

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

Charakterisierung der physiologischen Funktionen des Sec61-assoziierten Ca^{2+} -Leckstroms

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: Marie-Christine Klein

geb. am: 31.01.1987 in Saarlouis

Meiner Familie gewidmet

„We’re all stories in the end.
Just make it a good one, eh?“

Doctor Who

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>X</i>
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	5
2.1. Das Endoplasmatische Retikulum	5
2.2. Die Proteintranslokase	7
2.2.1. Struktur des Sec61-Komplexes	8
2.2.2. Akzessorische Proteine des Sec61.....	11
2.2.3. Der Proteintransport in das ER.....	14
2.2.4. Sec61-Channelopathies	17
2.3. Die zelluläre Ca²⁺-Homöostase	19
2.3.1. Ca ²⁺ als „second messenger“	19
2.3.2. Die Architektur der Ca ²⁺ -Homöostase: Ca ²⁺ -Pumpen, - Austauscher und -Kanäle	21
2.3.3. Reguliertes Ca ²⁺ -„Signaling“	24
2.3.4. Ca ²⁺ -Leckkanäle der ER-Membran.....	26
2.3.5. Integrative Aspekte der Ca ²⁺ - Homöostase	31
2.4. Die intrazelluläre ATP-Homöostase	38
2.4.1. Die zelluläre ATP-Produktion	39
2.4.2. Intrazellulärer ATP-Transport.....	41
2.4.3. Intrazelluläres Energie-„sensing“ durch AMPK-„signaling“	43
2.5. Zielsetzung der Arbeit	46
3. Materialien und Methoden	48
3.1. Materialien	48
3.1.1. Geräte	48
3.1.2. Software	50
3.1.3. Chemikalien	50
3.1.4. Kits	52
3.1.5. Oligonukleotide.....	52
3.1.6. Plasmide	53
3.1.7. Antikörper	55
3.1.8. Zelllinien	57

3.2. Methoden	58
3.2.1. Methoden der Zellkultivierung und -manipulation	58
3.2.2. Zellbiologische Analysemethoden	66
3.2.3. Methoden der Proteinbiochemischen Analytik	79
3.2.4. Methoden der Nukleinsäureanalytik.....	93
4. Ergebnisse.....	99
4.1. Einfluss der Sec61α-Integrität auf die Ca²⁺-Homöostase am Beispiel der PAD-assozierten Sec61α-Mutation V85D.....	99
4.1.1. Funktionelle Komplementationsanalyse mit Sec61 α (V85D) nach Depletion des endogenen Sec61 α	100
4.1.2. Transgene Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> vor endogenem Hintergrund – genetische Annäherung an die PAD-Patientensituation	111
4.2. Identifikation von SLC35B1 als ATP_{ER}-Carrier und Modell der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstroms für die Energieversorgung des ER.....	126
4.2.1. Isoformen und Genprodukte von SLC35B1	126
4.2.2. Einfluss der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 auf die HeLa-Zellphysiologie.....	128
4.2.3. Funktionelle Charakterisierung von SLC35B1	148
4.2.4. Untersuchungen zum funktionellen Netzwerk in Zusammenhang mit SLC35B1 und der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten passiven Ca ²⁺ -Leckstroms aus dem ER/und der regulatorischen Route	169
5. Diskussion.....	187
5.1. Einfluss der Sec61α-Integrität auf die Ca²⁺-Homöostase am Beispiel der PAD-assozierten Sec61α-Mutation V85D.....	187
5.1.1. Interpretation der Sec61 α (V85D)-Komplementation einer siRNA-vermittelten endogenen Sec61 α -Depletion	188
5.1.2. Versuche zur Phänokopie der heterozygoten Patientensituation: Sec61 α (V85D) vor endogenem Hintergrund.....	195
5.1.3. Vermehrter Ca ²⁺ -Leckstrom aus dem ER als Modell des Pathomechanismus für humane PAD	203
5.2. Identifikation von SLC35B1 als ATP_{ER}-Carrier und Modell der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstroms für die Energieversorgung des ER.....	208
5.2.1. Interpretationen zu den verschiedenen SLC35B1-Isoformen.....	209
5.2.2. Interpretationen der Auswirkung der SLC35B1-Depletion auf die HeLa-Zellphysiologie.....	209
5.2.3. Funktionelle Charakterisierung von SLC35B1 als ATP/ADP-Austauscher der ER-Membran...	214
5.2.4. Entdeckung der Einflussfaktoren Ca ²⁺ , Sec61 und BiP in der SLC35B1-Funktion und somit für die ATP-Regulation.....	223
5.2.5. Modell zur regulatorischen Route der ATP _{ER} -Regulation.....	227
6. Literaturverzeichnis.....	230

7. <i>Publikationen</i>	267
8. <i>Danksagung</i>	269

Abkürzungsverzeichnis

(m)RNA	engl. „(messenger) ribonucleid acid“
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
AAC	engl. „ADP/ATP-Carrier“
ADP	Adenosindiphosphat
ADTKD	engl. „autosomal-dominant tubulo-interstitial kidney disease“
AICAR	engl. „5-Aminoimidazole-4-carboxamie ribonucleotide“
AMPK	engl. „5‘ AMP activated protein kinase“
Apo-CaM	Ca ²⁺ -freie Form von CaM
ATF6	engl. „activating transcription factor 6“
ATP	Adenosintriphosphat
ATP _{Cyto}	ATP-Konzentration im Cytosol
ATP _{ER}	ATP-Konzentration im ER
BCL-2	engl. „apoptosis regulator Bcl-2“
BI-1	engl. „Bax inhibitor-1“
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CALHM1	engl. „Calcium homeostasis modulator 1“
CaM	Calmodulin
CaMCs	engl. „Ca ²⁺ regulated mitochondrial transporters“
CaMKK2	engl. „Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2“
CC BY 4.0	engl. „Creative Commons Attribution 4.0 International License“
CD	engl. „cluster of differentiation“
CDG	engl. „congenital disorder of glycosylation“
CET	Cryo-Elektronentomographie
CFP	engl. „cyan fluorescent protein“
CHOP	C/EBP homologes Protein
CRAC	engl. „Calcium Release-activated Calcium Current“
CVID	engl. „common variable immunodeficiency“
D	Aspartat
DBHQ	2,5-di(tert-butyl)hydrochinon
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure
DMEM	engl. „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DR5	engl. „death receptor 5“
eIF2	engl. „eukaryotic translation initiation factor 2“
EK	Endkonzentration
EM	Elektronenmikroskopie; Emetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	engl. „ER-associated degradation“
ERGIC	engl. „ER-Golgi intermediate compartment“
ERSE	engl. „ER stress response element“
ES	engl. „external solution“
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	glykosyliertes Polyepitid; Gramm
GFP	engl. „green fluorescent protein“
Hsp	engl. „heat shock protein“

HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
Ig	Immunglobulin
IMM	engl. „inner mitochondrial membrane“
IMS	engl. „inner membrane space“
Iono	Ionomycin
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalacto-pyranosid
IRE1	engl. „inositol-requiring protein-1“
kDa	Kilodalton
KO	engl. „knock out“
Ktr	Kontrolle
LKB	engl. „Liver kinase B“
LSD	engl. „lysosomal storage diseases“
LV	Leervektor
mA	Milliampere
MAM	engl. "mitochondria-associated ER membrane"
MCF	engl. „mitochondrial carrier family“
MCU	engl. „mitochondrial Ca^{2+} -Uniporter“
MFN	Mitofusin
mPTP	engl. „mitochondrial permeability transition pore“
MS	Massenspektrometrie
NBD	Nukleotidbindedomäne
NCLX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ -Austauscher
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
NEF	engl. „nucleotide exchange factor“
nm	Nanometer
NTT	Nukleotidtransporter
OMM	engl. „outer mitochondrial membrane“
ORAI	engl. „calcium release-activated calcium modulator 1“
ORF	engl. „open reading frame“
OST	engl. „oligosaccharyl transferase complex“
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
p	Vorläuferpolypeptid; Signifikanzwert
PAD	engl. „primary antibody deficiency“
pAMPK	phosphorylierte AMPK
PDB	Protein Data Bank
PDI	Protein-Disulfidisomerase
PERK	engl. „Proteinkinase RNA (PKR)-like ER Kinase“
PFK2	6-Phospho-fructo-2-kinase
PM	Plasmamembran
PMCA	engl. „Plasma Membrane ATPase“
POD	Peroxidase
PP2	Proteinphosphatase 2
<i>prl</i>	engl. „protein localization“
PS	Phosphatidylserin
pS	Picosiemens
PVDF	Polyvinylidendifluorid

qRT-PCR	engl. „quantitative Real-time PCR“
rER	raues ER
RFU	engl. „relative fluorescence unit“
RIDD	engl. „regulated IRE1 α dependent decay“
RLU	engl. „relative luminescence unit“
RM	raue Mikrosomen
RNC	eng. „ribosome nascent polypeptide chain plus SRP complex“
ROI	engl. „region of interest“
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
S1T	trunkierte SERCA-Isoform
SBD	Substratbindedomäne
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	engl. „standard error of the mean“
SERCA	engl. „Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase“
SIM	engl. "structured illumination microscopy"
SLC	engl. „solute carrier“
SND	engl. „SRP independent“
SOCE	engl. „store operated calcium entry“
SP	Signalpeptid
SPC	engl. „signal peptidase complex“
SP-Zellen	semipermeabilisierte Zellen
SR	SRP-Rezeptor; Sarcoplasmatisches Reticulum
SRP	engl. „signal recognition particle“
Stauro	Staurosporin
STIM	engl. „stromal interaction molecule“
TA	engl. „tail-anchor“
TCA	Trichloressigsäure
Tg	Thapsigargin
TMD	Transmembrandomäne
TRAM	engl. „translocating chain-associated membrane protein“
TRAP	engl. „translocon associated protein“
TRP	engl. „transient receptor potential“
Tu	Tunicamycin
TU KL	Technische Universität Kaiserslautern
UdS	Universität des Saarlandes
UPR	engl. „unfolded protein response“
V	Valin
VDAC	engl. „voltage-dependent anion channels“
v/v	Volumenprozent
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
XBP-1	engl. „X-box binding protein 1“
YFP	engl. „yellow fluorescent protein“

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Kristallstruktur von SecY aus <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	11
Abbildung 2.2: Der Chaperon-Zyklus von BiP.....	14
Abbildung 2.3: Modell des SRP-abhängigen (cotranslationalen) Proteinimports von Vorstufenprotein in das Säuger-ER.....	16
Abbildung 2.4: Targeting von Polypeptid-Vorläufern zur ER-Membran.....	17
Abbildung 2.5: Übersicht der zellulären Ca ²⁺ -Homöostase.....	25
Abbildung 2.6: Die Regulation des Sec61 Ca ²⁺ -Leckkanals.....	31
Abbildung 2.7: Organisation der MAMs.....	34
Abbildung 2.8: Die drei Signalkaskaden der UPR und apoptotisches „signaling“.....	37
Abbildung 2.9: Energiesensing durch die AMPK.....	45
Abbildung 3.1: Funktionsprinzip des ApoSENSOR-Assays zur Detektion von ADP und ATP in Zelllysaten.....	74
Abbildung 3.2: Bestimmung des intrazellulären ADP- und ATP-Gehaltes mit Hilfe von ApoSensor™.....	75
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des ER-spezifischen ATP-Sensors ERAT4.01.....	77
Abbildung 3.4: Kinetische Untersuchungen zu Apoptose und Nekrose in HeLa-Zellen nach Staurosporinbehandlung.....	79
Abbildung 4.1: Effekt der Komplementation mit Sec61α(V85D) auf die ER-Morphologie von HeLa-Zellen.....	102
Abbildung 4.2: Effekt der Komplementation mit Sec61α(V85D) auf den cytosolischen Ca ²⁺ -Gehalt Sec61α-depletierter HeLa-Zellen.....	105
Abbildung 4.3: Expressionskinetik nach Komplementation mit Sec61α, Sec61α(V85D) und Sec61α(Y344H) in HeLa-Zellen.....	108
Abbildung 4.4: Effekt der Depletion von Sec61β auf den cytosolischen Ca ²⁺ -Gehalt von HeLa-Zellen.....	110
Abbildung 4.5: Proteingehalt von Sec61α, Sec61β sowie der stressinduzierten Proteine BiP und Grp170 nach transgener Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> sowie <i>SEC61B-SEC61G</i> in HeLa-Zellen.....	113
Abbildung 4.6: Effekt der heterologen Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> sowie <i>SEC61B-SEC61G</i> auf den cytosolischen Ca ²⁺ -Gehalt in HeLa-Zellen.....	115
Abbildung 4.7: Effekt der heterologen Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> , sowie <i>SEC61B-SEC61G</i> auf den SOCE.....	117
Abbildung 4.8: Effekt der heterologen Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> sowie <i>SEC61B-SEC61G</i> auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Pool-Verteilung.....	119

Abbildung 4.9: Effekt der heterologen Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> , sowie <i>SEC61B-SEC61G</i> auf den cotranslationalen <i>in vitro</i> Proteintransport in das ER von SP-Zellen.	123
Abbildung 4.10: Effekt der heterologen Expression von <i>SEC61A1(V85D)</i> , sowie <i>SEC61B-SEC61G</i> auf den posttranslationalen <i>in vitro</i> Proteintransport in das ER von SP-Zellen.	124
Abbildung 4.11: Nachweis der SLC35B1-Isoformen.	127
Abbildung 4.12: Evaluierung der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 (mittels qRT-PCR und Western Blot).	132
Abbildung 4.13: Evaluierung der Komplementation der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion.	134
Abbildung 4.14: Effekt der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 auf die Zellproliferation und Lebendzellzahlen.	135
Abbildung 4.15: Effekt der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 auf die Morphologie von HeLa-Zellen.	140
Abbildung 4.16: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf die ER-Morphologie von HeLa-Zellen.	141
Abbildung 4.17: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf die Apoptose bzw. Nekrose in HeLa-Zellen.	144
Abbildung 4.18: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf den ER-Stress in HeLa-Zellen.	147
Abbildung 4.19: Lokalisation von SLC35B1 mittels 3D-SIM-Mikroskopie in HeLa-Zellen.	149
Abbildung 4.20: Lokalisation von SLC35B1-MYC-DDK mittels Immunpräzipitation (IP) in HeLa-Zellen.	152
Abbildung 4.21: Intrazelluläre Lokalisation der mit SLC35B1 präzipitierten Proteine.	156
Abbildung 4.22: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den ATP _{ER} -Gehalt in HeLa-Zellen.	158
Abbildung 4.23: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den Gehalt von ATP _{Cyto} in HeLa-Zellen.	160
Abbildung 4.24: Effekt heterolog exprimierter SLC35B1-Isoformen auf den ATP und ADP-Import in <i>E. coli</i>	162
Abbildung 4.25: Bestimmung des ATP/ADP-Antiport-Modus von SLC35B1.	164
Abbildung 4.26: Heterologe Expression der verschiedenen Isoformen von SLC35B1 in <i>E. coli</i> -Zellen.	166
Abbildung 4.27: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den intrazellulären ADP- und ATP-Gehalt in HeLa-Zelllysaten.	168
Abbildung 4.28: Effekt der SLC35B-Depletion auf den <i>in vitro</i> Proteintransport unter co- und post-Transportbedingungen in SP-Zellen.	172
Abbildung 4.29: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf die Ca ²⁺ -Mobilisierung und den zellulären Ca ²⁺ -Gehalt in HeLa-Zellen.	175
Abbildung 4.30: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den SOCE in HeLa-Zellen.	177

Abbildung 4.31: Einfluss der EM-vermittelten Sec61-Inhibition auf den erhöhten Ca^{2+} -Verlust nach SLC35B1-Depletion in HeLa-Zellen.	181
Abbildung 4.32: Einfluss der EM-vermittelten Sec61-Inhibition auf die Mechanismen des SOCE nach SLC35B1-Depletion in HeLa-Zellen.	182
Abbildung 4.33: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den Proteingehalt der AMPK in HeLa-Zellen.	185
Abbildung 5.1: <i>In silico</i> -Analyse des SLC35B1-Interaktoms	215
Abbildung 5.2: Die Proteinsequenzen verschiedener SLC35B1-Orthologe	221
Abbildung 5.3: Modell der ATP_{ER} -Regulationsroute	229

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide.....	52
Tabelle 3.2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Primer.....	53
Tabelle 3.3: Auflistung der in dieser Arbeit zur Transfektion von HeLa-Zellen verwendeten Plasmide	53
Tabelle 3.4: Auflistung der zur <i>in vitro</i> Transkription herangezogenen Plasmide.....	54
Tabelle 3.5: Übersicht der in der Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper zur immunologischen Detektion von Proteinen in HeLa-Zellen	55
Tabelle 3.6: Verwendete humane und bakterielle Zelllinien.....	57
Tabelle 3.7: Übersicht über die <i>in vivo</i> Expressionsversuche verschiedener transgener Proteine in HeLa-Zellen, ihren jeweiligen experimentellen Hintergrund und Versuchsaufbau	61
Tabelle 3.8: Übersicht der zur SIM-Mikroskopie eingesetzten Fluorophore.....	68
Tabelle 3.9: Pipettierschema für die Herstellung von Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE. 81	
Tabelle 3.10: Pipettierschema für die Herstellung von HS-Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE	82
Tabelle 3.11: Experimentelle Bedingungen für den <i>in vitro</i> Transport der zu analysierenden Vorläuferproteine.	92
Tabelle 4.1: Interaktom von SLC35B1 in HeLa-Zellen nach massenspektrometrischer Analyse immunpräzipitierter Proteine.....	153
Tabelle 4.2: Effekte verschiedener nicht-radioaktiver Substrate und Effektoren auf den SLC35B1-vermittelten ATP-Transport.	162
Tabelle 5.1: <i>In silico</i> -Vorhersagen zur Proteinstabilität der verschiedenen Sec61 α -Mutanten.....	191
Tabelle 5.2: Funktionelle Anreicherungen aus dem SLC35B1-Netzwerk basierend auf mit transgen exprimierten SLC35B1 immunpräzipitierten Interaktionspartnern.....	216

1. Zusammenfassung

Der Sec61-Kanal spielt außer in der Proteintranslokation eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase der Zelle, da die kanalbildende α -Untereinheit für Ca^{2+} durchlässig ist. Ob dieser Ca^{2+} -Leckstrom von der Zelle als physiologisches Signal und in einer Energieregulationsroute genutzt wird und wie bedeutend die kontrollierte Kanaldynamik für das Überleben der Zelle ist, zeigen die beiden in dieser Arbeit bearbeiteten Themenkomplexe.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine PAD (primäre Antikörperdefizienz)-assoziierte Sec61 α -Mutante untersucht (V85D, lokalisiert im Porenring des Kanals), die nach vorliegender Datenlage höchstwahrscheinlich zur Apoptose der Plasmazellen führt. Als Grund hierfür liegt die disruptierte Ca^{2+} -Homöostase der Plasmazellen nahe, da Versuche in HeLa-Zellen, die der Übertragung des Phänotyps in ein manipulierbares Zellmodell dienten, einen konstitutiven Verlust an Ca^{2+} aus dem ER offenbarten. Letzterer kann in Plasmazellen, die zellphysiologisch als professionell sekretorische Zellen mit der Aufgabe der ER-Expansion konfrontiert sind, besonders schwer wiegen und deshalb spezifisch diesen Zelltyp in die Apoptose treiben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms für die zelluläre ATP-Homöostase nachgegangen. Mit der Charakterisierung von SLC35B1 als ein ER-ständiges Protein, das in der Lage ist einen ATP/ADP-Austausch über Membranen zu vermitteln, wurde der Grundstein zum Verständnis der Regulation der Energiehomöostase gelegt. Mit Hilfe biochemischer Methoden, die den ATP-Transport *in vitro* sowie der ATP_{ER} *in vivo* bestimmten und unter Zuhilfenahme von „Live Cell Calcium Imaging“, Transportversuchen mit BiP-abhängigen Substraten und der Bestimmung von AMPK-Leveln SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen wurden verschiedene Eckpunkte der ER-Homöostase als beteiligte Faktoren in der ATP_{ER} -Regulation charakterisiert. Daraus resultiert das Herzstück dieser Arbeit, nämlich ein Modell für die Regulation der Energiehomöostase des ER. Fällt die ATP_{ER} -Konzentration ab, von der zahlreiche intralumenale Proteine, darunter BiP abhängig sind, dissoziiert BiP von Sec61, das es unter homöostatischen Bedingungen gegen den Verlust an Ca^{2+} schützt. Ca^{2+} , das folglich Sec61-vermittelt ins Cytosol gelangt, bindet an CaM und aktiviert die Ca^{2+} -abhängige CaMKK2, die den zentralen Energiesensor AMPK phosphoryliert und damit aktivieren kann. Letzterer führt bei Energiemangelzuständen dazu, dass katabolische Wege zur ATP-Produktion angestoßen werden, wie die Glykolyse durch Phosphorylierung der PF2K. Daraufhin wird ATP vermehrt über SLC35B1 ins ER transportiert, wobei auch zusätzlich eine direkte Aktivierung von

SLC35B1 durch Ca^{2+} -CaM beteiligt sein kann. Sobald die ATP-Konzentration wieder homöostatische Level erreicht hat, bindet BiP wieder an Sec61 und limitiert so den Ca^{2+} -Leckstrom und im Cytosol sorgt SERCA für die Rückführung von Ca^{2+} ins ER und PP2 für die Dephosphorylierung der aktivierten AMPK, wodurch der Signalweg inaktiviert wird.

