and chaperone activities of calreticulin. *Biochemistry.* (46), S. 4671-4680.
- Conti, B., Devaraneni, P., Yang, Z., David, L., & Skach, W. (2015). Cotranslational stabilization of Sec62/63 within the ER Sec61 translocon is controlled by distinct substrate-driven translocation events. *Mol. Cell.* (58), S. 269-283.
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* (26), S. 1367-1372.
- Cox, J., Hein, M., Lubner, C., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteom.* (13), S. 2513-2526.

- Dalbey, R., Lively, M., Bron, S., & van Dijl, J. (1997). The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* (6), S. 1129-1138.
- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A., Tia, X., Onoe, T., Qian, Q., . . . Somlo, S. (2004). Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet.* (36), S. 575-577.
- de Brito, O., & Scorrano, L. (2010). An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J.* (29), S. 2715-2723.
- Degen, E., & Williams, D. (1991). Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules. *J Cell Biol.* (112), S. 1099-1115.
- Deutsch, E., Csordas, A., Sun, Z., Jarnuczak, A., Perez-Riverol, Y., Ternent, T., . . . Vizcaíno, J. (2017). The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic Acids Research.* (45), S. D1100–D1106.
- Devaraneni, P., Conti, B., Matsumura, Y., Yang, Z., Johnson, A., & Skach, W. (2011). Stepwise Insertion and Inversion of a Type II Signal Anchor Sequence in the Ribosome-Sec61 Translocon Complex. *Cell.* (146), S. 134-147.
- Dimitrov, L., Lam, S., & Schekman, R. (2013). The role of the endoplasmic reticulum in peroxisome biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (5), S. a013243.
- Dong, M., Bridges, J., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T. (2008). ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol Biol Cell.* (19), S. 2620-2630.
- Dudek, J., Pfeffer, S., Lee, P., Jung, M., Cavalié, A., Helms, V., . . . Zimmermann, R. (2015). Protein transport into the human endoplasmic reticulum. *J Mol Biol.* (427), S. 1159-75.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., & Yakhini, Z. (2009). Gorilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics.* (10), S. 48.
- Egea, P., Shan, S., Napetschnig, J., Savage, D., Walter, P., & Stroud, R. (2004). Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature.* (427), S. 215-221.
- Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (4), S. 181-191.
- English, A., & Voeltz, G. (2013). Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (5), S. a013227.
- Erdmann, F., Schäuble, N., S, L., Jung, M., Honigmann, A., Ahmad, M., . . . Zimmermann, R. (2011). Interaction of calmodulin with Sec61 $\alpha$  limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* (30), S. 17-31.
- Esko, J., Bertozzi, C., & Schnaar, R. (2017). Chemical Tools for Inhibiting Glycosylation. In *Essentials of Glycobiology.*
- Evans, E., Gilmore, R., & Blobel, G. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (83), S. 581-585.
- Ferguson, M. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci.* (112), S. 2799-2809.
- Flanagan, J., Chen, J., Miao, Y., Shao, Y., Lin, J., Bock, P., & Johnson, A. (2003). Signal recognition particle binds to ribosome-bound signal sequences with fluorescence-detected subnanomolar affinity that does not diminish as the nascent chain lengthens. *J Biol Chem.* (278), S. 18628-18637.
- Flynn, G., Chappell, T., & Rothman, J. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science.* (245), S. 385-390.