Characterization of the physiological functions of the Sec61-associated Ca^{2+} -leak

Abstract

Besides its well established role in protein translocation, research of the last few years found that Sec61 also contributes significantly to the intracellular Ca^{2+} homeostasis. This is due to the Ca^{2+} permeability of the pore forming subunit Sec61 α . Unanswered questions revolve around controlled channel dynamics and the physiological roles of the Sec61 mediated Ca^{2+} leak, which this thesis is dedicated to.

In the first part, a PAD (primary antibody deficiency)-associated Sec61 α mutation (V85D, localizes to the pore ring) was analyzed in order to find the underlying physiological mechanism of the pathology. Cell biological and biochemical approaches point towards an apoptotic switch in mutation carrying plasma cells as a consequence of disrupted Ca^{2+} homeostasis. The latter results from constitutive Sec61 mediated ER- Ca^{2+} leak which was shown by phenocopying the pathological situation in a HeLa cell model. The hypothesis derived from the experiments is based on the pronounced dependency of plasma cells as professional secretory cells on a well regulated Ca^{2+} homeostasis because ER derived functions e.g. ER expansion is a prerequisite in their development.

The second part of the work is dedicated to the physiological role of the Sec61 mediated ER- Ca^{2+} leak in cellular ATP homeostasis. Characterising SLC35B1 as a protein of the ER-membrane that is able to mediate an ATP/ADP exchange over membranes in ATP transport assays was key to further analyse a potential energy regulation route. Biochemical approaches with SLC35B1 depleted HeLa cells determining the Ca^{2+} homeostasis, in vitro transport of BiP-dependent precursor proteins and cytosolic AMPK levels identify the key players of a potential signaling pathway used to ensure ATP_{ER} supply. The resulting model states that in the regulation circuit decreasing ATP_{ER} leads to impaired BiP function which fails to seal Sec61 against the loss of ER- Ca^{2+} . The increasing cytosolic Ca^{2+} is bound by CaM, which is an activating factor of CaMKK2, which again can phosphorylate and activate AMPK. Cytosolic AMPK is a central energy sensor, that activates catabolic pathways like glycolysis due to ATP deficiency. A potential glycolytic target of phosphorylated AMPK is PF2K, which is enhancing ATP-production and finally ATP is transported into the ER lumen via SLC35B1 residing in the ER membrane, which may additionally be activated by Ca^{2+} -CaM

binding to a cytosolic exposed IQ-motif. Having reached homeostatic ATP_{ER} levels the pathway secludes with BiP sealing Sec61 α , the ATPase SERCA restoring low cytosolic Ca^{2+} levels and the dephosphorylation of AMPK by PP2.

2. Einleitung

2.1. Das Endoplasmatische Retikulum

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Endoplasmatische Retikulum (ER) als essentielles Organell der Proteinbiogenese. Mit ein zentraler Unterschied zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ist in letzteren das Vorhandensein von Subkompartimenten (Stolz, 1998, Rout und Field, 2017). Das Schaffen von abgetrennten, als Funktionseinheit arbeitenden Organellen und dem Endomembransystem ist die Voraussetzung dafür eine Spezialisierung zu erreichen, die die Fähigkeit verleiht komplexeren Aufgaben nachzugehen (Margulis, 1981, Martin et al., 2015). Die Struktur des ER konnte nach Erfindung des Elektronenmikroskops im Jahre 1954 erstmals beobachtet und als distinktes Organell beschrieben werden (Palade und Porter, 1954). Kurz darauf verdichteten sich die Hinweise, dass das ER eine Rolle im sekretorischen Weg von Proteinen spielt (Siekevitz und Palade, 1960). Mit der Entdeckung der Signalsequenzen, die den Proteinen den Eintritt ins ER erlauben und der Formulierung der Signalthypothese, wurde ein neues Kapitel in der Erforschung sekretorischer Proteine aufgeschlagen (Blobel und Dobberstein, 1975b, Blobel und Dobberstein, 1975a). Heute ist bekannt, dass ein Drittel des eukaryotischen Proteoms den sekretorischen Weg einschlägt (Chen et al., 2005).

Das ER, das abhängig vom Zelltyp, ca. 10 % des Gesamtvolumens ausmacht, stellt ein durchgängiges Membransystem dar, das sowohl die Kernhülle miteinschließt, als auch periphere Ausläufer besitzt (Voeltz und Prinz, 2007, Schwarz und Blower, 2016, Van Anken E., 2016). Form und Verteilung des ER sind hoch dynamisch und durch eine Vielzahl von Proteinen und dem Zytoskelett reguliert (Shibata et al., 2010, Schwarz und Blower, 2016). Prinzipiell wird zwischen glattem (engl. "smooth") und rauem (engl. "rough") ER unterschieden. Der Eindruck des rauhen ERs entsteht durch die Besetzung der Membranen auf cytosolischer Seite mit Ribosomen, große Komplexe aus Proteinen und Ribonukleinsäuren, die mRNAs in Polypeptide translatieren (Shibata et al., 2006). Aus diesem Grund findet man das raue ER in den kernnahen Bereichen des ER, wo die mRNA aus dem Nukleus ins Cytosol austritt. Diese kernnahen, rauhen ER-Bereiche, in denen es vermehrt zur Proteinsynthese, -faltung und zu posttranslationalen Modifikationen kommt, weisen eine besondere Architektur auf: sie werden als ER-„Sheets“ oder Cisternen bezeichnet, liegen flach aufeinander, weisen eine geringe Krümmung auf und besitzen eine Lumenbreite von ca. 30 nm in Hefen und

50 nm in Säugetierzellen (Voeltz et al., 2002, Bernales et al., 2006, Shibata et al., 2006, West et al., 2011). Weiterhin existiert das glatte ER, das seinen Namen aufgrund der Abwesenheit von Ribosomen trägt. Oft korreliert das glatte ER mit denen sich bis in die Zellperipherie ausbreitenden ER-Tubuli (West et al., 2011). Die ER-Tubuli bilden ein verbundenes Netzwerk, das von den ER-„Sheets“ und der Kernhülle ausgeht (Westrate et al., 2015). Das tubuläre ER besitzt zwar eine ähnliche Lumenbreite wie die ER-„Sheets“, der größte Unterschied ist jedoch die ausgeprägte Krümmung, wodurch die ER-Tubuli ein höheres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis besitzen (Shibata et al., 2010, West et al., 2011, Westrate et al., 2015). Wenig überraschend ist es daher, dass die ER-Architektur den verschiedenen Aufgaben des jeweiligen Zelltyps folgt. Professionell sekretorische Zellen wie Plasmazellen oder β -Zellen des Pankreas weisen z.B. eine hohe Dichte an dicht gepackten ER-„Sheets“ auf, während Zellen, die vornehmlich in die Lipidsynthese und das „calcium signaling“ involviert sind oder Kontaktstellen zu anderen Organellen herstellen müssen, hauptsächlich aus tubulärem ER bestehen (Calame et al., 2003, Shibata et al., 2006, Terasaki et al., 2013). Neue hochauflösende Methoden der Mikroskopie beschreiben die Existenz sog. ER-Matices, besonders in peripheren Bereichen, die andere Organellen kontaktieren und ehemals als ER-„Sheet“-Strukturen charakterisiert wurden, aber eigentlich aus unterschiedlich dicht gepackten ER-Tubuli bestehen könnten (Nixon-Abell et al., 2016).

Der Proteinimport neu synthetisierter Proteine ist eine Kernaufgabe des ER. Dabei kann der Import neu synthetisierter Polypeptide, in Abhängigkeit vom Polypeptid, entweder cotranslational, d.h. während der Translation der mRNA durch Ribosomen an der ER-Membran erfolgen oder posttranslational, also im Anschluss an ihre Synthese (Dudek et al., 2015). In beiden Fällen erfolgt der Import in das ER durch den Sec61-Komplex (s. Kapitel 2.2) und seine akzessorischen Proteine, die in ihrer Gesamtheit auch als Proteintranslokase bezeichnet werden (Gorlich et al., 1992a, Gorlich und Rapoport, 1993). Innerhalb des ER werden die Polypeptide modifiziert und einer oxidativen Umgebung ausgesetzt, sowie mit ER-residenten Chaperonen zusammengebracht, um die Proteinfaltung und ggf. Disulfidbrückenbindungen sowie Oligomerisierung sicherzustellen, die zur Reifung notwendig sind (Hurtley und Helenius, 1989, Gething und Sambrook, 1992, Hartl und Hayer-Hartl, 2009). Auch in der Qualitätskontrolle, dem retrograden Transport (Hammond et al., 1994) und der Kontrolle der „Unfolded Protein Response“ (UPR) (Pincus et al., 2010) sind ER-residente Chaperone beteiligt. Zu diesen Chaperonen zählen unter anderem die Proteine BiP, Grp94, Calnexin und Calreticulin (van Anken et al., 2008, Halperin et al., 2014, Ellgaard et al., 2016). Viele Chaperone binden Ca^{2+} und sind in ihrer Funktion von Ca^{2+} abhängig

(Pena et al., 2010, Braakman und Hebert, 2013). Die Tatsache, dass das ER als intrazellulärer Hauptspeicher für Ca^{2+} fungiert, zeigt die Bedeutung der Homöostase zwischen Proteinfaltung und Ca^{2+} -Verfügbarkeit (Pena et al., 2010). Darüber hinaus sind viele Chaperone in ihrer Substratbindung und Substratfreilassung von einem ATPase-Zyklus abhängig (Braakman und Bulleid, 2011, Behnke et al., 2015, Bracher und Verghese, 2015b, Bracher und Verghese, 2015a, Melnyk et al., 2015). Auch die Proteinphosphorylierung, Glykosylierung und die Sterolbiosynthese sind ATP-abhängige Prozesse innerhalb des ER (Frasson et al., 2009, Blom et al., 2011, Mohorko et al., 2011, Ron und Harding, 2012). Somit wird deutlich, dass das ER als Herzstück des sekretorischen Wegs im regen Austausch mit sowohl nachgelagerten Stationen des sekretorischen Weges, wie dem Golgi-Apparat, der Plasmamembran und Lysosomen, als auch mit dem Cytosol, dem Ursprungsort der Proteinsynthese steht. Nicht nur im Rahmen des sekretorischen Weges, auch für beispielsweise die Lipidbiosynthese und -austausch (Wirtz und Zilversmit, 1968, Vance, 1991, Lev, 2010) bildet das ER Kontakte zum Golgi-Apparat, zu den Mitochondrien, den Endosomen, Peroxisomen und „Lipid droplets“ (Friedman und Voeltz, 2011, Jacquier et al., 2011, Schrul und Kopito, 2016). Für die Ca^{2+} -Regulation spielen vor allem Kontakte mit der Plasmamembran (West et al., 2011) und den Mitochondrien eine entscheidende Rolle (Scorrano, 2003, Zong et al., 2003, Rizzuto et al., 2012), worauf in den Kapiteln 2.3.2 und 2.3.5.1 näher eingegangen wird.

Zusammenfassen lassen sich die Vorüberlegungen zur ER-Homöostase wie folgt: das Leitthema des ER ist die Generierung und der dynamische Austausch diverser Substrate und Moleküle, was im Einklang mit der Vielzahl an Funktionen und deren Homöostase steht, die dieses Zellorganell übernimmt. Diese Dynamik spiegelt sich ebenfalls in der Struktur des ER wider, die hochdynamisch ist und die Fähigkeit besitzt sich auf distinkte Aufgaben wie beispielsweise die Mitose anzupassen oder zelltypabhängig verschieden aufgebaut ist (McCullough und Lucocq, 2005, Shibata et al., 2006, Terasaki et al., 2013, Van Anken E., 2016). Die Herausforderung in der Untersuchung einzelner Funktionen, wie im Rahmen dieser Arbeit des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms und den Untersuchungen zur Identifizierung eines putativen ER-ATP-Carriers besteht deshalb darin, die einzelnen Funktionen zu beleuchten und sie in das Gesamtnetzwerk einzuflechten.

2.2. Die Proteintranslokase

Die Translokation neu synthetisierter Polypeptide wird von einem Kanal vermittelt, der in allen drei phylogenetischen Domänen des Lebens konserviert und als heterotrimerer Sec61-

Komplex bekannt ist (Pohlschroder et al., 1997, Meyer et al., 2000, Dalbey, 2002, du Plessis et al., 2011, Park und Rapoport, 2012b). Dieser heterotrimeren Sec61-Komplex besteht aus der α -Untereinheit, die in Eukaryoten Sec61 α (Hefe Sec61p) und in Prokaryoten und Archäen SecY genannt wird. Die weiteren Untereinheiten werden in Eukaryoten Sec61 β (Hefe Sbh1p) und Sec61 γ (Hefe Sss1p) genannt, in Prokaryoten SecG und SecE und in Archaeen Sec β und SecE (Akiyama und Ito, 1987, Gorlich et al., 1992a, Gorlich et al., 1992b, Hartmann et al., 1994, Calo und Eichler, 2011). Frühe Untersuchungen zeigten bereits, dass es die polytope Sec61 α -Untereinheit ist, die eine wässrige Pore bildet und den Polypeptiden den Transit in das ER erlaubt (Simon et al., 1989, Simon und Blobel, 1991, Musch et al., 1992, Crowley et al., 1993, High und Stirling, 1993, Crowley et al., 1994, Mothes et al., 1994). Die Frage nach der nativen Assemblierung des Sec61-Komplexes während der Translokation wurde lange Zeit kontrovers diskutiert, da es Hinweise auf einen oligomeren Zustand des Sec61-Komplexes gab (Hanein et al., 1996, Mori et al., 2003, Snapp et al., 2004). Neuere strukturelle und funktionelle Daten lösten diese Vorstellung zugunsten eines monomeren Sec61-Komplexes bei der Translokation ab (Van den Berg et al., 2004, Becker et al., 2009, Park und Rapoport, 2012a, Taufik et al., 2013, Gogala et al., 2014, Park et al., 2014, Pfeffer et al., 2014).

2.2.1. Struktur des Sec61-Komplexes

Die erste Kristallstruktur des heterotrimeren Sec61-Komplexes (aus dem Archäon *Methanococcus jannaschii*) wurde 2004 mit einer Auflösung von 3,2 Å erhoben und lieferte Einblicke in die Organisation des Sec61-Komplexes und erlaubte Rückschlüsse auf dessen Dynamik (Van den Berg et al., 2004). Die hoch konservierte α -Untereinheit zeigt einen zweigeteilten Aufbau, der einmal die Transmembrandomänen (TMD) 1-5 und 6-10 umfasst (Van den Berg et al., 2004). Die γ -Untereinheit ist dabei wie eine Klammer um die beiden Hälften angeordnet, während die β -Untereinheit nur geringfügigen Kontakt zur α -Untereinheit hat (Van der Berg et al., 2004). Beide Termini der α -Untereinheit, sowie die N-Termini von Sec61 β und γ sind im Cytosol lokalisiert (Van den Berg et al., 2004). TM2a, die auch als „plug“ bezeichnet wird (deutsch Stopfen), blockiert den geschlossenen Tunnel am unteren Ende und stellt eine Barriere zwischen Cytoplasma und externer Umgebung dar (Van den Berg et al., 2004). Eine weitere Besonderheit der α -Untereinheit ist der sogenannte Porenring, der aus sechs hydrophoben Aminosäuren besteht (vornehmlich Isoleucine) und die schmalste Stelle mit einer Öffnung von 5-8 Å darstellt (Van den Berg et al., 2004) (siehe Abbildung 2.1). Die hydrophoben Aminosäuren bilden im offenen Tunnel einen Verschluss um das

translozierende Polypeptid und dichten die Pore auch gegen den Durchtritt kleiner Moleküle ab (Van den Berg et al., 2004, Cannon et al., 2005, Bol et al., 2007). Auch die Tatsache, dass in den Räumen auf beiden Seiten des Porenrings wenig geladene Aminosäuren vorkommen, hilft die elektrostatische Interaktionen zwischen Kanal und Polypeptid zu minimieren und die Translokation zu erleichtern (Van den Berg et al., 2004).

Das Signal, das zum Öffnen des Kanals notwendig ist, ist das Binden einer Signalsequenz, die als eine Schleife in den Kanal inseriert (Crowley et al., 1993, Jungnickel und Rapoport, 1995). Die Stelle, an der das Signalpeptid interkaliert, befindet sich zwischen TMD2b und TMD7 an der Vorderseite des cytosolischen Tunnels (Van den Berg et al., 2004, Saparov et al., 2007, Voorhees und Hegde, 2016a). Die gebundene Signalsequenz kann so die Interaktionen des „plug“ destabilisieren, wodurch sich der Kanal öffnet (Van den Berg et al., 2004).