- Fons, R., Bogert, B., & Hegde, R. (2003). Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J. Cell Biol.* (160), S. 529-539.
- Freeze, H. (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet.* (7), S. 537-551.
- Freeze, H. (2007). Congenital Disorders of Glycosylation: CDG-I, CDG-II, and beyond. *Curr Mol Med.* (7), S. 389-396.
- Freymann, D., Keenan, R., Stroud, R., & Walter, P. (1999). Functional changes in the structure of the SRP GTPase on binding GDP and Mg<sup>2+</sup>GDP. *Nat Struct Biol.* (6), S. 793-801.
- Friedman, J., & Voeltz, G. (2011). The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol.* (21), S. 709-717.
- Gao, N., & Lehrman, M. (2013). Mannose-6-phosphate: a regulator of LLO destruction. *Methods Mol Biol.* (1022), S. 277-282.
- Garnier, J., Osguthorpe, D., & Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* (120), S. 97-120.
- Garshasbi, M., Hadavi, V., Habibi, H., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Behjati, F., . . . Kuss, A. (2008). A Defect in the TUSC3 Gene Is Associated with Autosomal Recessive Mental Retardation. *Am J Hum Genet.* (82), S. 1158-1164.
- Gogala, M., Becker, T., Beatrix, B., Armache, J., Barrio-Garcia, C., Berninghausen, O., & Beckmann, R. (2014). Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature.* (506), S. 107-110.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., & Rapoport, T. (1992). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature.* (357), S. 47-52.
- Guerriero, C., & Brodsky, J. (2012). The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev.* (92), S. 537-576.
- Gundelfinger, E., Krause, E., Melli, M., & Dobberstein, B. (1983). The organization of the 7SL RNA in the signal recognition particle. *Nucleic Acids Res.* (11), S. 7363-7374.
- Haas, I., & Wabl, M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature.* (306), S. 387-389.
- Halic, M., & Beckmann, R. (2005). The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol.* (15), S. 116-125.
- Halperin, L., Jung, J., & Michalak, M. (2014). The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. *IUBMB Life.* (66), S. 318-326.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.* (166), S. 557-580.
- Harding, H., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell.* (5), S. 897-904.
- Hartmann, E., Görlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knespel, S., . . . Prehn, S. (1993). A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.* (257), S. 375-381.
- Haßdenteufel, S. (2017). *From targeting to Sec61 channel gating: transport of short presecretory and tail-anchored proteins into the human Endoplasmic Reticulum.* Universität des Saarlandes.

- Haßdenteufel, S., Johnson, N., Paton, A., Paton, J., High, S., & Zimmermann, R. (2018). Chaperone-Mediated Sec61 Channel Gating during ER Import of Small Precursor Proteins Overcomes Sec61 Inhibitor-Reinforced Energy Barrier. *Cell Rep.* (23), S. 1373-1386.
- Haßdenteufel, S., Klein, M., Melnyk, A., & Zimmermann, R. (2014). Protein transport into the human ER and related diseases, Sec61-channelopathies. *Biochem Cell Biol.* (92), S. 499-509.
- Haßdenteufel, S., Sicking, M., Schorr, S., Aviram, N., Fecher-Trost, C., Schuldiner, M., . . . Lang, S. (2017). hSnd2 protein represents an alternative targeting factor to the endoplasmic reticulum in human cells. *FEBS Lett.* (591), S. 3211-3224.
- Hebert, D., & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev.* (87), S. 1377-1408.
- Hegde, R., & Kang, S. (2008). The concept of translocational regulation. *J Cell Biol.* (182), S. 225-232.
- Helenius, A., & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* (291), S. 2364-2369.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., . . . von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature.* (433), S. 377-381.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (13), S. 89-102.
- Hosokawa, N., & Wada, I. (2016). Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L. *FEBS J.* (283), S. 157-172.
- Hyunsoo, K., Golub, G., & Park, H. (2005). Missing value estimation for DNA microarray gene expression data: local least squares imputation. *Bioinform.* (21), S. 187-198.
- Jadhav, B., McKenna, M., Johnson, N., High, S., Sinning, I., & Pool, M. (2015). Mammalian SRP receptor switches the Sec61 translocase from Sec62 to SRP-dependent translocation. *Nat Commun.* (6), S. 10133.
- Jaeken, J. (2010). Congenital disorders of glycosylation. *Ann N Y Acad Sci.* (1214), S. 190-198.
- Jaeken, J., & Péanne, R. (2017). What is new in CDG? *J Inherit Metab Dis.* (40), S. 569-586.
- Jaeken, J., Hennet, T., Matthijs, G., & Freeze, H. (2009). CDG nomenclature: time for a change! *Biochim Biophys Acta.* (1792), S. 825-826.
- Jaeken, J., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E., & Eeckels, R. (1980). Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?: 90. *Pediatric Research.* (14), S. 179.
- Jeong, H., Sim, H., Song, E., Lee, H., Ha, S., Jun, Y., . . . Lee, C. (2016). Crystal structure of SEL1L: Insight into the roles of SLR motifs in ERAD pathway. *Sci Rep.* (6), S. 20261.
- Jin, Y., Awad, W., Petrova, K., & Hendershot, L. (2008). Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP. *EMBO J.* (27), S. 2873-2882.
- Johnson, N., Haßdenteufel, S., Theis, M., Paton, A., Paton, J., Zimmermann, R., & High, S. (2013). The signal sequence influences post-translational ER translocation at distinct stages. *PLoS One.* (8), S. e75394.
- Jomaa, A., Boehringer, D., Leibundgut, M., & Ban, N. (2016). Structures of the E. coli translating ribosome with SRP and its receptor and with the translocon. *Nat Commun.* (7), S. 10471.

- Jones, M., Ng, B., Bhide, S., Chin, E., Rhodenizer, D., He, P., . . . Hegde, M. (2012). DDOST mutations identified by whole-exome sequencing are implicated in congenital disorders of glycosylation. *Am J Hum Genet.* (90), S. 363-368.
- Jooma, A., Boehringer, D., Leibundgut, M., & Ban, N. (2016). Structures of the E. coli translating ribosome with SRP and its receptor and with the translocon. *Nat. Commun.* (7), S. 10471.
- Joshi, A., Nebenfuhr, B., Choudhary, V., Satpute-Krishnan, P., Levine, T., Golden, A., & Prinz, W. (2018). Lipid droplet and peroxisome biogenesis occur at the same ER subdomains. *Nat Commun.* (9), S. 2940 .
- Jung, S., Kim, J., Reithinger, J., & Kim, H. (2014). The Sec62-Sec63 translocon facilitates translocation of the C-terminus of membrane proteins. *J Cell Sci.* (127), S. 4270-4278.
- Kalies, K., Rapoport, T., & Hartmann, E. (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol.* (141), S. 887-894.
- Kampinga, H., & Craig, E. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (11), S. 579-592.
- Kaneko, M., Yasui, S., Niinuma, Y., Arai, K., Omura, T., Okuma, Y., & Nomura, Y. (2007). A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett.* (581), S. 5355-5360.
- Kapp, K., Schrepf, S., Lemberg, M., & Dobberstein, B. (2009). Post-Targeting Functions of Signal Peptides. In R. Zimmermann., *Protein Transport into the Endoplasmic Reticulum.* Landes Bioscience.
- Kassenbrock, C., & Kelly, R. (1989). Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. *EMBO J.* (8), S. 1461-1467.
- KB, M. (1985). *U.S. Patentnr. 4.683.195.*
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., & Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis.* (11), S. 5-13.
- Klein, M., Zimmermann, K., Schorr, S., Landini, M., Klemens, P., Altensell, J., . . . Haferkamp, I. (2018). AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum. *Nat Commun.* (9), S. 3489.
- Kornfeld, R., & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* (54), S. 631-664.
- Krebs, J., Groenendyk, J., & Michalak, M. (2011). Ca<sup>2+</sup>-signaling, alternative splicing and endoplasmic reticulum stress responses. *Neurochem Res.* (36), S. 1198-1211.
- Kutay, U., Hartmann, E., & Rapoport, T. (1993). A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* (3), S. 72-75.
- Kyte, J., & Doolittle, R. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* (157), S. 105-132.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (227), S. 680-685.
- Lakkaraju, A., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J., Taunton, J., & Strub, K. (2012). Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell.* (23), S. 2712-2722.
- Lamb, H., Mee, C., Xu, W., Liu, L., Blond, S., Cooper, A., . . . Hawkins, A. (2006). The affinity of a major Ca<sup>2+</sup> binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP. *J Biol Chem.* (281), S. 8796-8805.