Ein weiteres strukturelles Merkmal des Sec61-Kanals ist das sog. „laterale gate“, durch das TMD naszierender Membranproteine in die Lipidphase entlassen werden (Van den Berg et al., 2004, Gogala et al., 2014). Laut Strukturdaten befindet sich das „lateral gate“ zwischen den Transmembrandomänen TMD2 und TMD7 (Van den Berg et al., 2004, Pfeffer et al., 2016). Die Bindestellen für das Ribosom befinden sich in der C-terminalen Hälfte der α -Untereinheit, an den Schleifen zwischen TMD6 und TMD7 sowie zwischen TMD8 und TMD9 und am C-Terminus (Van den Berg et al., 2004).

Die sog. *prl*-Mutationen (engl. „protein localization“) wurden ursprünglich zusammen mit den *sec*-Mutationen (engl. „secretion“) zur genetischen Identifizierung der zellulären Exportmaschinerie in *E. coli* genutzt (Emr et al., 1981, Bieker et al., 1990) und trugen später zum Verständnis und der Aufklärung um die Öffnung des Sec61-Komplexes bei (Van den Berg et al., 2004, Smith et al., 2005). Die meisten *prl*-Mutationen aus *E. coli* liegen im Zentrum des Kanals, vor allem im Inneren der TMD7 und im „plug“ (Bieker et al., 1990, Bieker und Silhavy, 1990, Derman et al., 1993). Bei anderen *prl*-Mutationen sind hydrophobe Reste des Porenrings zu hydrophilen ausgetauscht. Sie verursachen zum Teil die Destabilisierung des geschlossenen Zustands des Kanals und imitieren so den Effekt, den die Bindung eines Signalpeptids hätte und sprechen für einen Signalsequenz-vermittelten „gating“-Schritt (Van den Berg et al., 2004, Smith et al., 2005). Auch in Hefen konnten einige Proteine mit defekten Signalsequenzen von Sec61-*prl*-Mutationen supprimiert werden (Junne et al., 2007).

Obwohl der quieszente Sec61-Komplex, wie er in der Kristallstruktur aufgelöst werden konnte, bahnbrechende Erkenntnisse lieferte, bemühen sich neuere Untersuchungen immer mehr um eine nativere Sicht auf die dynamischen Vorgänge am Sec61-Komplex in Hinblick

auf die Insertion des Signalpeptids und das Öffnen des „lateral gate“. Gewinnend haben sich dafür neue technologische Fortschritte in cryo-Elektronenmikroskopie (EM)-Rekonstruktionen des Ribosom-Sec61 Komplexes mit oder ohne Signalsequenz erwiesen (Voorhees et al., 2014, Voorhees und Hegde, 2016b). Sie beschreiben einen sog. „priming“-Schritt für die Ankunft des Transportsubstrats durch die Bindung des Ribosoms an die cytosolischen Schleifen zwischen den Helices 6 und 7 sowie zwischen 8 und 9. Dadurch wird der quieszente Zustand verlassen und das „lateral gate“ destabilisiert, wodurch das ankommende hydrophobe Signalpeptid auf eine hydrophobe Region in der Mitte des Kanals trifft und dort interkaliert (Voorhees et al., 2014). Dadurch erfährt der Kanal eine Rotation, wodurch das „laterale gate“ geöffnet wird und die Porenring-Aminosäuren, die den „plug“ stabilisieren, wegbewegt werden (Voorhees und Hegde, 2016b, Voorhees und Hegde, 2016a). Neue Untersuchungen mittels der Cryo-Elektronentomographie (CET) zeigen, dass im Gegensatz zu vorherigen Modellen, die lateral geöffnete Form von Sec61 die einzige Konformation ist, die in nativen nicht translatierenden Ribosomen-gebundenen Sec61-Komplexen vorkommt, unabhängig des „idle“ (unbeschäftigten), translozierenden, oder TMD-inserierenden Zustandes (Pfeffer et al., 2015). Letzteres spricht dafür, dass das Ribosom allein in nativer Umgebung das „lateral gate“ öffnen kann (Pfeffer et al., 2015, Pfeffer et al., 2016). Eine mögliche Interpretation des geöffneten „lateral gate“ im Ribosomen-gebundenen Zustand ist das verbleiben von Signalsequenzen oder Transmembranhelices an Sec61 zur weiteren Reifung durch Translokon-Komponenten (Pfeffer et al., 2017). Auch eine Röntgenstruktur von SecA-SecY mit Substrat zeigte, dass das „lateral gate“ nicht nur transient während der Membranproteinintegration geöffnet ist, sondern auch beim Transport von löslichen Proteindomänen mit Signalsequenzen oder von Transmembranhelices, die außerhalb des „lateral gate“ interkalieren (Li et al., 2016). Letztlich konkurrieren mehrere „gating“-Modelle zum gegebenen Zeitpunkt, die aufgrund der verschiedenen experimentellen Herangehensweisen nur schwer miteinander vergleichbar sind (Pfeffer et al., 2016, Voorhees und Hegde, 2016a, Rapoport et al., 2017).

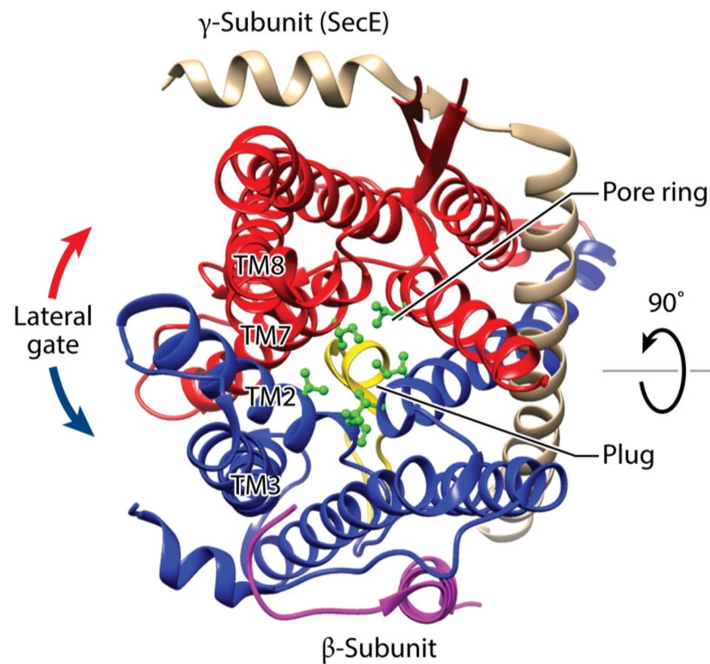


Abbildung 2.1: Kristallstruktur von SecY aus *Methanocaldococcus jannaschii* (Protein Data Bank-Code 1RH5). Darstellung aus Sicht des Cytosols inklusive der Porenring-Aminosäuren (grün) und dem „plug“ (gelb). Die beiden Hälften der α -Untereinheit sind in blau bzw. rot gekennzeichnet. Die Lage der β (pink)- und γ (beige)-Untereinheiten ist ebenfalls markiert. Diejenigen TMs (2,3,7,8), die an der Bildung des „lateralen gates“ beteiligt sind, sind eingezeichnet. (Geändert nach Rapoport et al., 2017, mit Erlaubnis von ANNUAL REVIEWS via Copyright Clearance Center)

2.2.2. Akzessorische Proteine des Sec61

Die humane Translokase besitzt neben dem Sec61-Komplex mit seiner porenbildenden α -Untereinheit eine Vielzahl der sog. Sec61-assoziierten Proteine, worunter BiP, TRAM, der TRAP-Komplex, der Sec62/63-Komplex, ERj1, RAMP4, Pat-10, palmytiliertes Calnexin und die Nukleotidaustauschfaktoren für BiP: Grp170 und Sil1 zusammengefasst werden (Dudek et al., 2015). Ferner gibt es modifizierende Proteine, den Signalpeptidase-Komplex (SPC) und den OST-Komplex, die für die Signalsequenzabspaltung sowie die N-Glykosylierung der translozierten Proteine verantwortlich sind (Dudek et al., 2015) und ebenfalls zum Translokationsapparat gehören.

Mit der Weiterentwicklung der CET in Kombination mit der Subtomogramm-Analyse können mittlerweile Strukturen großer Makromoleküle in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden (Briggs et al., 2003, Forster und Hegerl, 2007, Pfeffer et al., 2015). Dies ermöglichte das Auffinden von bis zu zehn ER-Membranproteinen und Komplexen in dichter räumlicher Nähe zu dem Ribosomen-gebundenen Sec61-Komplex, die in die Proteinsynthese und -translokation involviert sind. Mit Hilfe dieser Methode konnten in rER-Vesikeln (humanen und caninen) Sec61, TRAP und OST in einer Auflösung von 20 Å dargestellt werden. Dabei

wurde auch aufgeklärt, dass es sich bei TRAP um eine stöchiometrische Komponente und bei OST um eine Komponente handelt, die nur in 40-70 % der Fälle Teil des Translokons ist (Pfeffer et al., 2012, Pfeffer et al., 2014). Zu unterscheiden sind generell cytosolische Komponenten der Translokase (CaM), Komponenten der ER-Membran ohne J-Domäne (TRAM, TRAP, SR, Sec62, RAMP4), modifizierende Enzyme der ER-Membran (OST, SPC), J-Domänenproteine der ER-Membran (ERj2 (Sec63), ERj1, ERj7), lumenale J-Domänenproteine (ERj3-6), das Hsp70-Chaperon des ER-Lumens BiP, sowie seine Nukleotidaustauschfaktoren Grp170 und Sil1 (Dudek et al., 2015).

Es existiert somit keine generelle Zusammensetzung der Translokase, sondern vielmehr reagiert die Zelle auf den Bedarf an die intrinsischen Eigenschaften, die die zu transportierenden Substrate innehaben, wie in Kapitel 2.2.3. erläutert wird.

2.2.2.1. BiP als lumenale Komponente des Translokons

In Hinblick auf die wissenschaftliche Fragestellung dieser Arbeit soll vornehmlich auf den Mechanismus des ER-luminalen Hsp70-Chaperons Proteins BiP eingegangen werden, da es eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase und dem Proteintransport spielt. Weiterhin übernimmt BiP essentielle Aufgaben in der ER-Qualitätskontrolle, insbesondere der Bindung fehlgefalteter Proteine (Hurtley et al., 1989, Hurtley und Helenius, 1989, Machamer et al., 1990, Marquardt und Helenius, 1992, Hammond und Helenius, 1994a, Hammond und Helenius, 1994b) und der Regulation der UPR (Kapitel 2.3.5.2). Weiterhin wurde eine Rolle für BiP innerhalb der ER-assoziierten Degradation (ERAD), vor allem im retrograden Transport proteasomal zu degradierender Proteine beschrieben (Plemper et al., 1997, Brodsky et al., 1999, Stolz und Wolf, 2010, McCaffrey und Braakman, 2016). In diesem Abschnitt soll auf den ATPase-Zyklus und die Hsp40-Co-Chaperone eingegangen werden, die wichtige Charakteristika im Verständnis der BiP-Chaperonfunktion sind.

Entdeckt wurde BiP durch seine Beteiligung an der Assemblierung von Immunoglobulinen, wonach es auch benannt ist (BiP = engl. „Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein“) (Haas und Wabl, 1983). BiP ist mit einer Konzentration im millimolaren Bereich das abundanteste Protein der Hsp70-Familie im ER-Lumen (Lievremont et al., 1997). Chaperone der Hsp70-Familie binden reversibel Polypeptide mit Hilfe ihre Substratbindedomäne (SBD) (Hartl, 1996, Zhu et al., 1996, Bukau und Horwich, 1998). Typische Hsp70-Substrate sind hydrophobe Oligopeptide, die von den zu faltenden Polypeptiden exponiert werden (Flynn et al., 1991, Blond-Elguindi et al., 1993). Die Bindung eines solchen Substrats mit der SBD des Hsp70-Chaperons verhindert unspezifische Interaktionen und führt zur produktiven Faltung (Dudek et al., 2009). Die Bindung und Freisetzung von Substraten geschieht durch die

Kommunikation zwischen der SBD und der Nukleotidbindedomäne (NBD) (Jiang et al., 2007). Letztere wird durch den ATP-Zyklus reguliert, sowie durch Hsp70-Interaktionspartner (Flaherty et al., 1990, Zhu et al., 1996, Dudek et al., 2009) (siehe Abbildung 2.2). BiP besitzt in seiner ATP-gebundenen Form eine niedrige Substrataffinität, im Gegensatz zur ADP-gebundenen Form (Dudek et al., 2009, Mayer, 2013). Die ATPase-Aktivität und Substratbindung von BiP wird durch Hsp40-Co-Chaperone stimuliert (Silver und Way, 1993, Suh et al., 1998). Die bislang bekannten Hsp40-Co-Chaperone des ER sind von ERj1 bis ERj7 durchnummeriert, wobei zwischen lumenalen (ERj3, ERj5, ERj6) und membrangebundenen Hsp40-Co-Chaperonen mit lumenaler J-Domäne (ERj1, ERj2, ERj4, ERj7) unterschieden wird (Qiu et al., 2006, Kampinga und Craig, 2010, Melnyk et al., 2015). Durch die Stimulation der J-Domäne kommt es zur ATP-Hydrolyse der NBD, wodurch eine Konformationsänderung der SBD erfolgt, die das Substrat mit viel höherer Affinität bindet (Melnyk et al., 2015). Weiterhin existieren sog. Nukleotidaustauschfaktoren (NEF) für BiP, die im Säuger-ER durch Sil1 und Grp170 repräsentiert sind (Chung et al., 2002, Weitzmann et al., 2006). Die Aufgabe der NEFs ist es den Austausch von ADP zu ATP zu stimulieren, wodurch das Substrat aus der SBD freigesetzt wird und ein neuer ATPase-Zyklus beginnen kann (Wei und Hendershot, 1995, Theyssen et al., 1996).

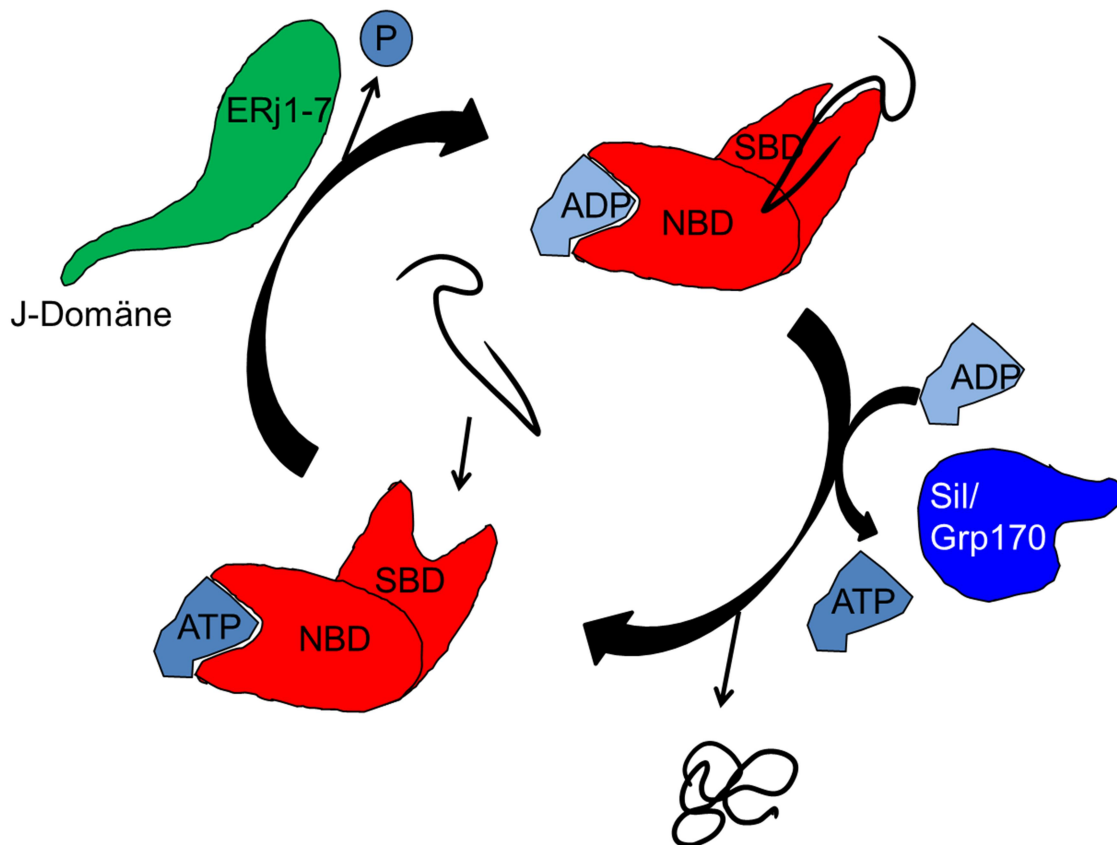


Abbildung 2.2: Der Chaperon-Zyklus von BiP. BiP in seiner ATP-gebundenen Form besitzt eine niedrige Substrataffinität, im Gegensatz zur ADP-gebundenen Form. Die ATPase-Aktivität und Substratbindung von BiP wird durch Hsp40-Co-Chaperone stimuliert. Die bislang bekannten Hsp40-Co-Chaperone des ER sind von ERj1 bis ERj7 durchnummeriert, wobei zwischen lumenalen (ERj3, ERj5, ERj6) und membrangebundenen Hsp40-Co-Chaperonen mit lumenaler J-Domäne (ERj1, ERj2, ERj4, ERj7) unterschieden wird. Durch die Stimulation der J-Domäne kommt es zur ATP-Hydrolyse der NBD, wodurch eine Konformationsänderung der SBD erfolgt, die das Substrat mit viel höherer Affinität bindet. Weiterhin existieren sog. Nukleotidaustauschfaktoren (NEF) für BiP, die im Säuger-ER SiI1 und Grp170 heißen. Die Aufgabe der NEFs ist es den Austausch von ADP zu ATP zu stimulieren, wodurch das Substrat aus der SBD freigesetzt wird und ein neuer ATPase-Zyklus beginnen kann.

2.2.3. Der Proteintransport in das ER

Der humane Proteintransport sowie die Insertion von Membranproteinen wird durch den heterotrimeren Sec61-Komplex vermittelt, wie die Rekonstitution aufgereinigter Bestandteile und der zellfreie Transport in Proteoliposomen zeigen konnten (Gorlich et al., 1992a, Gorlich und Rapoport, 1993, Hartmann et al., 1994). Zum physiologischen Transport einiger Vorläuferproteine ins ER sind darüber hinaus eine Reihe von akzessorischen Proteinen und Komplexen, wie Sec62, TRAM, TRAP beteiligt (Deshaies und Schekman, 1990, Voigt et al., 1996, Matlack et al., 1997, Hegde et al., 1998, Fons et al., 2003, Sommer et al., 2013) (siehe Kapitel 2.2.2).