- Landry, J., Pyl, P., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M., Stütz, A., . . . Steinmetz, L. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *Genes, Genomes, Genetics*. (3), S. 1213-1224.
- Lang, S. (2012). *Charakterisierung der Funktionen und Regulationsmechanismen des humanen Sec61 Komplexes auf zellulärer Ebene*. Universität des Saarlandes.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S., Schorr, S., Schirra, C., Schäuble, N., . . . Dudek, J. (2012). Different effects of Sec61 $\alpha$ , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci*. (125), S. 1958-1969.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalié, A., & Zimmermann, R. (2011). Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca<sup>2+</sup> leak channels. *Channels (Austin)*. (5), S. 228-235.
- Lang, S., Pfeffer, S., Lee, P., Cavalié, A., Helms, V., Förster, F., & Zimmermann, R. (2017). An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front Physiol*. (8), 887.
- Lee, A., Iwakoshi, N., & Glimcher, L. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. (23), S. 7448-7459.
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (11), S. 739-750.
- Leznicki, P., Roebuck, Q., Wunderley, L., Clancy, A., Krysztofinska, E., Isaacson, R., . . . High, S. (2013). The association of BAG6 with SGTA and tail-anchored proteins. *PLoS One*. (8), S. e59590.
- Lièvremon, J., Rizzuto, R., Hendershot, L., & Meldolesi, J. (1997). BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem*. (272), S. 30873-30879.
- Lilley, B., & Ploegh, H. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*. (429), S. 834-840.
- Lin, H., Masso-Welch, P., Di, Y., Cai, J., Shen, J., & Subject, J. (1993). The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol Biol Cell*. (4), S. 1109-1119.
- Lin, P., Jongsma, C., Pool, M., & Johnson, A. (2011). Polytropic membrane protein folding at L17 in the ribosome tunnel initiates cyclical changes at the translocon. *J Cell Biol*. (195), S. 55-70.
- Linxweiler, M., Schorr, S., Schäuble, N., Jung, M., Linxweiler, J., Langer, F., . . . 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), S. 574.
- Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J., Yuan, L., & Klausner, R. (1988). Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell*. (54), S. 209-220.
- Liu, M., Lara-Lemus, R., Shan, S., Wright, J., Haataja, L., Barbetti, F., . . . Arvan, P. (2012). Impaired cleavage of preproinsulin signal peptide linked to autosomal-dominant diabetes. *Diabetes*. (61), S. 828-837.
- Lloyd, D., Wheeler, M., & Gekakis, N. (2010). A point mutation in Sec61 $\alpha$ 1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes*. (59), S. 460-470.

- Losfeld, M., Ng, B., Kircher, M., Buckingham, K., Turner, E., Eroshkin, A., . . . Freeze, H. (2014). A new congenital disorder of glycosylation caused by a mutation in SSR4, the signal sequence receptor 4 protein of the TRAP complex. *Hum. Mol. Genet.* (23), S. 1602-1605.
- Losfeld, M., Soncin, F., Ng, B., Singec, I., & Freeze, H. (2012). A sensitive green fluorescent protein biomarker of N-glycosylation site occupancy. *FASEB J.* (26), S. 4210-4217.
- Lu, Z., Zhou, L., Killela, P., Rasheed, A., Di, C., Poe, W., . . . Yan, H. (2009). Glioblastoma proto-oncogene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res.* (69), S. 9105-9111.
- Lundin, C., Kim, H., Nilsson, I., White, S., & von Heijne, G. (2008). Molecular code for protein insertion in the endoplasmic reticulum membrane is similar for N(in)-C(out) and N(out)-C(in) transmembrane helices. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (105), S. 15702-15707.
- Ma, Y., & Hendershot, L. (2001). The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell.* (107), S. 827-830.
- MacKay, C., Toth, R., & Rouse, J. (2009). Biochemical characterization of the SWI/SNF family member HTLF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (390), S. 187-191.
- Mades, A., Gotthardt, K., Awe, K., Stieler, J., Döring, T., Füsler, S., & Prange, R. (2012). Role of human sec63 in modulating the steady-state levels of multi-spanning membrane proteins. *PLoS One.* (7), S. e49243.
- Martinon, F., & Glimcher, L. (2011). Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Immunol.* (23), S. 35-40.
- Ménétret, J., Hegde, R., Aguiar, M., Gygi, S., Park, E., Rapoport, T., & Akey, C. (2008). Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure.* (16), S. 1126-1137.
- Meunier, L., Usherwood, Y., Chung, K., & Hendershot, L. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell.* (13), S. 4456-4469.
- Michalak, M., Robert Parker, J., & Opas, M. (2002). Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* (32), S. 269-278.
- Mohorko, E., Glockshuber, R., & Aebi, M. (2011). Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J Inherit Metab Dis.* (34), S. 869-878.
- Mohorko, E., Owen, R., Malojčić, G., Brozzo, M., Aebi, M., & Glockshuber, R. (2014). Structural basis of substrate specificity of human oligosaccharyl transferase subunit N33/Tusc3 and its role in regulating protein N-glycosylation. *Structure.* (22), S. 590-601.
- Müller, L., de Escauriaza, M., Lajoie, P., Theis, M., Jung, M., Müller, A., . . . Zimmermann, R. (2010). Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell.* (21), S. 691-703.
- Nagaraj, N., Kulak, N., Cox, J., Neuhauser, N., Mayr, K., Hoerning, O., . . . Mann, M. (2012). System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap. *Mol. Cell. Proteomics.* (1), S. M1111.013722.
- Nagaraj, N., Wisniewski, J., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., . . . Mann, M. (2011). Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Sys Biol.* (7), S. 548.
- Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., . . . Michalak, M. (2001). Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol.* (154), S. 961-972.

- Ng, B., Raymond, K., Kircher, M., Buckingham, K. W., Shendure, J., Nickerson, D., . . . Freeze, H. (2015). Expanding the molecular and clinical phenotype of SSR4-CDG. *Hum Mutat.* (36), S. 1048-1051.
- Nguyen, D. (2017). *Computational analysis of membrane transporters and their substrates.* Universität des Saarlandes.
- Nguyen, D., Stutz, R., Schorr, S., Lang, S., Pfeffer, S., Freeze, H., . . . Zimmermann, R. (2018). Proteomics reveals signal peptide features determining the client specificity in human TRAP-dependent ER protein import. *Nat Commun.* (9), 3765.
- Nicotera, P., & Orrenius, S. (1998). The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium.* (23), S. 173-180.
- Nyathi, Y., Wilkinson, M., & Pool, M. (2013). Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* (1833), S. 2392-2402.
- Olzmann, J., Kopito, R., & Christianson, J. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (5), S. a013185.
- O'Neil, K., & DeGrado, W. (1990). A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science.* (250), S. 646-651.
- Otero, J., Lizák, B., & Hendershot, L. (2010). Life and death of a BiP substrate. *Semin Cell Dev Biol.* (21), S. 472-478.
- Ou, W., Bergeron, J., Li, Y., Kang, C., & Thomas, D. (1995). Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem.* (270), S. 18051-18059.
- Pace, C., & Scholtz, J. (1998). A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys. J.* (75), S. 422-427.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* (189) S. 347-358.
- Park, E., Ménétret, J., Gumbart, J., Ludtke, S., Li, W., Whynot, A., . . . Akey, C. (2014). Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature.* (506), S. 102-106.
- Paton, A., & Paton, J. (2010). Escherichia Coli Subtilase Toxin. *Toxins.* (2), S. 215-228.
- Paton, A., Beddoe, T., Thorpe, C., Whisstock, J., Wilce, M., Rossjohn, J., . . . Paton, J. (2006). AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature.* (443), S. 548-552.
- Péanne, R., de Lonlay, P., Foulquier, F., Kornak, U., Lefeber, D., Morava, E., . . . Jaeken, J. (2017). Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur J Med Genet.* (6), S. 643-663.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Gogala, M., Schorr, S., Linxweiler, J., Lang, S., . . . Förster, F. (2014). Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat. Commun.* (5), S. 3072.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Schaffer, M., Ng, B., Albert, S., Plitzko, J., . . . Förster, F. (2017). Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex. *Nat. Commun.* (8), S. 1415-16.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Zimmermann, R., & Förster, F. (2016). Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* (1860), S. 2122-29.