Prinzipiell lassen sich zwei Modi unterscheiden wie der Transport von Vorläuferproteinen in das ER vermittelt wird, einmal cotranslational, also während der ribosomalen Synthese direkt an der ER-Membran und einmal posttranslational, was den Transport eines vollständig synthetisierten Polypeptids nach seiner Synthese im Cytosol über die ER-Membran beschreibt. Die beteiligten cytosolischen, sowie Sec61-assoziierten Komponenten an den jeweiligen Transportmodi unterscheiden sich ebenfalls (Haßdenteufel et al., 2014). Peptide am N-Terminus innerhalb der Vorläuferproteine, die der Zielsteuerung an die ER-Membran und den Translokationskanal dienen, werden als Signalpeptide (SP) bezeichnet und sind durch einen generell dreigeteilten Aufbau charakterisiert. Es gibt den hydrophoben Kern des Signalpeptids (H), die N-Region mit positiv geladenen Seitenketten und eine ungeladene polare Sequenz (C) (Blobel und Dobberstein, 1975b, Blobel und Dobberstein, 1975a, Zimmermann et al., 2011). Beim cotranslationalen Transport erfolgt im Cytosol eine Erkennung des hydrophoben Teils des N-terminalen Signalpeptids durch SRP (engl. „signal recognition particle“), sobald das Signalpeptid aus dem translatierenden Ribosom austritt (Meyer und Dobberstein, 1980, Walter und Blobel, 1981a, Walter und Blobel, 1981b, Walter et al., 1981, Nyathi et al., 2013) (siehe Abbildung 2.3). Diese Bindung von SRP an das Signalpeptid setzt die Translationgeschwindigkeit herab und ermöglicht dem RNC (eng. „ribosome nascent polypeptide chain plus SRP complex“) den SRP-Rezeptor in der ER-Membran zu erreichen (Walter und Blobel, 1981a, Walter und Blobel, 1981b, Walter et al., 1981, Mary et al., 2010). Neben diesem Szenario kann die Synthese der Polypeptide auch an ER-Membran-residenten Ribosomen starten, wofür SRP nicht gebraucht wird (Potter et al., 2001, Potter und Nicchitta, 2002). Einige Signalsequenzen sind stark genug, um Sec61 zu öffnen oder sie nutzen das „Priming“ durch das Ribosom beim cotranslationalen Transport. Andere Signalsequenzen gelten als schwächer in Hinblick auf die Kanalöffnung und benötigen dazu die Hilfe von Sec61-assoziierten Proteinen wie BiP, Sec62 und Sec63, was auch insbesondere für kurze humane Vorläuferproteine gilt (Lang et al., 2012, Schäuble et al., 2012, Johnson et al., 2013, Conti et al., 2015, Haßdenteufel et al., 2018).

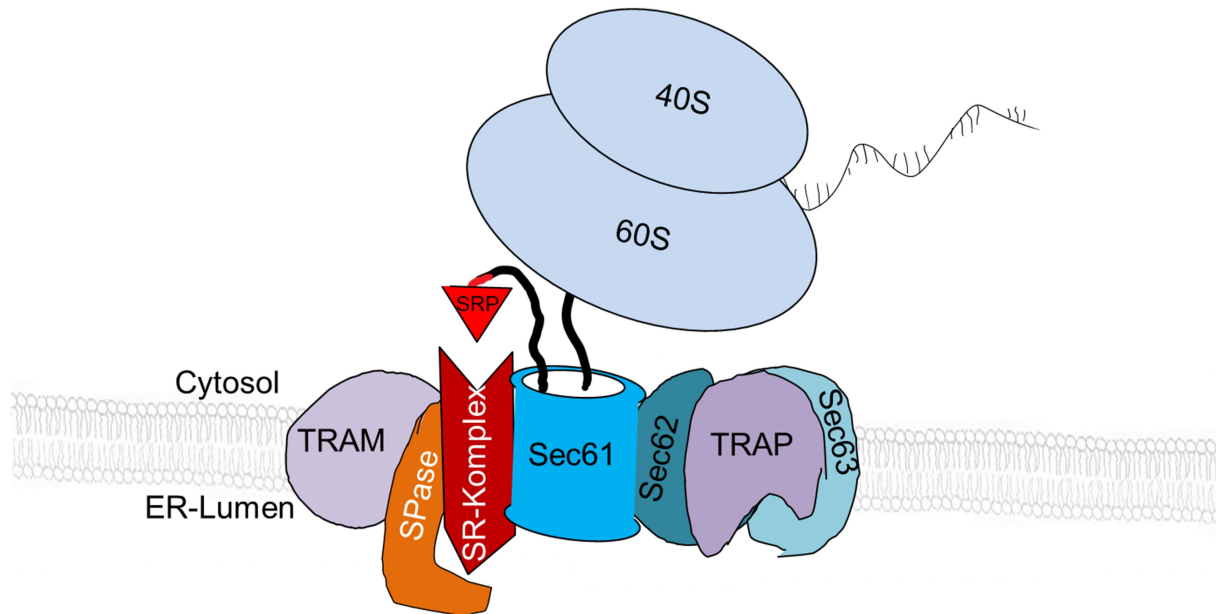


Abbildung 2.3: Modell des SRP-abhängigen (cotranslationalen) Proteinimports von Vorstufenprotein in das Säuger-ER. Beim cotranslationalen Transport erfolgt im Cytosol eine Erkennung des hydrophoben Teils des Signalpeptids durch SRP, sobald das Signalpeptid aus dem translatierenden Ribosom heraustritt. SRP bindet an seinen SRP-Rezeptorkomplex der ER-Membran, woraufhin das Polypeptid während der fortschreitenden Synthese ins ER-Lumen transportiert wird. Die Signalsequenz wird anschließend von der SPase abgespalten. Je nach zu transportierendem Substrat können akzessorische Komponenten des Sec61-Komplexes nötig werden, wie Sec62, Sec63, TRAM und TRAP.

Als den größten Unterscheid ist beim posttranslationalen Transport die fehlende Beteiligung von SRP zu sehen und die Tatsache, dass bereits fertig synthetisierte Polypeptide transportiert werden (Lang et al., 2017). Die Polypeptide werden im Cytosol mit Hilfe der Aktivität von Hsp70- und Hsp40-Chaperonen translokationskompetent gehalten (Chirico et al., 1988, Deshaies et al., 1988, Zimmermann et al., 1988, Lang et al., 2017). Die Zielführung zum Translokon erfolgt mit Hilfe von TRC40 und Calmodulin (CaM), die als Chaperone für den posttranslationalen Proteinimport von „tail-anchor (TA)“-Membranproteinen eine Rolle spielen (Shao und Hegde, 2011, Johnson et al., 2012, Ast et al., 2013). Letztere sind Typ-2 Membranproteine, die die Membran einmal durchspannen und sich dadurch auszeichnen, dass ihre TMD C-terminal lokalisiert ist, wodurch sie dem SRP-Targeting entgehen (Kutay et al., 1993, Borgese und Fasana, 2011). Der entsprechende Rezeptor in der ER-Membran ist der aus WRB und CAML bestehende TRC-Komplex (Rabu et al., 2009, Borgese und Fasana, 2011, Yamamoto und Sakisaka, 2012). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das Targeting mittels TRC40 nicht auf TA-Proteine beschränkt ist, sondern auch bei kurzen, sekretorischen Proteinen Anwendung findet (Johnson et al., 2012) (siehe Abbildung 2.4). Dabei liegt der Grund weshalb kurze Vorläuferproteine das SRP/SR-System nicht effizient nutzen können, vermutlich darin, dass sie das Ribosom bereits verlassen haben, bevor SRP binden kann

(Schlenstedt et al., 1990, Lakkaraju et al., 2012). Das Targeting dieser Polypeptide ist deshalb von anderen Proteinen abhängig, wie Sec62, TRC und den neu entdeckten Komponenten des SND-Wegs (engl. „SRP independent“) der Hefen, von denen das humane Ortholog des ER-Membranrezeptors, hSND2 kürzlich gefunden wurde (Johnson et al., 2012, Aviram et al., 2016, Haßdenteufel et al., 2017, Haßdenteufel et al., 2018).

Obwohl der SRP-abhängige Translokationsweg in Säugern der dominanter ist, scheinen die Maschinerien über die Beteiligung der Sec61-akzessorischen Proteine der beiden Wege miteinander in Verbindung zu stehen (Klappa et al., 1991, Muller et al., 2010, Lakkaraju et al., 2012, Haßdenteufel et al., 2014, Haßdenteufel et al., 2018).

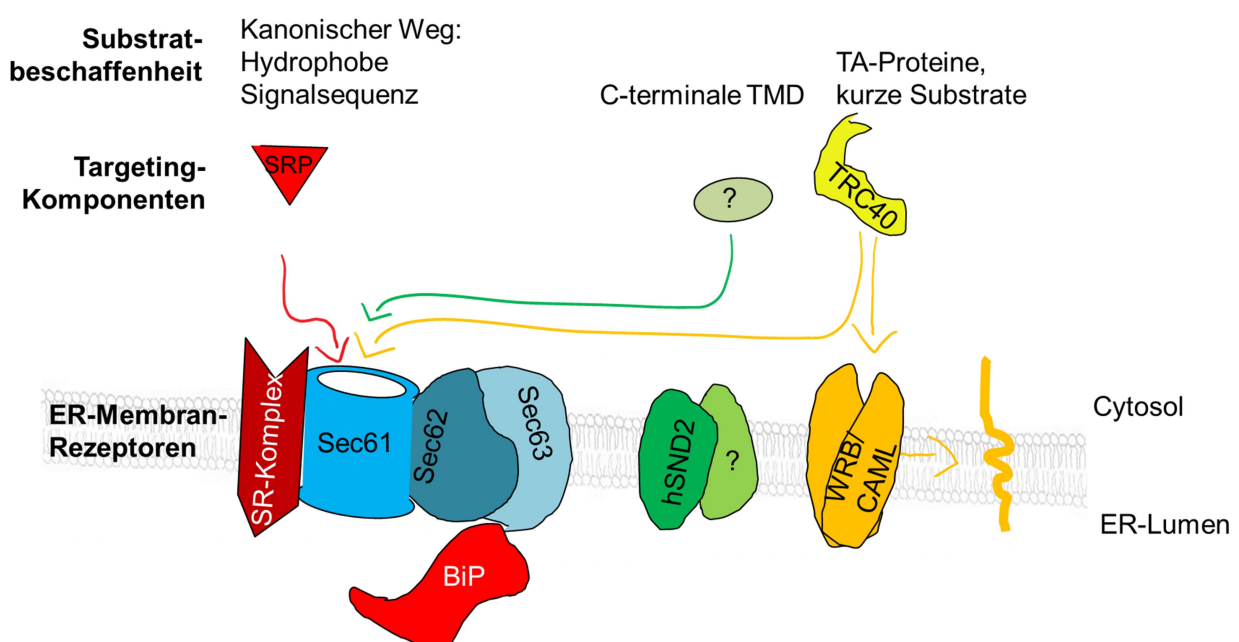


Abbildung 2.4: Targeting von Polypeptid-Vorläufern zur ER-Membran. Neben dem kanonischen, SRP-abhängigen Weg (rot, s. Abbildung 2.3), existieren SRP-unabhängige Targetingwege zur ER-Membran für Substrate mit folgenden Merkmalen: kurze Substrate, die einer SRP-Bindung entgehen, schwach hydrophobe Substrate, Substrate mit C-terminaler TMD oder TA-Proteine. TA-Proteine benutzen zum Targeting TRC40 und als Rezeptor/Integration in die Membran den WRB/CAML-Komplex. Doch auch kurze sekretorische Vorläuferproteine benutzen TRC40 zum Targeting. Ein neuer Rezeptor in Säugerzellen ist hSND2, dessen Targetingpartner noch nicht identifiziert sind. (TA = engl. „tail-anchor“-Proteine, TMD = Transmembrandomäne)

2.2.4. Sec61-Channelopathies

Der komplexe Mechanismus des Sec61-vermittelten Proteintransports ist von einer Reihe von Proteinen und ihrem orchestrierten Zusammenspiel (s. Kapitel 2.2) abhängig, weshalb es nicht verwunderlich ist, dass Defekte innerhalb dieses Transportsystems sich in Krankheiten manifestieren (Zimmermann, 2016). In den letzten Jahren wurden mehrere dieser Sec61-

assoziierten Krankheiten identifiziert und unter dem Begriff „Sec61-Channelopathies“ zusammengefasst (Haßdenteufel et al., 2014, Schorr et al., 2015, Lang et al., 2017). So wurde ein Diabetes-ähnlicher Phänotyp in Mäusen mit einer homozygoten Sec61-Mutation entdeckt, die auch zu Hepatosteatose führt (Lloyd et al., 2010). Bei der Mutation handelt es sich um den Austausch von Tyrosin an der Stelle 344 zu Histidin (Y344H), die einen beeinträchtigten, substratabhängigen Proteintranslokationsdefekt verursacht, sowie die Ca^{2+} -Homöostase stört. Letzteres erfolgt vermutlich wegen einer gestörten Bindung des Regulationsfaktors BiP an die 7. Schleife von Sec61 α , was zu einem vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom führt und als ursächlich für die Apoptose der β -Zellen angenommen wird (Schäuble et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Mutation in der α -Untereinheit von Sec61 untersucht, nämlich die heterozygote V85D-Mutation. Sie wurde in Patienten mit chronischer Immundefizienz beschrieben, deren pathologischer Phänotyp sich als Plasmazelldefizienz herausstellte. Die Rolle, die diese Mutation, insbesondere auf die Ca^{2+} -Homöostase der Plasmazellen hat, wird in Kapitel 4.1 diskutiert.

Weiterhin wurden heterozygote Mutationen in Sec61 α beschrieben, die mit tubulointerstitieller Nierenerkrankung mit Anämie in Menschen assoziiert sind. Diese befinden sich einmal in der „Plug“-Domäne (V67G) und in der 5. Transmembranhelix (T185V) nahe des Poren rings von Sec61 α (Bolar et al., 2016).

Auch die γ -Untereinheit von Sec61 ist krankheitsassoziiert, da das Gen in 77 % des Glioblastoma multiforme, einer häufig vorkommenden Tumorart des Gehirns, amplifiziert vorkommt (Lu et al., 2009). Auch andere Translokon-assoziierte Gene sind in ähnlicher Weise mit verschiedenen Tumoren assoziiert. Dies gilt für Sec62, das in Prostata- und Lungentumoren überexprimiert ist (Jung et al., 2006, Linxweiler et al., 2012, Linxweiler et al., 2013), sowie für Sec63, das besonders in Tumoren mit defizienter „DNA-Mismatch“-Reparatur gehäuft Mutationen aufweist (Mori et al., 2002, Eschrich et al., 2005, Schulmann et al., 2005). Weiterhin gibt es autosomal-dominante „loss-of-function“-Mutationen, die beide Allele von *SEC63* betreffen und zur polyzystischen Lebererkrankung führen (Davila et al., 2004, Drenth et al., 2005, Fedeles et al., 2011). Auch eine heterozygote Mutation in Sec61 β kann die Ursache einer solchen Erkrankung sein (Besse et al., 2017).

Auch für die homozygote Defizienz von ERj6 (DNAJC3) existiert ein klinischer Phänotyp, der bei betroffenen Patienten zu Diabetes mellitus und Neurodegeneration führt (Synofzik et al., 2014). ERj6-Knockout-Mäuse zeigten ebenfalls einen pankreatischen β -Zellverlust, sowie einen Diabetes-ähnlichen Phänotyp (Ladiges et al., 2005). Mechanistisch kann dies von denselben molekularen Ursachen hervorgerufen werden, die auch im Falle der Diabetes-

assoziierten Sec61 α (Y344H)-Mutation eine Rolle spielen, nämlich einem verstärkten Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER, der zur Apoptose von sekretorischen Zellen führt (Schorr et al., 2015). Darüber hinaus sind mehrere Translokon-assoziierte Proteine mit kongenitaler Glykosylierungsstörung (engl. „congenital disorder of glycosylation“, CDG) Typ I assoziiert. Hierbei sind zum einen mehrere OST-Untereinheiten (OST48, Tusc3, Stt3a, Stt3b), sowie verschiedene TRAP-Untereinheiten (SSR3, SSR4) betroffen, wodurch es zur Beeinträchtigung der N-Glykosylierung und Faltung neu synthetisierter Polypeptide kommt (Mohorko et al., 2011, Losfeld et al., 2014, Pfeffer et al., 2017). Weiterhin wurden in Patienten mit dem neurodegenerativen Marinesco-Sjörgren-Syndrom, was eine autosomal rezessive zerebrale Ataxie beschreibt, neun verschiedene Mutationen in dem Nukleotidaustauschfaktor Sill1 entdeckt (Senderek et al., 2005).

Mit Hilfe von „Gene-Trap“-Experimenten in Mäusen fand man heraus, dass das ER-luminale Hsp40-Chaperon ERj4 eine Rolle in der B-Zellentwicklung spielt und für die normale Antikörperproduktion von Bedeutung ist (Fritz und Weaver, 2014).

Ferner ist das Hsp70-Chaperon BiP das molekulare Ziel des AB-Toxins Subtilase. Dieses wird von Shiga-toxigenen *E.coli*-Stämmen gebildet. Die spezifische Inaktivierung von BiP führt zum hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) (Paton et al., 2006). Die B-Untereinheit des Toxins bindet an Toxinrezeptoren der Plasmamembran, während die A-Untereinheit die Serin-Protease-Aktivität vermittelt. Das Toxin wird retrograd ins ER transportiert, wo BiP proteolytisch gespalten wird (Paton et al., 2006). Wie in Kapitel 2.2.2.1 erörtert, ist BiP ein Protein mit einer Vielzahl von Funktionen, deren Ausfall betroffene Zellen nicht tolerieren können (Haßdenteufel et al., 2014).

2.3. Die zelluläre Ca²⁺-Homöostase

2.3.1. Ca²⁺ als „second messenger“

Ca²⁺ übernimmt eine zentrale Rolle innerhalb der Zelle. Es arbeitet als „second messenger“ und übernimmt als solches Funktionen in einer Vielzahl von Prozessen, wie Proliferation, Entwicklung, Befruchtung, Kontraktion, Sekretion und Zelltod (Berridge et al., 2000). Die zelluläre Voraussetzung, die geschaffen wurde damit Ca²⁺ als Signalmolekül dienen kann, war die Bildung von intrazellulären Ca²⁺-Speichern mit hohen Konzentrationen und die im Cytosol vorherrschende niedrige Ca²⁺-Konzentration. Dass sich diese Sequestrierung von Ca²⁺ aus dem Cytosol evolutionär so ereignete, liegt an der per se zytotoxischen Eigenschaft von Ca²⁺. In hohen Konzentrationen führt Ca²⁺ zur Aggregation von Proteinen und

Nukleinsäuren, beeinträchtigt die Integrität von Lipidmembranen und führt zur Präzipitation von Phosphaten (Jaiswal, 2001, Case et al., 2007, Plattner und Verkhratsky, 2013). Die extrazelluläre Umgebung besitzt mit ca. 1 mM eine sehr hohe Konzentration an Ca^{2+} (Kaufman und Malhotra, 2014). Den intrazellulären Hauptspeicher für Ca^{2+} stellt, wie bereits erwähnt, das ER dar, aber auch die Mitochondrien und der Golgi-Apparat besitzen die Fähigkeit Ca^{2+} zu akkumulieren (Carafoli, 2004). Die freie Ca^{2+} -Konzentration zwischen dem ER und dem Cytosol weist dabei im Ruhezustand einen 1000-2000-fachen Gradienten auf (Carafoli, 2004, Clapham, 2007) und beträgt im Cytosol ungefähr 100-200 nM (Carafoli, 2004) und im ER 200-500 μM (Barrero et al., 1997, Mogami et al., 1998, Alonso et al., 1999, Demaurex, 2005, Petersen, 2005, Solovyova und Verkhratsky, 2010). Der größte Teil des Ca^{2+} im ER wird an Proteine gebunden, so dass die Gesamtmenge an Ca^{2+} ~ 2 mM beträgt und das freie Ca^{2+} noch um ein Vielfaches übersteigt (Meldolesi und Pozzan, 1998b, Meldolesi und Pozzan, 1998a, Sienaert et al., 1998, Kiviluoto et al., 2013). Die bedeutendsten ER-residenten Chaperone, die Ca^{2+} binden, sind Calreticulin, Calnexin, BiP, Grp94 und PDI (Kaufman und Malhotra, 2014). Diese Chaperone zeichnen sich generell durch eine Ca^{2+} -Bindung mit hoher Kapazität und niedriger Affinität aus (Van et al., 1989, Lebeche et al., 1994, Baksh et al., 1998, Meldolesi und Pozzan, 1998b, Meldolesi und Pozzan, 1998a). Dabei bindet Calreticulin durch 25 Bindestellen mit niedriger Affinität den größten Anteil an lumenalem Ca^{2+} (Baksh et al., 1998, Kiviluoto et al., 2013) und übernimmt neben der Funktion als Ca^{2+} -Speicher auch Aufgaben im Ca^{2+} -Transport, in der Substratinteraktion, der Proteinfaltung und der Interaktion mit anderen Chaperonen (Baksh et al., 1995, Corbett et al., 1999, Michalak et al., 2002). Weiterhin ist Calreticulin zusammen mit dem integralen Membranprotein Calnexin und ERp57 entscheidend an der ER-Qualitätskontrolle und dem sekretorischen Weg beteiligt (Frenkel et al., 2004, Bedard et al., 2005). Innerhalb des Calnexin/Calreticulin-Zyklus erhalten Proteine ihre Glykosylierung und durchlaufen ihn bis sie entweder ihre native Struktur annehmen oder im Fall einer Fehlfaltung degradiert werden (Zapun et al., 1999, High et al., 2000, Yoshida et al., 2002). Das Chaperon BiP ist für die Bindung von ca. 25 % des ER-luminalen Ca^{2+} verantwortlich und besitzt eine niedrige Kapazität und Affinität für Ca^{2+} (Lievremont et al., 1997). Auch Grp94 ist ein bedeutendes Ca^{2+} -bindendes Chaperon und besitzt 4 Bindestellen mit hoher und 11 Bindestellen mit niedriger Affinität für Ca^{2+} (Van et al., 1989, Kiviluoto et al., 2013). Ca^{2+} -bindende Proteine sind auch im Cytosol lokalisiert. Die bekanntesten cytosolischen Ca^{2+} -Puffersysteme sind die Parvalbumine, die Calbindine und Calretinine (Schwaller, 2009, Filadi und Pozzan, 2015). Doch auch das Ca^{2+} -Sensorprotein CaM dient als Ca^{2+} -Puffer und wird in allen Zellen im

mikromolaren Bereich exprimiert (Chin und Means, 2000). Darüber hinaus tragen auch die negativ geladenen Phospholipide der Membranen zur Ca^{2+} -Pufferkapazität bei, auch wenn ihre Affinität für Ca^{2+} vergleichsweise gering ist (Filadi und Pozzan, 2015).

Proteine, deren Aufgabe es ist Ca^{2+} zu binden, werden in Abhängigkeit ihrer Schleifen-Architektur der Ca^{2+} -Bindestelle in drei Klassen unterteilt. Diese sind EF-Hand-Proteine, Annexine und C2-Domänenproteine (Bagur und Hajnoczky, 2017). EF-Hand-Domänen sind die am häufigsten vorkommenden Ca^{2+} -Bindemotive innerhalb von Proteinen. Sie besitzen eine Helix-Loop-Helix-Struktur und sind hoch konserviert (Kawasaki et al., 1998). Die Aufgaben von EF-Hand-Proteinen sind divers und reichen vom Ca^{2+} -Puffern im Cytosol, über die Signaltransduktion zwischen verschiedenen Kompartimenten bis hin zur Genexpression im Nukleus (Bagur und Hajnoczky, 2017). Die funktionelle Diversität kommt dabei durch die Konformationsänderung durch die Ca^{2+} -Bindung zustande, die sich bei Ca^{2+} -Sensorproteinen und Ca^{2+} -puffernden Proteinen unterscheidet. Im Falle von Ca^{2+} -Sensorproteinen wie CaM führt die Bindung von Ca^{2+} zu einem Öffnen der Struktur, wodurch die Interaktion mit Zielproteinen möglich wird (Zhang et al., 1995). Ca^{2+} -puffernde Proteine hingegen bleiben nach der Bindung von Ca^{2+} in einer geschlossenen Konformation (Skelton et al., 1994). CaM kann nicht nur in Ca^{2+} -gebundener Form mit Zielproteinen interagieren, sondern auch in seiner Ca^{2+} -freien Form (Apo-CaM). Deshalb gibt es nicht nur die Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung, die eine Interaktion mit Zielproteinen vermittelt, sondern auch sogenannte IQ-Motive, die Ca^{2+} -unabhängige Bindestellen für CaM und andere EF-Hand-Proteine darstellen (Cheney und Mooseker, 1992). Annexine und C2-Domänenproteine besitzen eine einzigartige Struktur ihrer Ca^{2+} -Bindestellen, wodurch sie in ihrer Ca^{2+} -gebundenen Form an negativ geladene Membranoberflächen binden können (Bagur und Hajnoczky, 2017). Ein Beispiel hierfür ist das Ca^{2+} -abhängige Binden der Proteinkinase C (PKC) an Phospholipide sowie ihre Regulierung bei der die C2-Domäne intramolekular sowohl mit der Kinasedomäne als auch mit dem C-terminalen Ende interagiert, wodurch die PKC in einer inaktiven Konformation gehalten wird (Farah und Sossin, 2012).

2.3.2. Die Architektur der Ca^{2+} -Homöostase: Ca^{2+} -Pumpen, -Austauscher und -Kanäle

Nicht nur die Ca^{2+} -bindenden Proteine, die im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden tragen zur Erhaltung der Ca^{2+} -Homöostase bei, sondern auch Ca^{2+} -Pumpen und Austauscher (siehe Abbildung 2.5). So sorgt die P-Typ ATPase PMCA (engl. „Plasma Membrane ATPase“), die in der Plasmamembran (PM) lokalisiert ist, dafür, dass Ca^{2+} gegen seinen

Gradienten aus dem Cytosol in den extrazellulären Raum gepumpt wird (Di Leva et al., 2008). Dabei wird unter Verbrauch eines ATP-Moleküls ein Ca^{2+} -Ion gegen ein H^+ -Ion ausgetauscht, wobei die Affinität für Ca^{2+} hoch ist (Niggli et al., 1982a, Niggli et al., 1982b, Hao et al., 1994, Carafoli, 2004). Ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert ist der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX), der den elektrochemischen Gradienten ausnutzt, um ein Ca^{2+} -Ion gegen drei Na^+ -Ionen auszutauschen (Liao et al., 2012). Die Affinität des NCX für Ca^{2+} ist zwar gering, jedoch übersteigt NCX in seiner Konzentration, besonders in erregbaren Geweben wie dem Herzen die Anzahl der PMCAs um ein Vielfaches (Carafoli, 2004, Brini und Carafoli, 2011). Deshalb übernimmt die PMCA in diesen Geweben die Regulation geringer Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Brini und Carafoli, 2011).

Auch in der ER-Membran ist eine P-Typ ATPase lokalisiert, die maßgeblich an der Erhaltung des intrazellulären Ca^{2+} -Gradienten beteiligt ist und als SERCA (eng. „Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase“) bezeichnet wird. Es existieren drei Isoformen von SERCA mit mehreren Spleißvarianten (Vandecaetsbeek et al., 2011, Kaufman und Malhotra, 2014), wobei die SERCA-Isoform 2b ubiquitär im ER verbreitet ist und die höchste Ca^{2+} -Affinität besitzt (Lytton und MacLennan, 1988, Kawasaki et al., 1998). Im SR von Muskelzellen ist die SERCA-Isoform 1 bei schnellen Muskelfasern und die Isoform 2a speziell in Geweben des Herzen für die Muskelrelaxation verantwortlich (Brandl et al., 1987, Carafoli, 2002, Clapham, 2007, Tadini-Buoninsegni et al., 2018). Die Hydrolyse von einem ATP veranlasst die SERCA zwei Ca^{2+} -Ionen für zwei H^+ -Ionen aus dem Cytosol in das ER zu pumpen. Dabei wird die Aktivität der SERCA durch erhöhtes cytosolisches Ca^{2+} verstärkt (Lewis et al., 2012, Inesi und Tadini-Buoninsegni, 2014, Kaufman und Malhotra, 2014). Zu den endogenen Regulatoren auf cytosolischer Seite von SERCA2, gehören Bcl-2 („Apoptosis regulator Bcl-2“) (Kuo et al., 1998, Dremina et al., 2004, Vangheluwe et al., 2005), IRS1 (engl. „insulin receptor substrate 1“) und IRS2 (Algenstaedt et al., 1997, Borge und Wolf, 2003), S100A1 (Kiewitz et al., 2003) und die Acylphosphatase (Nediani et al., 2002). Die am besten untersuchten SERCA-Regulatoren sind Phospholamban (PLN) und Sarcolipin (SLN) (Odermatt et al., 1998, MacLennan und Kranias, 2003, Primeau et al., 2018). Außerdem spielen für SERCA2b die Ca^{2+} -bindenden Proteine Calreticulin, Calnexin und ERp57 eine Rolle in der Regulation der SERCA-Aktivität (John et al., 1998, Roderick et al., 2000, Li und Camacho, 2004, Kaufman und Malhotra, 2014). Auch für TMX1 (engl. „Thioredoxin Related Transmembrane Protein 1“) und SEPNI wurde eine Interaktion mit und eine regulatorische Rolle für SERCA2b beschrieben (Marino et al., 2015, Raturi et al., 2016). Letzteres trifft auch auf GPX8 (engl. „Probable glutathione peroxidase 8“) zu (Yoboue et al., 2017). Weiterhin

zeigen neue Untersuchungen auch die Beteiligung von microRNAs und posttranslationalen Modifikationen als neue Regulatoren (Stammers et al., 2015, Zhao et al., 2017). Beispielsweise aktiviert die ER Disulfid-Reduktase ERj5 die SERCA-Pumpaktivität durch Reduktion einer luminalen Disulfidbindung (Ushioda et al., 2016). Besonders in Hinblick auf die Assoziation von SERCA-Funktionsstörungen mit zahlreichen Erkrankungen wie Herzversagen, Diabetes und Krebs spielen pharmakologische SERCA-Modulatoren eine wichtige Rolle (Brini und Carafoli, 2009, Tadini-Buoninsegni et al., 2018). Als biochemische Werkzeuge zur Analyse des intrazellulären Ca^{2+} haben sich spezifische SERCA-Inhibitoren wie Cyclopiazonsäure (CPA) (Seidler et al., 1989) und 2,5-di(tert-butyl)hydrochinon (DBHQ) (Moore et al., 1987), aber vor allem das Sesquiterpen-Lakton Thapsigargin (Tg) herausgestellt, das SERCA irreversibel inhibiert (Rasmussen et al., 1978, Thastrup, 1990, Bian et al., 1991). Zur pharmakologischen Bekämpfung von Krebs spielt neuerdings die Entwicklung von Tg-basierten Wirkstoffen eine wichtige Rolle, vor allem, wenn der Wirkstoff in die Tumoren zielgesteuert werden kann (Denmeade und Isaacs, 2012, Andersen et al., 2015, Doan et al., 2015, Korbel et al., 2018).

Aufgrund des großen mitochondrialen Membranpotentials, kann Ca^{2+} über den Ca^{2+} -Uniporter des Mitochondriums (MCU) in das Mitochondrium eintreten, wo Ca^{2+} ein wichtiges Aktivierungssignal zur ATP-Produktion, aber auch bei übermäßiger Akkumulation das Öffnen der mPTP (engl. „mitochondrial permeability transition pore“) zur Folge hat (Csordas et al., 2012) (siehe Kapitel 2.3.5.1). Deshalb existiert auch in der inneren Mitochondrienmembran ein Ca^{2+} -Austauscher, der NCLX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ exchanger), der einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ und einen $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austausch vermittelt und eine niedrige Affinität für Ca^{2+} besitzt (Palty et al., 2004, Palty et al., 2010). Alle diese Pumpen und Austauscher, insbesondere SERCA, helfen im Cytosol eine konstant niedrige Ca^{2+} -Konzentration aufrecht zu erhalten, die dem Ca^{2+} -Efflux aus dem ER entgegenwirkt (Kaufman und Malhotra, 2014).

In den späten 1980er Jahren verdichteten sich die Hinweise darauf, dass es einen gekoppelten Mechanismus zur Ermittlung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes und dem Wiederauffüllen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher über die PM geben muss, dem sogenannten „Store operated calcium entry“ (SOCE) (Putney, 1986, Putney, 1990). Dieser Einstrom wird als CRAC (engl. „Calcium Release-activated Calcium Current“) bezeichnet (Penner et al., 1988, Matthews et al., 1989). Als molekulare Komponenten, die den CRAC vermitteln, dienen zum Ca^{2+} -Sensing in der ER-Membran die STIM- (engl. „stromal interaction molecule“) Proteine. Sie besitzen eine EF-Hand tragende ER-luminale Domäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale, cytosolische Domäne (Liou et al., 2005, Roos et al., 2005, Hogan, 2015). Es

existieren zwei Isoformen von STIM, STIM1 und STIM2, die unterschiedliche Affinitäten für Ca^{2+} aufweisen (Williams et al., 2001, Brandman et al., 2007, Soboloff et al., 2012). Als Folge einer ER- Ca^{2+} -Speicherentleerung oligomerisieren mehrere STIM-Proteine und sie reorganisieren sich zu sog. „punctae“ in der Nähe der PM (Barr et al., 2008, Cahalan, 2009). Als Folge interagieren sie mit dem CRAC-Kanal der PM und stimulieren ihn (Liou et al., 2005, Muik et al., 2008, Muik et al., 2011). Letzterer besteht aus ORAI (engl. „calcium release-activated calcium modulator 1“-)Proteinen, die monomere Kanaluntereinheiten der CRAC-Kanäle darstellen und von denen es drei Isoformen gibt, Orai1-3 (Bogeski et al., 2010, Gudlur et al., 2014, Derler et al., 2016). Physiologisch besitzt der SOCE große Bedeutung beispielsweise in der Immunantwort, durch die Regulation der metabolischen Voraussetzung der klonalen Expansion von T-Zellen (Feske, 2009, Bogeski et al., 2010, Gudlur et al., 2014, Derler et al., 2016, Vaeth et al., 2017).

2.3.3. Reguliertes Ca^{2+} -„Signaling“

Ca^{2+} kann die Zelle entlang des elektrochemischen Gradienten betreten, wie es bei spannungsgesteuerten Kanälen (Cav1-3) (Minor und Findeisen, 2010), Liganden-gesteuerten Kanälen (z.B. NMDA-Rezeptor) (Hardingham und Bading, 2010), transienten Rezeptor-Potential Kanälen (TRPC) (Ong et al., 2014) oder Speicher-gesteuerten Kanälen (ORAI) (Prakriya et al., 2006, Feske, 2009) der Fall ist. Die andere Alternative ist die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch die Vermittlung von sog. „second messenger“. Beispiele hierfür sind cADPR (zyklische ADP-Ribose), NAADP (Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat) und IP3 (Inositoltrisphosphat) (Berridge et al., 2003). IP3 wird nach Aktivierung des Oberflächenrezeptors, durch Stimulierung der Phospholipase C gebildet und setzt nach der Bindung an den N-Terminus seines Rezeptors der ER-Membran (IP3R) Ca^{2+} aus dem ER frei (Streb et al., 1983, Furuichi et al., 1989, Maeda et al., 1990). Konkret kommt es zur Kanalöffnung am C-Terminus des IP3R (Bosanac et al., 2004). Weiterhin können cytosolische Faktoren wie regulatorische Proteine und Phosphorylierung/Dephosphorylierung oder auch Ca^{2+} selbst die Kanalöffnung des IP3R beeinflussen, wodurch hoch spezifische räumliche und zeitliche Ca^{2+} -Signale generiert werden (Foskett und Mak, 2004, Mikoshiba, 2007, Vanderheyden et al., 2009). IP3Rs werden in allen Zelltypen exprimiert und in Vertebraten liegen drei Isoformen mit 60-80 % Homologie ihrer Aminosäuresequenz vor (Ivanova et al., 2014).

RyR (engl. „ryanodine receptor“-)Rezeptoren sind eine weitere Klasse von Ca^{2+} -Kanälen, die Ca^{2+} aus dem ER durch die Aktion von cADPR entlassen, das aus NAD durch die Cyclase

CD38 generiert wird (Galione et al., 1991, Krebs et al., 2015). Funktionell und strukturell ähneln sich die IP3R und RyR, wie Cryo-EM Strukturen zeigen konnten (Efremov et al., 2015, Fan et al., 2015, Yan et al., 2015, Zalk et al., 2015). Es existieren drei Isoformen der RyRs, wobei RyR1 und RyR2 im SR von Skelettmuskel- und Herzmuskel-Myozyten im hohen Maße exprimiert werden. Auch in anderen Zelltypen werden RyRs exprimiert, wobei ihre Expressionsrate der von IP3R weit unterlegen ist. Nichtsdestotrotz tragen RyR beträchtlich zum Ca^{2+} -Signal bei, da sie verglichen mit den IP3R, bei jedem Öffnen ca. die 20-fache Menge an Ca^{2+} entlassen (Bezprozvanny, 1996). Wie die IP3R, werden auch RyRs durch Ca^{2+} bifunktional moduliert: eine niedrige Konzentration an Ca^{2+} führt zur Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle, wohingegen eine hohe Ca^{2+} -Konzentration eine Inhibition nach sich zieht (Raffaello et al., 2016). Neben dem kontrolliertem Ca^{2+} -„signaling“, das sich die Zelle zu Nutze macht, um eine Vielzahl von externen Stimuli zu integrieren, existiert auch ein passiver Ca^{2+} -Efflux entlang des intrazellulären Konzentrationsgradienten (Berridge et al., 2000). Letzterer wird im folgenden Kapitel näher ausgeführt.