- Pfeiffer, N., Dirndorfer, D., Lang, S., Resenberger, U., Restelli, L., Hemion, C., . . . Tatzelt, J. (2013). Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. *EMBO J.* (32), S. 1036-1051.
- Plempner, R., Böhmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., & Wolf, D. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* (388), S. 891-895.
- Prehn, S., Herz, J., Hartmann, E., Kurzchalia, T., Frank, R., Roemisch, K., . . . Rapoport, T. (1990). Structure and biosynthesis of the signal-sequence receptor. *Eur J Biochem.* (188), S. 439-445.
- Prins, D., & Michalak, M. (2011). Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (3); pii: a004069.
- Putney, J., Steinckwich-Besançon, N., Numaga-Tomita, T., Davis, F., Desai, P., D'Agostin, D., . . . Bird, G. (2017). The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* (1864), S. 900-906.
- Qi, L., Tsai, B., & Arvan, P. (2017). New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol.* (27), S. 430-440.
- Qian, Y., Patel, D., Hartl, F., & McColl, D. (1996). Nucleic Magnetic Resonance solution structure of the human Hsp40 HDJ-1 J domain. *J. Mol. Biol.* (260), S. 224-225.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem Sci.* (41), S. 1035-1049.
- Rao, R., Ellerby, H., & Bredesen, D. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* (11), S. 372-380.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* (76), S. 3116-3120.
- Rieusset, J. (2018). The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death Dis.* (9), S. 388.
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D., & Gilmore, R. (2009). Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell.* (136), S. 272-283.
- Schäuble, N. (2013). *Charakterisierung der Funktionen von Calmodulin und BiP bei der Regulation des humanen Sec61-Komplexes.* Universität des Saarlandes.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., . . . Zimmermann, R. (2012). BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. *EMBO J.* (31), S. 3282-3296.
- Schekman, R. (2004). Merging cultures in the study of membrane traffic. *Nat Cell Biol.* (6), S. 483-486.
- Schlenstedt, G., Gudmundsson, G., Boman, H., & Zimmermann, R. (1990). A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and posttranslationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J. Biol. Chem.* (265), S. 13960-13968.

- Schoebel, S., Mi, W., Stein, A., Ovchinnikov, S., Pavlovicz, R., DiMaio, F., . . . Liao, M. (2017). Cryo-EM structure of the protein-conducting ERAD channel Hrd1 in complex with Hrd3. *Nature*. (548), S. 352-355.
- Schorr, S. (2014). *Funktionelle Charakterisierung Translokon-assoziiierter Proteine*. Universität des Saarlandes.
- Schrag, J., Bergeron, J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D., & Cygler, M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*. (8), S. 633-644.
- Scott, D., & Schekman, R. (2008). Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. *J Cell Biol*. (181), S. 1095-1105.
- Shao, S., & Hegde, R. (2011). A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell*. (147), S. 1576-1588.
- Shao, S., & Hegde, R. (2011). Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. *Annu Rev Cell Dev Biol*. (27), S. 25-56.
- Shibatani, T., David, L., McCormack, A., Frueh, K., Skach, & WR. (2005). Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry*. (44), S. 5982-5992.
- Shrimal, S., Ng, B., Losfeld, M., Gilmore, R., & Freeze, H. (2013). Mutations in STT3A and STT3B cause two congenital disorders of glycosylation. *Hum Mol Genet*. (22), S. 4638-4645.
- Snapp, E., Reinhart, G., Bogert, B., Lippincott-Schwartz, J., & Hegde, R. (2004). The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Biol*. (164), S. 997-1007.
- Sommer, N., Junne, T., Kalies, K., Spiess, M., & Hartmann, E. (2013). TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. (1833), S. 3104-3111.
- Spang, A. (2009). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol*. (21), S. 531-536.
- Stefan, C., Manford, A., Baird, D., Yamada-Hanff, J., Mao, Y., & Emr, S. (2011). Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell*. (144), S. 389-401.
- Stefanovic, S., & Hegde, R. (2007). Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*. (128), S. 1147-1159.
- Suh, W., Burkholder, W., Lu, C., Zhao, X., Gottesman, M., & Gross, C. (1998). Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (95), S. 15223-15228.
- Suzuki, C., Bonifacino, J., Lin, A., Davis, M., & Klausner, R. (1991). Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. *J Cell Biol*. (114), S. 189-205.
- Swain, J., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D., Stotz, M., & Gierasch, L. (2007). Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol Cell*. (26), S. 27-39.
- Tatu, U., & Helenius, A. (1997). Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. (136), S. 555-565.