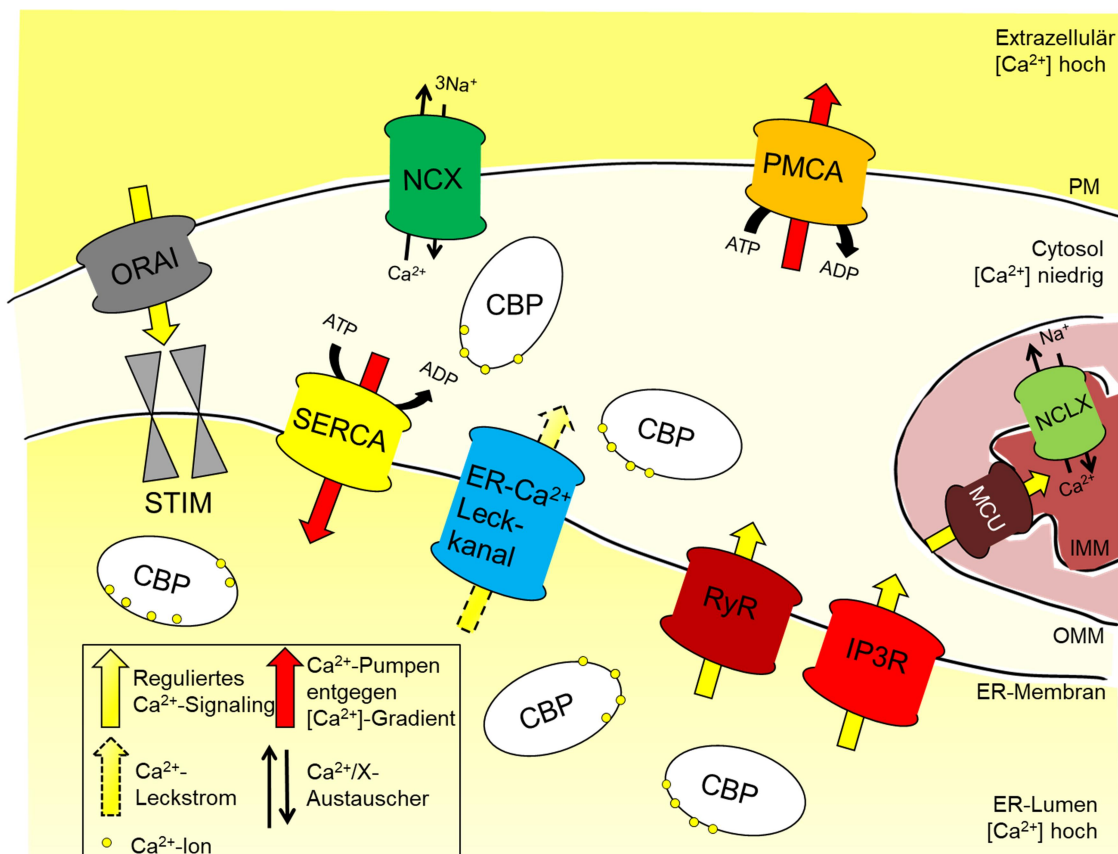


Abbildung 2.5: Übersicht der zellulären Ca^{2+} -Homöostase. Die Ca^{2+} -Verteilung innerhalb der Zelle weist mit einem ca. 1000-fachen Konzentrationsgradienten zwischen ER-Lumen als Haupt- Ca^{2+} -Speicher und dem Cytosol große Unterschiede auf. Dies ermöglicht ein komplexes intrazelluläres Ca^{2+} -„signaling“, das die Erhaltung der Ca^{2+} -Homöostase innerhalb der Zelle voraussetzt. Kontrolliertes und Effektor-verursachtes „signaling“ erfolgt über RyR, IP3R, ORAI oder den MCU im

Mitochondrium. Daneben existiert auch ein passiver Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER in das Cytosol (siehe Kapitel 2.3.4). Um die Ca^{2+} -Homöostase nach den verschiedenen Ca^{2+} -Freisetzungen wiederherzustellen, existieren eine Reihe von Ca^{2+} -Pumpen (PMCA, SERCA), Austauscher (NC(L)X), sowie Ca^{2+} -bindende Proteine (CBP). (PM = Plasmamembran; IMM = innere Mitochondrienmembran; OMM = äußere Mitochondrienmembran)

2.3.4. Ca^{2+} -Leckkanäle der ER-Membran

Das Phänomen des Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER wird bereits seit langem untersucht, wobei die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Phänomens an oberster Stelle steht. Der Ca^{2+} -Leckstrom zeigt keine Abhängigkeit von IP₃- oder RyR-Rezeptoren, wie Versuche mit Rutheniumrot und Heparin zeigten (Hofer et al., 1996, Camello et al., 2002). Im Folgenden sind verschiedene Kandidaten der Ca^{2+} -Leckkanäle beschrieben.

Im Jahr 2000 wurde in mehreren Studien gezeigt, dass Zellen, die das anti-apoptotische Protein Bcl-2 überexprimierten, einen vermehrten Ca^{2+} -Leckstrom aufweisen (Foyouzi-Youssefi et al., 2000, Pinton et al., 2000). Da die Depletion von Bcl-2 den gegenteiligen Effekt auf den Ca^{2+} -Leckstrom hatte und zu einer Erniedrigung führte, wurde Bcl-2 als Kandidat für einen Ca^{2+} -Leckkanal gehandelt (Palmer et al., 2004). Allerdings wird Bcl-2 auch in Hinblick auf eine ausschließlich regulatorische Funktion auf Ca^{2+} -regulierende Proteine diskutiert, was auch eine Erklärung für seine Beteiligung an der Ca^{2+} -Homöostase liefert (Bassik et al., 2004, Chami et al., 2004).

Ebenfalls durch Überexpressionsversuche wurde eine Ca^{2+} -Leckfunktion von TRPC1 im SR des Skelettmuskels beschrieben, wo vormals RyR und TRPV1 als passive Ca^{2+} -Leckkanäle beschrieben wurden (Lehnart et al., 2006, Berbey et al., 2009). Für TRPC1 gibt es jedoch für das endogen immunogefärbte Protein wenig Hinweise auf eine Lokalisation im SR, was seine Eigenschaft als Ca^{2+} -Leckkanal der ER-Membran in Frage zieht (Gervasio et al., 2008, Stüber et al., 2008).

Pannexin1 (Panx1) ist hauptsächlich dafür bekannt Hemikanäle und Gap Junctions in der PM zu bilden (Bruzzone et al., 2003, Ishikawa et al., 2011). Darüber hinaus führte die Überexpression von Panx1 in LNCaP-Zellen sowohl zu einer Lokalisierung in der Plasmamembran, als auch im ER und verursachte dort einen bedeutenden Rückgang der Ca^{2+} -Konzentration, die aus dem ER freigesetzt werden konnte (Vanden Abeele et al., 2007). Diese Beobachtung veranlasste die Hypothese, dass Panx1 einen ER- Ca^{2+} -Leckkanal darstellt. Vor dem pathologischen Hintergrund des Prostatakrebs könnte dies für die Induktion der Apoptose interessant sein, da in Abhängigkeit der Panx1-Level das ER der Zellen empfänglicher oder unempfindlicher für einen IP₃-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom wird, der

wiederum Auswirkungen auf den mitochondrialen Ca^{2+} -Gehalt und die Induktion der Apoptose haben kann (D'Hondt et al., 2011).

Weiterhin zeigten Untersuchungen, dass das Protein BI-1 (Bax inhibitor-1, auch TMBIM6) einen Einfluss auf den passiven Leckstrom des ERs besitzt (Kim et al., 2008, Xu et al., 2008). BI-1 interagiert mit Bcl-2 und Bcl-xL (engl. „Bcl-2-like protein 1“) in der ER-Membran und kann die ER-Homöostase downstream von Bcl-xL beeinflussen (Xu et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass BI-1 in rekonstituierten Proteoliposomen pH-abhängig die Permeabilität für Ca^{2+} erhöht (Kim et al., 2008). Darüber hinaus konnte ein C-terminales Peptid von BI-1 identifiziert werden, das ursächlich für den Ca^{2+} -Leckstrom war und als möglicher Ca^{2+} -Kanal der ER-Membran diskutiert wird (Bultynck et al., 2012).

Auch das Holoprotein von Presenilin gilt als möglicher Ca^{2+} -Leckkanal der ER-Membran, was, vor allem in Hinblick auf die Bedeutung der Ca^{2+} -Homöostase für die FAD (engl. „Familiar Alzheimer Disease“) interessant ist. Es gibt Hinweise darauf, dass FAD-assoziierte Mutationen von Presenilin seine Ca^{2+} -Leck-Funktion beeinträchtigen. So kann es zu einer vermehrten Ca^{2+} -Auffüllung des ERs und somit zu einem vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom nach Agonist-Stimulation kommen, was eine mögliche Erklärung für die Pathogenese der Presenilin-Mutationen liefert (Tu et al., 2006, Nelson et al., 2007, Nelson et al., 2010, Zhang et al., 2010, Nelson et al., 2011). Diese Ca^{2+} -Leckkanal-Funktion für Presenilin wird jedoch kontrovers diskutiert, da es einen stimulatorischen Effekt von Presenilin auf den IP3R gibt und man von großen Expressionsunterschieden verschiedener Gewebe ausgehen kann (Lee et al., 1996, Cheung et al., 2008, Shilling et al., 2012). Zudem gibt es Hinweise, dass Presenilin als Teil des γ -Sekretase-Komplexes in der PM lokalisiert ist (Chyung et al., 2005), wo letzterer für die proteolytische Prozessierung des „beta-amyloid-precursor proteins“ (APP) verantwortlich ist (Kimberly et al., 2003a, Kimberly et al., 2003b, Chyung et al., 2005).

Auch CALHM1 (engl. „Calcium homeostasis modulator 1“) ist ein möglicher Ca^{2+} -Leckkanal der ER-Membran. Das Protein steigert den Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER und setzt die Aktivität der gegensätzlich arbeitenden Ca^{2+} -Pumpen herab, was eine entscheidende Rolle in der UPR-Induktion spielt (Gallego-Sandin et al., 2011). Jedoch ist CALHM1 hauptsächlich in den Zellen des Nervensystems lokalisiert, wo es die Ca^{2+} -Homöostase und den Amyloid-beta-Level beeinflusst (Dreses-Werringloer et al., 2008).

Ein weiterer Kandidat, der zum Ca^{2+} -Leckstrom über die ER-Membran beitragen könnte, ist die SERCA-Isoform S1T (Chami et al., 2001, Chami et al., 2008). Sie ist hauptsächlich in den sogenannten MAMs lokalisiert und wird als Folge von ER-Stress induziert (Chami et al., 2008). Der Effekt von SERCA und der C-terminal trunkierten Isoform S1T ist in Hinblick auf

den ER-Ca²⁺-Pool genau entgegengesetzt. S1T in den MAMs kann somit ein ER-Ca²⁺-Signal an die Mitochondrien weiterreichen, wodurch eine Ca²⁺-vermittelte Sensitivierung des mitochondrialen apoptotischen Weges erfolgt (Chami et al., 2008).

2.3.4.1. Sec61 als Ca²⁺-Leckkanal

Im Rahmen dieser Arbeit ruht ein besonderes Augenmerk auf dem Sec61-Komplex als ubiquitären Ca²⁺-Leckkanal des ERs aller kernhaltigen Zellen. Polypeptide, die zum Import in das ER vorgesehen sind, gelangen mit Hilfe des Sec61-Komplexes und Sec61 α als porenbildender Untereinheit in das ER-Lumen (siehe Kapitel 2.2.1). Auf die Rolle von Sec61 in der Proteintranslokation wird in Kapitel 2.2.3 näher eingegangen. Festgehalten werden soll an dieser Stelle, dass Sec61 den Durchgang kleiner Moleküle erlaubt (Heritage und Wonderlin, 2001, Roy und Wonderlin, 2003, Wirth et al., 2003, Saparov et al., 2007). Dass Sec61 α auch permeabel für Ca²⁺-Ionen ist, zeigen unter anderem elektrophysiologische Untersuchungen in planaren Lipidbilayern, für die eine Leitfähigkeit für Ca²⁺ von 65 ± 10 pS und eine Sub-Leitfähigkeit von 733 ± 16 pS bestimmt wurde (Lang et al., 2011a). Der Durchmesser der Pore wurde in der geschlossenen Struktur von *M. jannaschii* mit 5-8 Å angegeben (Van den Berg et al., 2004), wohingegen Fluoreszenz-Quenching-Versuche des humanen Sec61 sowie elektrophysiologische Experimente einen Porendurchmesser von 26-60 Å vermuten lassen (Hamman et al., 1997, Wirth et al., 2003). Versuche mit dem Antibiotikum Puromycin wurden durchgeführt, um das naszierende Polypeptid aus dem Kanal zu entfernen und somit die ribosomale Translation zu inhibieren. Diese Behandlung hatte einen verstärkten Ca²⁺-Efflux aus dem ER zur Folge, der nicht auf IP3- oder Ryanodin-Rezeptoren rückgeführt werden konnte, was ein deutlicher Hinweis für den Ca²⁺-Leckstrom aus dem Translokon ist (Lomax et al., 2002, Van Coppenolle et al., 2004). Auch elektrophysiologische Untersuchungen belegen die Aktivierung von ionenpermeablen Poren in pankreatischen RMs nach Puromycin-Applikation (Simon et al., 1989, Simon und Blobel, 1991, Wirth et al., 2003, Lu et al., 2009, Wonderlin, 2009). Interessant ist die Tatsache, dass das prokaryotische SecYEG in elektrophysiologischen Messungen keine Kanalaktivität aufweist (Saparov et al., 2007), was auf eine besondere Abhängigkeit der Prokaryoten vom Kanalverschluss hindeutet (Park und Rapoport, 2011). Die Verbindung vom Translokon-vermittelten passiven Ca²⁺-Leckstrom und der Aktivierung des SOCE (siehe Kapitel 2.3.2) konnte mit ER-Speicher-entleerenden Stimuli nachgewiesen werden (Flourakis et al., 2006, Ong et al., 2007). Ca²⁺-Imaging-Versuche zeigen, dass bei einer siRNA-vermittelten Sec61 α -Depletion in HeLa-Zellen der Tg-induzierte Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER zu 60 % Sec61 α zuzuschreiben ist (Lang et al., 2011a). Die Durchlässigkeit für Ca²⁺-Ionen ist dabei am Ende

des Translokationsvorgangs am größten (Simon et al., 1989, Wirth et al., 2003, Erdmann et al., 2011, Lang et al., 2011a).

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass der Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER individuell in jedem Zelltyp die Beteiligung mehrerer, möglicherweise oben beschriebener Ca^{2+} -Leckkanäle in unterschiedlicher Beteiligung miteinschließt (Lang et al., 2011a, Lang et al., 2011b).

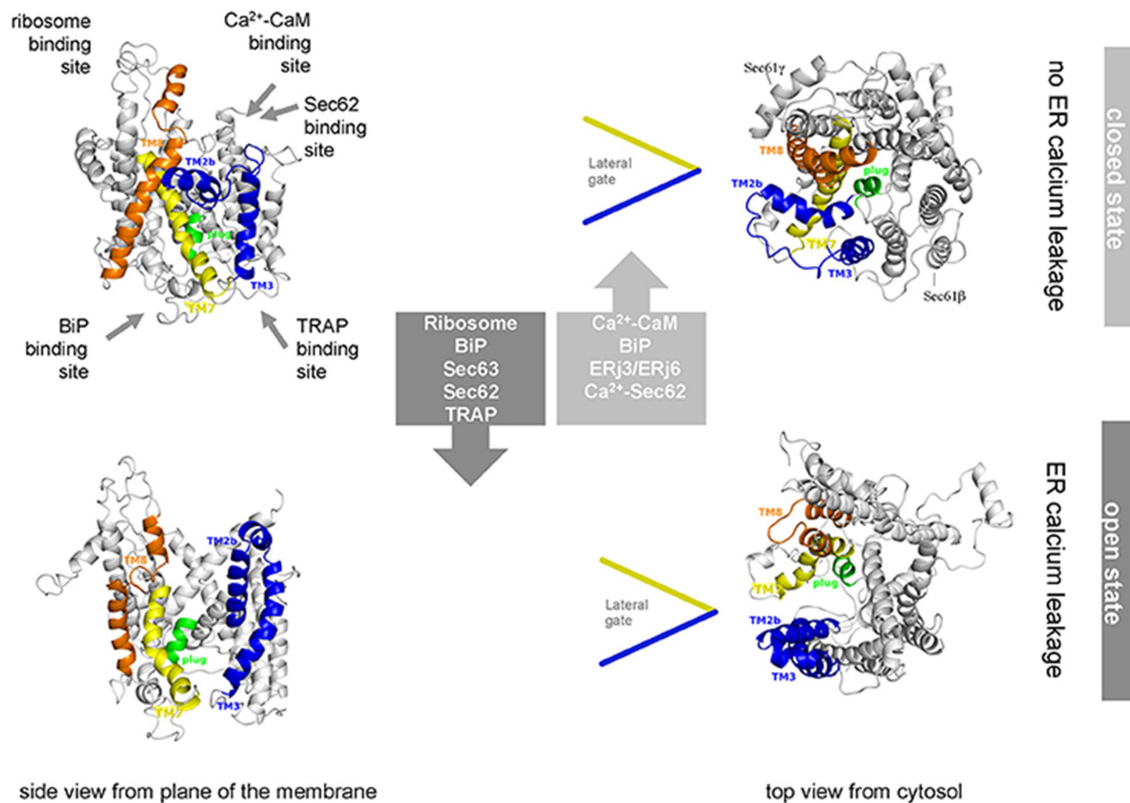
2.3.4.1.1. Die Regulation des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms

2011 wurden elektrophysiologische Untersuchungen in Vesikeln mit rekonstituierten Sec61-Komplexen nach Puromycingabe zur Freisetzung der Ribosomen durchgeführt. Es konnten Einzelkanalmessungen aufgezeichnet werden, die sich durch die Anwesenheit von Ca^{2+} und CaM verschlossen (Erdmann et al., 2011). Außerdem gelang es die Verbindung zwischen dem Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER und Sec61 α auf zellulärer Ebene nachzuweisen, da in HeLa-Zellen die siRNA-vermittelte Depletion von Sec61 α zu einem deutlichen Rückgang des Ca^{2+} -Leckstroms führte (Erdmann et al., 2011, Lang et al., 2011a, Lang et al., 2011b). Ebenfalls auf zellulärer Ebene konnte die Rolle von CaM als Sec61 α -verschließende Komponente nachvollzogen werden (Erdmann et al., 2011).

Als weiterer wichtiger, regulativer Faktor des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms wurde BiP identifiziert (Hamman et al., 1998, Wirth et al., 2003, Schäuble et al., 2012). Zunächst zeigten *in vitro* Quenching-Experimente, dass das ER-lumenale BiP unmittelbar nach dem Ribosomentargeting am lumenalen Ende von Sec61 bindet (Hamman et al., 1998). Dieselbe Studie zeigte außerdem, dass BiP auch mit Ribosomen-freien Translokons am lumenalen Ende des Translokons assoziiert ist und dass BiP nur im Nukleotid-gebundenen Zustand zum lumenalen Gating des Translokons in der Lage ist (Hamman et al., 1998). Auch elektrophysiologische Experimente zeigten einen Sec61-Kanalverschluss durch BiP in Anwesenheit von ATP (Wirth et al., 2003). Die zellulären Versuche zur Überprüfung dieser Erkenntnisse, involvierten die siRNA-vermittelte Depletion von BiP und Ca^{2+} -Imaging Experimente (Schäuble et al., 2012, Hammadi et al., 2013). Letztere zeigten einen gesteigerten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER nach BiP-Depletion, was auch durch Ca^{2+} -Messungen der ER-lumenalen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet wurde und für ein beeinträchtigt Verschließen des Sec61-Kanals spricht (Schäuble et al., 2012). Auch mit ER-Stress-induzierenden Agenzien, die BiP mobilisieren und ins Lumen rekrutieren, ließ sich dieser Phänotyp kopieren (Schauble et al., 2012). Versuche mit gleichzeitiger Sec61 α -, sowie BiP-Depletion verifizierten die Spezifität der BiP-Regulation (Schauble et al., 2012). Die Bindestelle von BiP an Sec61 α wurde mit Hilfe von Peptidspots der lumenalen 7. Schleife des Sec61 α -Proteins nahe des Tyrosinrests an der Stelle 344 identifiziert (Schauble et al., 2012).

Dass BiP für ein effektives Verschließen von Sec61 auf Co-Chaperone angewiesen ist, ließen Versuche mit BiP-Mutanten vermuten, die nicht mehr in der Lage sind mit Hsp40-Co-Chaperonen zu interagieren (Alder et al., 2005, Awad et al., 2008). Um diese Beobachtung auf die BiP-Funktion des Sec61 α -Verschlusses gegen den Verlust an Ca²⁺ zu überprüfen, wurden Ca²⁺-Imaging-Versuche nach Depletion der membraninsetierten, sowie luminalen Hsp40-Co-Chaperone durchgeführt. Es zeigten sich spezifische Defekte in der Ca²⁺-Verschlussregulation für die beiden luminalen Chaperone ERj3 (DnaJB11) und ERj6 (p58^{IPK}; DnaJC3), sodass sich ERj3 und ERj6 als die Co-Chaperone für BiP in der Ca²⁺-Regulation herausgestellt haben (Schorr et al., 2015).

Auch weitere Komponenten des Sec61-Komplexes (siehe Kapitel 2.2.2) sind an der Ca²⁺-Leckregulation von Sec61 α beteiligt. So konnten Ca²⁺-Imaging-Versuche nach Sec62-Depletion einen vermehrten Ca²⁺-Ausstrom nach Tg-Applikation demaskieren, der der Wirkung von CaM-Antagonisten ähnelte (Erdmann et al., 2011, Greiner et al., 2011, Linxweiler et al., 2013). Erklärungsversuche involvierten die EF-Hand am cytosolischen C-Terminus von Sec62, die zum Aufspüren eines Ca²⁺-Leckstroms in direkter Nähe zum Translokon genutzt werden könnte. Eine Konformationsänderung durch die Ca²⁺-Bindung könnte zur Dissoziation von Sec62 und Sec61 führen, wodurch eine Bindestelle an Sec61 α für Ca²⁺-CaM geschaffen wird, was den Ca²⁺-Leckstrom abdichtet (Linxweiler et al., 2013). Dafür sprechen Versuche, in denen eine Sec62-Variante mit mutierter EF-Hand zu Expression gebracht wurde und diese im Gegensatz zum Wildtyp-Sec62 nicht in der Lage war den Ca²⁺-Phänotyp der Sec62-Depletion zu retten (Linxweiler et al., 2013). Interessant ist die Sec62-assoziierte Regulation der Ca²⁺-Homöostase vor allem vor dem Hintergrund, dass viele Tumoren durch eine Sec62-Überexpression gekennzeichnet sind (Jung et al., 2006, Greiner et al., 2011). Darüber hinaus spielt die Ca²⁺-Homöostase eine bedeutende Rolle in der Migration von Tumorzellen, wodurch die beiden Phänomene verbunden sind und mögliche Ansatzpunkte zu therapeutischen Strategien liefern (Linxweiler et al., 2013). Auch das Protein TRAP scheint an der Ca²⁺-Homöostase beteiligt zu sein, da es nach siRNA-vermittelter Depletion in HeLa-Zellen Veränderungen im Tg-freigesetzten Pool an ER-Ca²⁺ aufwies. Die Zellen besaßen weniger Ca²⁺, wodurch TRAP eine mögliche Rolle im Öffnen des Sec61-Kanals zukommen könnte (Nguyen et al., 2018). Die Abbildung 2.6 fasst die an der Regulation des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Leckstroms beteiligte Proteine zusammen.



side view from plane of the membrane

top view from cytosol

Abbildung 2.6: Die Regulation des Sec61 Ca^{2+} -Leckkanals. Das dargestellte strukturelle Modell des geschlossenen humanen Sec61-Komplexes basiert auf der Cryo-EM-Struktur des caninen Sec61 α (Protein Data Bank (PDB) code: 4cg7), die sich auf Daten der Kristallstruktur des Archäen-SecY stützt (PDB code: 1rhz). Gezeigt sind zum einen die Bindestellen der allosterischen Interaktionspartner, im speziellen das Ribosom, Ca^{2+} -CaM, Sec62, TRAP und BiP. Die jeweils unten abgebildeten geöffneten Strukturen von Sec61 α basieren auf der Cryo-EM-Struktur von SECY aus *E. coli* (PDB code: 3j46). Die farblich hervorgehobenen Helices stellen das laterale Gate, sowie die Plug-Domäne dar. In Bezug auf die Regulation des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms sind Ca^{2+} -CaM und Ca^{2+} -Sec62 auf cytosolischer Seite der ER-Membran wichtige Faktoren, die dem Ca^{2+} -Ausstrom entgegenwirken. Auf lumenaler Seite sind vor allem das Hsp70-Chaperon BiP und die Hsp40-Co-Chaperone ERj3 und ERj6 für die Kontrolle des Leckstroms verantwortlich. Die komplexe, dynamische Regulation des Sec61-Komplexes in Bezug auf das Öffnen und Verschließen wird dadurch deutlich, dass es Proteine gibt, die neben ihrer Ca^{2+} -Leckstromregulation in Hinblick auf den Transport von Polypeptiden Sec61 α von dem geschlossenen in den geöffneten Zustand überführen können (Sec62 und BiP). Auch Sec63, TRAP sowie das Ribosom tragen zum Öffnen des Sec61-Komplexes bei, um Polypeptiden den Eintritt ins ER zu erlauben (verändert nach Dudek et al., 2015, mit Erlaubnis von Elsevier via Copyright Clearance Center).

2.3.5. Integrative Aspekte der Ca^{2+} - Homöostase

Aufgrund der Bedeutsamkeit von Ca^{2+} als intrazellulärer „second messenger“ ist eine Vielzahl von intrazellulären Funktionen direkt oder indirekt abhängig von der Erhaltung der Ca^{2+} -Homöostase, in der das ER die zentrale Schaltstelle ist. Im folgenden Kapitel wird auf einige dieser Funktionen eingegangen, die für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Aspekte eine Rolle spielen und in den Zusammenhang gestellt werden sollen.

2.3.5.1. MAMs als intrazelluläre Kommunikationsorganellen

Physische Kontakte zwischen ER und Mitochondrien wurden bereits vor fast 60 Jahren beobachtet (Copeland und Dalton, 1959) und sind seitdem Gegenstand intensiver Untersuchungen. Die Nähe dieser Kontakte bzw. der Abstand von äußerer Mitochondrienmembran und der Membran des ER wird neuesten Untersuchungen zu Folge auf 10 nm im Falle von Mitochondrien mit dem glatten ER und auf 50 nm bei der Interaktion mit dem ribosomenbesetzten rauen ER geschätzt (Csordas et al., 2006, Wang et al., 2015, Giacomello und Pellegrini, 2016). Die Verbindung zwischen den beiden Organellen werden durch sogenannte „Spacer“ und „Linker“ gehalten, von denen die Mitofusine MFN1 und MFN2 am besten charakterisiert sind, es aber eine ganze Reihe möglicher Kandidaten gibt (de Brito und Scorrano, 2008, Csordas et al., 2018). Die Kontaktflächen von Mitochondrien und ER werden auch MAMs genannt (engl. "mitochondria-associated ER membrane") und in zwei Proteom-Analysen wurden einmal 991 (Zhang et al., 2011) und einmal 1212 (Poston et al., 2013) Proteine gefunden, die nach Aufreinigung der MAMs angereichert waren, wobei die Schnittmenge aus den beiden Proteinpools nur 44 % betrug. Der biologische Nutzen der Kontakte zwischen Mitochondrien und dem ER besteht in einem regulierten, bidirektionalem Austausch verschiedener zellbiologischer Komponenten (Rowland und Voeltz, 2012). Die verschiedenen zellulären Funktionen, die diese Kontakte benötigen, sind Folgende: ER-Stress, Apoptose, Autophagie, Lipidhomöostase, Ca^{2+} -Transfer, mitochondriale Dynamik, Entzündungsreaktionen, sowie die Immunantwort (Filadi et al., 2017b). Dabei wurde als erste Funktion, die auf die Näherungen der beiden Organellen beruht, die Erhaltung der Lipidsynthese entdeckt (Rusinol et al., 1994, Vance, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit soll nur auf einen kleinen Teil der bedeutenden Funktionen der MAMs eingegangen werden, nämlich auf den Ca^{2+} -Transfer, der Auswirkungen auf die mitochondriale Bioenergetik, sowie die Apoptose besitzt. In den 1990er Jahren wurde erstmals gezeigt, dass es einem lokalen Ca^{2+} -Transfer aus dem ER ins Mitochondrium gibt (Rizzuto et al., 1992, Csordas et al., 1999). Neuere Untersuchungen setzten letzteren mit den ER-Mitochondrien-Kontaktstellen in Zusammenhang. Die Proteine, die das Ca^{2+} -„signaling“ zwischen ER und Mitochondrium vermitteln, sind, auf Seite der ER-Membran, die schnell öffnenden IP3R oder RyR-Rezeptoren, die nach Aktivierung durch einen Agonist Ca^{2+} aus dem ER entlassen. Daraufhin bildet sich eine lokale Ca^{2+} -Mikrodomäne in Nähe des Mitochondriums, in der die Ca^{2+} -Konzentration $> 10 \mu\text{M}$ sein kann (Giacomello et al., 2007). Auf mitochondrialer Seite passiert Ca^{2+} zunächst die äußere Mitochondrienmembran (engl. „outer mitochondrial membrane“, OMM), wo VDACs (engl. „voltage-dependent anion channels“) die Passage für

kleinere Moleküle < 5 kDa zum größten Teil vermitteln, wobei VDAC1 und IP3R über das Chaperon Grp75 physisch miteinander interagieren (Szabadkai et al., 2006) (siehe Abbildung 2.7). Die größte Hürde, die es zu überwinden gilt, ist der Transfer des Ca^{2+} über die innere Mitochondrienmembran (engl. „inner mitochondrial membrane“, IMM), wo der MCU-Komplex angesiedelt ist, der eine geringe Affinität für Ca^{2+} besitzt (ca. 15-20 μM) (Carafoli, 2003, Baughman et al., 2011, De Stefani et al., 2012). Um trotz der geringen Ca^{2+} -Affinität des MCU ein „signaling“ in die mitochondriale Matrix zu erlauben, ist ein geringer Abstand zwischen den IP3R der ER-Membran und der OMM notwendig (10-20 nm), der die Bildung der Ca^{2+} -Mikrodomänen möglich macht (Csordas et al., 2010, Giacomello et al., 2010). In der mitochondrialen Matrix angekommen, kann Ca^{2+} eine bivalente Funktion ausüben. Einerseits wird unter physiologischen Bedingungen ein konstitutiver IP3R-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom benötigt, um die bioenergetische Funktion und letztendlich ATP-Produktion durch die Ca^{2+} -abhängigen Dehydrogenasen (Pyruvatdehydrogenase, α -Ketoglutaratdehydrogenase und Isocitratdehydrogenase) und Metaboliten-Carrier sicherzustellen (Denton et al., 1972, McCormack und Denton, 1990, Cardenas et al., 2010, Bonora et al., 2012, Marchi et al., 2017). Andererseits führt eine Ca^{2+} -Überladung zu einer verringerten ATP-Produktion und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. „reactive oxygen species“, ROS), die eine Aktivierung der mitochondrialen Permeabilität-Transitions-pore (mPTP) auslösen. Durch das Öffnen der mPTP werden proapoptotische Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum (engl. „inner membrane space“, IMS) in das Cytosol entlassen, was schließlich die Apoptose induziert (Baumgartner et al., 2009, Bonora et al., 2015, Morciano et al., 2015).

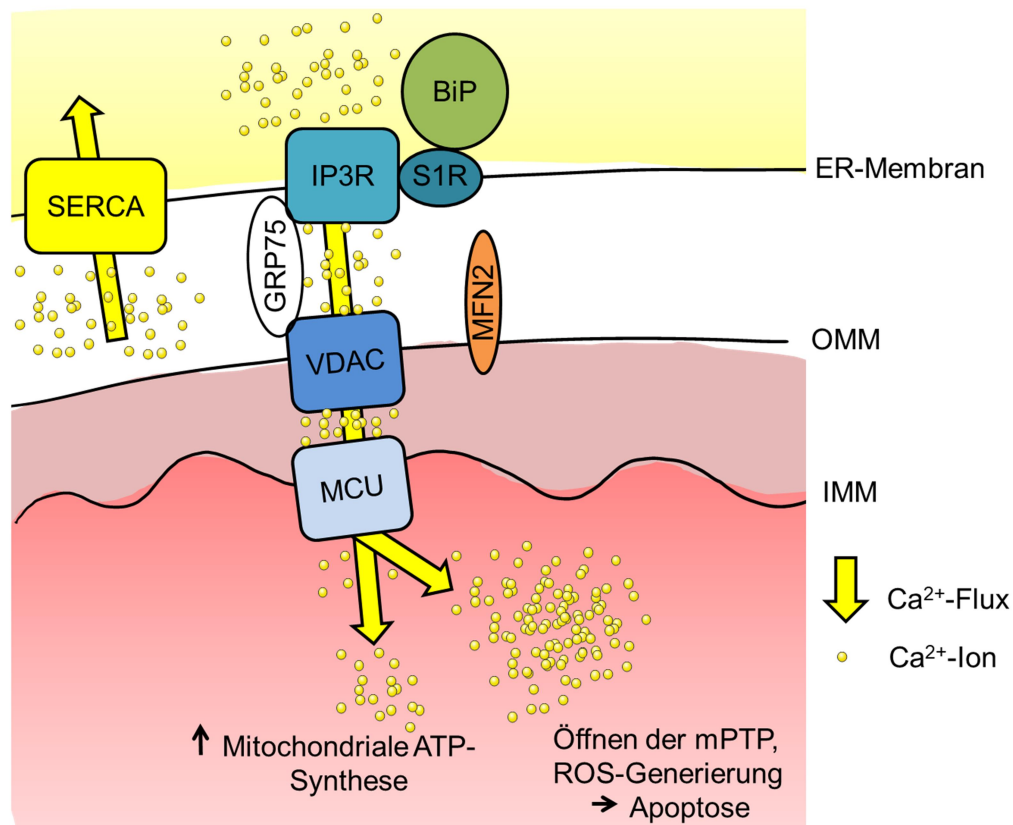


Abbildung 2.7: Organisation der MAMs. Zwischen der ER-Membran und dem Mitochondrium stellen die sogenannten MAMs wichtige Organisationszentren dar, die die Signalweiterleitung durch Ca^{2+} als „second messenger“ möglich machen. Auf Seite des ER sind besonders IP3R beteiligt. Sie stehen in physischem Kontakt mit den VDAC in der OMM über das Chaperon Grp75. Der eigentliche Ca^{2+} -Uniporter des Mitochondriums (MCU) ist in der IMM lokalisiert und zeichnet sich durch eine geringe Affinität für Ca^{2+} aus, weshalb die räumliche Nähe zwischen den beiden Organellen, die durch Mitofusine wie MFN2 verankert werden. Ein typischer MAM-Marker ist der Sigma-1-Rezeptor (S1R), der einen Ca^{2+} -sensitiven Komplex mit BiP eingeht und so das Ca^{2+} -„signaling“ zwischen ER und Mitochondrium verlängert. Auch SERCA ist in den MAMs lokalisiert. Unter physiologischen Bedingungen führt eine Ca^{2+} -Akkumulation im Mitochondrium zur Stimulation des oxidativen Metabolismus, da eine Reihe von Dehydrogenasen und Metabolit-Carrier Ca^{2+} sensitiv sind. Kommt es allerdings zu einem Überladen des Mitochondriums mit Ca^{2+} , setzen apoptotische Stimuli ein, entweder durch das Öffnen der mPTP und Ausschüttung von CytC oder durch ROS-Generierung. (OMM = äußere Mitochondrienmembran; IMM = innere Mitochondrienmembran; mPTP = mitochondriale Permeabilität-Transitions-pore)

2.3.5.2. Die Signalkaskaden der UPR

Unter homöostatischen Bedingungen herrscht innerhalb des ER ein Milieu, unter dem Enzyme, deren Funktion die Faltung und Sekretion von Proteinen ist, optimal arbeiten können. Hierzu gehört unter anderem eine hohe Konzentration an freiem Ca^{2+} , da Ca^{2+} ein wichtiger Cofaktor für die Aktivität einiger Faltungsproteine ist (Carreras-Sureda et al., 2018). Gerät die Homöostase aus dem Gleichgewicht, etwa durch ein Abfallen der Ca^{2+} -Konzentration, veränderte physiologische Ansprüche der Zelle oder der Expression mutierter Proteine, spiegelt sich das in einem Zustand wider, der sich ER-Stress nennt (Hetz et al.,

2015, Wang und Kaufman, 2016). Er ist gekennzeichnet durch das Auslösen der sogenannten UPR. Ziel des UPR-Signalwegs ist es die Transkription von Genen zu aktivieren, die Foldasen, Chaperone und ERAD-Komponenten bereitstellen, sowie die globale Translation zu attenuieren bzw. auch die Zelle in die Lage zu versetzen auf nicht aufzulösenden ER-Stress mit der Induktion der Apoptose zu reagieren (Fribley et al., 2009, Urrea et al., 2013, Krebs et al., 2015). Mit den Sensorproteinen der UPR und den folgenden Stressantworten besitzt die Zelle mehrere Möglichkeiten die Homöostase wiederherzustellen. Dies geschieht durch die selektive Expression von Genen, die für Proteine kodieren, die die Last der ungefalteten Proteine im ER abschwächen (Walter und Ron, 2011), was über drei verschiedene Wege erfolgen kann (siehe Abbildung 2.8). Ein Weg läuft über das Sensorprotein PERK (engl. „Proteinkinase RNA (PKR)-like ER Kinase“) und stellt einen schnellen Adaptionsmechanismus dar, der auf das Überleben der Zelle abzielt (Urrea et al., 2013). Kommt es in Folge eines vermehrten Faltungsbedürfnis innerhalb des ER, dissoziiert das Hsp70-Chaperon BiP von PERK, das ein ER-Membranprotein ist. Die Folge ist eine Homomultimerisierung von PERK, sowie eine Autophosphorylierung (Ron und Walter 2007). PERK phosphoryliert daraufhin die α -Untereinheit von eIF2 (engl. „eukaryotic translation initiation factor 2“), was zu einem globalen Translationsinitiationsstop führt und die ER-Proteinladung mindert (Harding et al., 2000, Scheuner et al., 2001). Hält der ER-Stress an, kann sich das „signaling“ von PERK in Richtung Apoptose verlagern. In dem Fall kommt es durch phosphoryliertes eIF2 α zur selektiven Expression von ATF4, einem Transkriptionsfaktor, der im weiteren Verlauf zur Expression von CHOP (C/EBP homologes Protein) führt (Harding et al., 2000). CHOP inhibiert die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 oder führt durch Induktion von ERO1 α zu einem oxidativen Stressmilieu im ER, was in beiden Fällen über die Schaltstelle CHOP Apoptose auslösen kann (McCullough et al., 2001, Marciniak et al., 2004, Tabas und Ron, 2011). Eine weitere beschriebene Möglichkeit wie es nach PERK-Aktivierung zum Zelltod kommen kann, führt über die Expression des DR5 (engl. „death receptor 5“), der einen Caspase-8 induzierten Zelltod nach sich zieht (Lu et al., 2014).