- Thastrup, O., Cullen, P., Drøbak, B., Hanley, M., & Dawson, A. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (87), S. 2466-2470.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S., Hao, Y., . . . Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell.* (126), S. 981-993.
- Tusher, V., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (98), S. 5116-5121.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M., Geiger, T., . . . Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods.* (13), S. 731-740.
- 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), S. 505-510.
- Van den Berg, B., Clemons, W. J., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S., & Rapoport, T. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature.* (427), S. 36-44.
- Van Lehn, R., Zhang, B., & Miller, T. 3. (2015). Regulation of multispinning membrane protein topology via post-translational annealing. *Elife.* (4), S. e08697.
- Vembar, S., & Brodsky, J. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (9), S. 944-957.
- Vermeire, K., Bell, T., Van Puyenbroeck, V., Giraut, A., Noppen, S., Liekens, S., . . . Marsh, M. (2014). Signal peptide-binding drug as a selective inhibitor of co-translational protein translocation. *PLoS Biol.* (12), S. e1002011.
- Vilardi, F., Stephan, M., Clancy, A., Janshoff, A., & Schwappach, B. (2014). WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane. *PLoS One.* (9), S. e85033.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem.* (133), S. 17-21.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol.* (184), S. 99-105.
- von Heijne, G. (1986). Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol.* (189), S. 239-242.
- Voorhees, R., & Hegde, R. (2016). Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science.* (351), S. 88-91.
- Voorhees, R., Fernández, I., Scheres, S., & Hegde, R. (2014). Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell.* (157), S. 1632-1643.
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P., Ou, W., Doherty, J., Louvard, D., . . . Bergeron, J. (1991). SSRa and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* (266), S. 19599-19610.
- Wallin, E., & von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* (7), S. 1029-1038.
- Walter, P., & Blobel, G. (1983). Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. *Cell.* (34), S. 525-533.
- Walter, P., & Blobel, G. (1983). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol.* (96), S. 84-93.

- Walter, P., & Johnson, A. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* (10), S. 87-119.
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* (334), S. 1081-1086.
- Wang, L., & Dobberstein, B. (1999). Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* (457), S. 316-322.
- Wang, S., & Kaufman, R. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* (197), S. 857-867.
- Watts, C., Wickner, W., & Zimmermann, R. (1983). M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, (80), S. 2809-2813.
- Wiedmann, M., Goerlich, D., Hartmann, E., Kurzchalia, T., & Rapoport, T. (1989). Photocrosslinking demonstrates proximity of a 34 kDa membrane protein to different portions of preprolactin during translocation through the endoplasmic reticulum. *FEBS lett.* (6), S. 263-268.
- Wiedmann, M., Kurzchalia, T., Hartmann, E., & Rapoport, T. (1987). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature.* (328), S. 830-833.
- Wijeyesakere, S., Gagnon, J., Arora, K., Brooks, C. 3., & Raghavan, M. (2015). Regulation of calreticulin-major histocompatibility complex (MHC) class I interactions by ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (112), S. E5608-17.
- Wisniewska, M., Karlberg, T., Lehtiö, L., Johansson, I., Kotenyova, T., Moche, M., & Schüler, H. (2010). Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One.* (5), S. e8625.
- Woo, H., Jiang, J., Lafer, E., & Sousa, R. (2009). ATP-induced conformational changes in Hsp70: molecular dynamics and experimental validation of an in silico predicted conformation. *Biochemistry.* (48), S. 11470-11477.
- Woolhead, C., McCormick, P., & Johnson, A. (2004). Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell.* (116), S. 725-736.
- Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L., & Liu, Q. (2015). Close and allosteric opening of the polypeptide-binding site in a human Hsp70 chaperone BiP. *Structure.* (23), S. 2191-2203.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* (107), S. 881-891.
- Zahedi, R., Völzing, C., Schmitt, A., Frie, M., Jung, M., Dudek, J., . . . Zimmermann, R. (2009). Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. *Proteomics.* (9), S. 3463-3473.

## Publikationen

### Publizierte Artikel

Nguyen, D., Stutz, R., Schorr, S., Lang, S., Pfeffer, S., Freeze, H., . . . Zimmermann, R. (2018). Proteomics reveals signal peptide features determining the client specificity in human TRAP-dependent ER protein import. *Nat Commun.* (9) 3765.

### Poster

Stutz, R., Nguyen, N., Schorr, S., Pfeffer, S., Förster, F., Helms, V., Dudek, J., Zimmermann, R., Lang, S.: Client spectrum of the translocon-associated protein complex (61<sup>st</sup> Annual Meeting of the Canadian Society for Molecular Biosciences, 11.-15.04.2018).

Stutz, R., Nguyen, N., Schorr, S., Pfeffer, S., Förster, F., Helms, V., Zimmermann, R., Dudek, J.: Client spectrum of the translocon-associated protein complex (13<sup>th</sup> ER & Redox Club Meeting, Homburg, 26.-29.04.2017).

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre umfangreiche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Chance zur Mitarbeit an diesem interessanten Projekt bedanken. Vielen Dank für die intensive Betreuung und Förderung, die konstruktive Kritik, die hilfreichen Anregungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. All dies und noch viel mehr hat zu meiner fachlichen und persönlichen Entwicklung beigetragen. Danke!

Prof. Dr. Barbara Niemeyer möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und den hilfreichen Anregungen zur Gestaltung der Arbeit meinen Dank aussprechen.

Dr. Emmanuelle Cordat danke ich ebenfalls für die Betreuung und die zahlreichen Ideen zur Organisation des Projekts.

Für die finanzielle Unterstützung und die Chancen über den Tellerrand hinauszuschauen möchte ich mich beim IRTG1830 sowie der Koordinatorin Dr. Gabriele Amoroso herzlich bedanken.

Auch danke ich den Kollaborationspartnern Dr. Duy Nguyen, Prof. Dr. Volkhard Helms, Dr. Nagarjuna Nagaraj, Dr. Stefan Pfeffer, Prof. Dr. Friedrich Förster, Prof. Dr. Hudson Freeze, Prof. Dr. Stephen High, Dr. Adrienne und Prof. Dr. James Paton für die Bereitstellung von Materialien, Daten und weitere Unterstützung!

Vor allem möchte ich den Kollegen in der AG Zimmermann und AG Schlenstedt danken. Der freundschaftliche Umgang und gegenseitige Unterstützung in organisatorischen Belangen sowie Laborarbeiten haben maßgeblich zum Gelingen des Projekts beigetragen. Vielen Dank für eure Begleitung, Sven Lang, Stefan Schorr, Martin Jung, Sabine Pelvay, Aline Herges, Markus Greiner, Maria Zimmermann, Julia Gartmann und Stefanie Cäsar!

Johanna danke ich herzlichst für die wundervolle Betreuung, produktive Ideen und die ständige (ortsunabhängige) Unterstützung in allen Belangen!

Zu tiefem Dank bin ich Mark Sicking, Hanne Folz und Sarah Haßdenteufel verpflichtet. Ich danke für die vielen fröhlichen Stunden, eure Freundschaft, uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, moralischen Beistand, kulinarischen Austausch, und die ungezügelten Diskussionen!

Mein besonderer Dank gilt Monika Lerner. Ich danke für die liebevolle Einarbeitung, die vergnügliche Zusammenarbeit, die immer helfenden Hände und unschätzbare Unterstützung in allen Lebenslagen!

Marie-Christine Klein, ich danke einfach für alles! Die Unterstützung von erster Minute an, all die aufbauenden und verständnisvollen Worte und Taten, für jedes Lächeln und Augenrollen, für alle Träume und für jeden einzelnen Kaffee!

Ich danke meinen Freunden, die fernab der Wissenschaft für die nötige Abwechslung und ständigen Zuspruch gesorgt haben. Allen voran Sarah Morsch, Annika Friedrich und Markus Keßler danke ich, dass sie immer zu mir halten!

Ich danke Holger Weber für die unglaubliche Geduld, die Fürsorge, unermüdliche Motivation, vorbehaltloses Verständnis und dafür, mich zum Lachen zu bringen, wenn ich es am meisten brauche. Danke, dass du an meiner Seite bist!

Mein uneingeschränkter Dank gilt meinen Eltern Beate und Bertram, die immer an mich glauben, es mir ermöglicht haben, meinen Träumen zu folgen, mich nie von meinen Wünschen abgehalten und mich in jeder meiner Entscheidungen unterstützt haben. Vielen Dank für die Förderung und den starken emotionalen Rückhalt! Diese Arbeit ist für euch!

Ohne euch alle wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen! Ich danke euch von Herzen!