Neben PERK gibt es noch zwei weitere UPR-Sensorproteine, deren Aktivierung mit der Dissoziation von BiP beginnt. Eines davon ist ATF6 (engl. „activating transcription factor 6“), das nach der BiP-Dissoziation in den Golgi-Apparat transloziert und dort von site-1 und site-2 Proteasen in seine aktive Form geschnitten wird, die aus dem N-terminalen cytosolischen Fragment ATF6f besteht (Haze et al., 1999). Dieses aktive ATF6f wandert in den Nukleus und induziert Gene mit einem „ER stress response element“ (ERSE) im

Promotor (Schroder und Kaufman, 2005b, Schroder und Kaufman, 2005a, Szegezdi et al., 2006). Typische ATF6f-Zielgene sind BiP, GRP94 und PDI, sowie ERAD-Komponenten (Tabas und Ron, 2011, Urra et al., 2013). Neben den beiden bislang vorgestellten Wegen, die evolutionär erst ab den Metazoenzellen existieren, gibt es noch den konserviertesten der drei UPR-Wege und der einzige, der in niederen Eukaryoten vorhanden ist, nämlich IRE1 (engl. „inositol-requiring protein-1“) (Mori, 2009). IRE1 kommt in Säugetierzellen in zwei Isoformen vor, wobei die Isoform α ubiquitär exprimiert wird und die Isoform β auf Zellen des Gastrointestinal- und Atmungstraktes beschränkt ist (Tabas und Ron, 2011). Analog zu den beiden anderen Wegen führt die Aktivierung von IRE1 α über die Dissoziation von BiP, wodurch es zur Transautophosphorylierung, Nukleotidbindung und Oligomerisierung von IRE1 α kommt (Ron und Hubbard, 2008). Diese Ereignisse setzen die cytosolische Effektorfunktion von IRE1 α frei, die in der hoch spezifischen Endoribonukleasespaltung und Spleißen der mRNA des Transkriptionsfaktors des XBP-1 (engl. „X-box binding protein 1“) besteht. Im Gegensatz zur ungespleißten Form von XBP-1 führt das Spleißen dazu, dass XBP-1 als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von UPR-induzierter Gene aktiviert (Ron und Walter, 2007). Neben dem Spleißen von XBP-1 führt die Endonukleaseaktivität von IRE1 α auch zu einem Abbau lokaler mRNAs, ein Prozess, der als RIDD (engl. „regulated IRE1 α dependent decay“) bezeichnet wird (Hollien et al., 2009). IRE1 α übernimmt eine wichtige Adaptionsaufgabe während des ER-Stress mit dem Ziel diesen wieder aufzulösen. Allerdings führt anhaltendes IRE1 α -, wie auch PERK-, „signaling“ zur Induktion der Apoptose. In diesem Fall interagiert das phosphorylierte IRE1 α mit dem Adapterprotein TRAF2 (engl. „tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2“), wodurch eine Phosphorylierungskaskade ausgelöst wird, an deren Ende ASK1/JNK (engl. „Apoptosis signal-regulating kinase 1/ c-Jun N-terminal kinase“) steht (Xia et al., 1995, Urano et al., 2000, Ventura et al., 2006, Nishitoh, 2012). Eine Phosphorylierung durch JNK spielt eine Rolle für die Aktivierung des pro-apoptischen Proteins Bim (engl. „Bcl-2-like protein 11“) der Bcl-2-Familie, sowie die Inhibierung des anti-apoptischen Bcl-2-Proteins (Shore et al., 2011). Weiterhin kann IRE1 α im Komplex mit TRAF2/JKK das NF κ B-, „signaling“ auslösen, an dessen Ende ebenfalls der Zelltod steht (Hu et al., 2006).

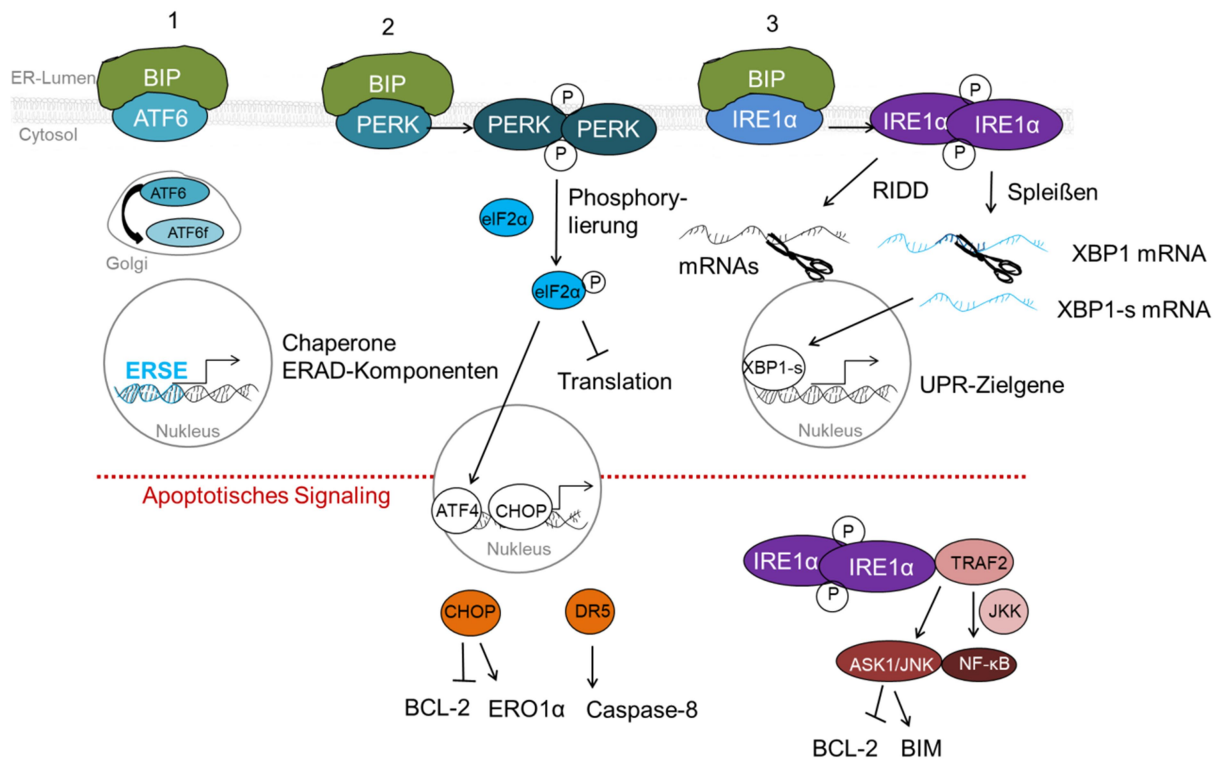


Abbildung 2.8: Die drei Signalkaskaden der UPR und apoptotisches „signaling“. Alle drei UPR-Wege werden durch Dissoziation des ER-luminalen Hsp70-Chaperon BiP aktiviert. ATF6 transloziert daraufhin in den Golgi-Apparat, wo es durch Proteasen in den Transkriptionsfaktor ATF6f prozessiert wird, welcher in den Nucleus transloziert und dort Gene mit einem ERSE (engl. „ER-Stress response element“) in der Promotorregion anschaltet (1). Der zweite Weg der UPR führt über das Protein PERK und ist ein schneller Mechanismus, der auf das zelluläre Überleben nach ER-Stress abzielt (2). PERK homomultimerisiert und es kommt zur Autophosphorylierung, sowie zur Phosphorylierung von eIF2 α . Letzteres führt zum globalen Translationsstopp, der die Proteinlast des ER mindert. Dennoch kann anhaltender ER-Stress zum Umschalten auf ein apoptotisches „signaling“ führen: in dem Fall kommt es zur selektiven Expression des Transkriptionsfaktors ATF4, der die Transkription von CHOP initiiert. Downstream von CHOP führen verschiedene Wege zur Induktion der Apoptose, wie die Inhibition von Bcl-2 oder die Aktivierung von ERO1 α . Beim dritten UPR-Weg ist das „signaling“-Protein IRE1 α (3). Auch hierbei kommt es zur Oligomerisierung und Transautophosphorylierung sowie Nukleotidbindung. IRE1 α spleißt daraufhin spezifisch die XBP1 mRNA, die in ihrer gespleißten Form als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von UPR-Zielgenen aktiviert. Weiterhin kommt es auch zum Abbau von mRNAs über den sog. RIDD-Mechanismus. Kann der ER-Stress nicht aufgelöst werden, kommt es auch hier zum apoptotischen „signaling“, entweder im Komplex mit TRAF2 oder im Komplex mit TRAF2 und JKK. Beide Wege enden mit der Inhibition von anti-apoptotischen und Aktivierung von apoptotischen Proteinen, was zur Apoptoseinduktion führt.

2.3.5.2.1. Schnittstellen der UPR und der Ca²⁺-Homöostase

Wie bereits in Kapitel 2.3.5.1 erwähnt, stellen die MAMs zwischen ER-Membran und Mitochondrien entscheidende Kontaktstellen dar, die auch großen Einfluss auf die Zellphysiologie haben. Während der frühen Phase des ER-Stress nehmen die ER-Mitochondrien-Kontakte zu, was einerseits dem Sicherstellen des Ca²⁺-Transfers aus dem ER in die Mitochondrien dient, um die ATP-Produktion konstant aufrecht zu erhalten (Brown, 1992, Balaban, 2009). Gleichzeitig führen jedoch anhaltende, exzessive Ca²⁺-Signale zu einem Umschalten in Richtung pro-apoptotisches „signaling“, was ein gutes Beispiel für die

diffizile Regulation des Stresssignalings darstellt (Chami et al., 2008, Hayashi et al., 2009, Bravo et al., 2011). In diesem Abschnitt soll auf die Proteine eingegangen werden, die eine Rolle in UPR und Apoptose spielen und sensitiv auf Ca^{2+} -Signale reagieren. Einen besonderen Stellenwert nehmen dabei die Proteine der Bcl-2-Familie ein, die downstream der oben beschriebenen PERK- und IRE1-Signalwege stehen. Vertreter dieser Proteinfamilie sind im Cytosol, dem ER und den Mitochondrien lokalisiert und deshalb in der Lage die Apoptose an verschiedenen Punkten und Stufen zu kontrollieren (Chipuk et al., 2010, Rodriguez et al., 2011, Giorgi et al., 2012). Gemein haben alle Subgruppen der Bcl-2-Familie, dass ihre Vertreter die IP3R-Aktivität regulieren, was der bedeutendste Ca^{2+} -Regulator für das mitochondriale Ca^{2+} -„signaling“ sein dürfte (Eckenrode et al., 2010, Shore et al., 2011). Besonders die anti-apoptotischen Vertreter Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W und Mcl-1 interagieren physisch mit IP3R, was zu einem verminderten ER- Ca^{2+} -Gehalt führt, sowie die Rate der IP3-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung erhöht, was das Überleben der Zelle unterstützt (Pinton et al., 2000, White et al., 2005, Eckenrode et al., 2010). Darüber hinaus führt ein weiterer Mechanismus der anti-apoptotischen Vertreter über eine konformationelle Inhibition der pro-apoptotischen Vertreter Bak und Bax (Tait und Green, 2010). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung von Ca^{2+} innerhalb der UPR und Apoptose-Regulation ist die Gruppe der anti-apoptotischen TMBIM, auch Bax-Inhibitor-1 (BI-1)-Familie genannt, die wahrscheinlich durch die Modulation der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER gegen ER-Stress wirkt und somit eine Rolle in der ER- Ca^{2+} -abhängigen Apoptosekontrolle spielt (Chae et al., 2004, Rojas-Rivera et al., 2012, Rojas-Rivera und Hetz, 2015, Lisak et al., 2016) (siehe auch Kapitel 2.3.4). Chami et al. charakterisierten weiterhin eine trunkierte SERCA-Isoform, S1T, die Zelltod auslösen kann, indem CHOP aktiviert wird und es zu einem Ca^{2+} -Transfer aus dem ER ins Mitochondrium kommt, was die Zellen über den mitochondrialen apoptotischen Weg tötet (Chami et al., 2008). Dies alles sind Beispiele dafür, wie sehr ER-Stress, UPR und Apoptose mit Ca^{2+} als signalübertragendes Signal in das Mitochondrium in Verbindung stehen.

2.4. Die intrazelluläre ATP-Homöostase

Wie in den vorausgehenden Kapiteln beschrieben, ist das ER zentraler Dreh- und Angelpunkt nicht nur für die Ca^{2+} -Homöostase (Kapitel 2.3), sondern auch für die Proteinreifung, sowie -qualitätskontrolle, UPR und Apoptose (Kapitel 2.3.5.2). Die beteiligten Komponenten sind häufig Proteine, wie das Hsp70-Chaperon BiP, die für die Ausübung ihrer Funktionen Energie in Form vom ATP benötigen (Gething und Sambrook, 1990, Braakman et al., 1992, Dorner und Kaufman, 1994, Csala et al., 2007). In diesem Kapitel wird auf die ATP-Homöostase

eingegangen, insbesondere deren Schnittstellen zum ER, da es eine enge Verbindung zwischen ER- Ca^{2+} -Ausstrom, MAMs und mitochondrialer ATP-Produktion bzw. Apoptose gibt (siehe Kapitel 2.3.5.1 und 2.3.5.2.1).

2.4.1. Die zelluläre ATP-Produktion

Die Zelle benötigt zur Aufrechterhaltung aller lebensentscheidenden Funktionen wie Wachstum, Teilung, Stoffwechsel, etc. Energie. Umgesetzt wird das Energiebedürfnis mit Hilfe des universalen, chemischen Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP), der aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat Pi (HPO_4^{2-}) gebildet und dazu benutzt wird, energetisch unvorteilhafte Prozesse ablaufen zu lassen. Die Energie stammt aus der Verstoffwechslung von Nahrung, was auf molekularer Ebene vor allem Glukose bedeutet. Dabei gibt es mehrere Stufen intrazellulär Glukose zu katabolisieren. Das Ziel der stufenweisen Verstoffwechslung verschiedener Ausgangsmoleküle birgt den Vorteil für die Zelle, dass gemeinsame Intermediate gebildet werden, die von verschiedenen Wegen zur ATP-Produktion genutzt werden können.

Die erste Stufe ist die Umwandlung eines Glukosemoleküls mit sechs C-Atomen in zwei Moleküle Pyruvat mit jeweils drei C-Atomen, was als Glykolyse bezeichnet wird und im Cytosol stattfindet. Die zweite Möglichkeit ist die Oxidation des Pyruvats über Acetyl-Coenzym A (CoA) zu CO_2 im Mitochondrium, was als Citratsäurezyklus bekannt ist (Krebs, 1940, Kennedy und Lehninger, 1949). An dieser Stelle, bei den Umsatz-limitierenden Schritten des Citratsäurezyklus, befindet sich eine wichtige Schnittstelle zur Ca^{2+} -Homöostase, da die drei Enzyme Pyruvatdehydrogenase, α -Ketoglutaratdehydrogenase und Isocitratdehydrogenase durch Ca^{2+} reguliert werden (Denton et al., 1972, McCormack und Denton, 1979, McCormack und Denton, 1990, Denton, 2009, Griffiths und Rutter, 2009, Rizzuto et al., 2009, Cardenas et al., 2010).

Die meiste Energie der ersten beiden Schritte wird nicht in Form von ATP produziert, sondern wird in Form von hochenergetischen Elektronen in den reduzierten Coenzymen Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ($\text{NADH}+\text{H}^+$) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) gespeichert. Die Energie aus der Coenzym-Oxidation wird im Mitochondrium dazu genutzt eine protonenmotorische Kraft aufzubauen. Dazu wird die Übertragung der Elektronen aus NADH und FADH_2 auf O_2 mit dem Pumpen von H^+ aus der Matrix in den Intermembranraum gekoppelt (Davies und Krebs, 1952, Mitchell, 1961). Dies geschieht mit Hilfe von vier Redoxenzymkomplexen der IMM, in die Elektronen eingespeist werden, sowie den Elektronen- bzw. Wasserstoffüberträgern CytC und Ubichinon. Dabei werden Protonen aus

der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt, was die Voraussetzung dafür ist, dass im letzten Schritt das Zurückströmen der Protonen entlang ihres Gradienten mit der ATP-Synthese durch die F_0F_1 -ATP-Synthase gekoppelt wird. In dieser sogenannten oxidativen Phosphorylierung werden am Ende alle NADHs und $FADH_2$ reduziert und die damit einhergehende Änderung der freien Energie zur Phosphorylierung von ADP zu ATP verwendet, wodurch es zu einer Produktion von 34 ATP-Molekülen pro Molekül Glukose kommt. Somit beträgt die Gesamtenergiebilanz, die aus der Verstoffwechslung eines Glukosemoleküls herrührt 38 ATP (Lehninger B., 1993, Lodish H., 2008).

2.4.1.1. Besondere Aspekte der ATP-Produktion

Differenzierte Zellen generieren ATP unter sauerstoffreichen und nährstoffreichen Bedingungen vornehmlich aus der oben beschriebenen oxidativen Phosphorylierung. Herrschen allerdings anaerobe Bedingungen, ziehen differenzierte Zellen vermehrt die Glykolyse heran und produzieren Laktat (Vander Heiden, 2013). Krebszellen unterscheiden sich dahingegen drastisch, da trotz der Anwesenheit von Sauerstoff hauptsächlich die Glykolyse zur Verstoffwechslung der im großen Umfang aufgenommenen Glukose zu Laktat herangezogen wird (Vander Heiden et al., 2009, Liberti und Locasale, 2016a, Liberti und Locasale, 2016b). Dieser Effekt wird entweder „aerobe Glykolyse“ oder nach seinem Entdecker „Warburg-Effekt“ genannt (Warburg et al., 1927, Warburg, 1956a, Warburg, 1956b). Glaubte Otto Warburg noch daran, dass Krebszellen aufgrund einer dysfunktionalen oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse übergehen, ist man sich heute sicher, dass beide Wege, oxidative Phosphorylierung und aerobe Glykolyse, benötigt werden (Viale et al., 2014, Flaveny et al., 2015). Noch nicht aufgeklärt, aber kontrovers diskutiert, werden die möglichen Ursachen für den Warburg-Effekt von Krebszellen (Liberti und Locasale, 2016b). Vorgeschlagen werden Modelle, die die Gründe in einer schnellen ATP-Synthese durch die aerobe Glykolyse sehen (Shestov et al., 2014), oder der Veränderung der Tumormikroumgebung durch sezerniertes Laktat (Estrella et al., 2013). Ein weiterer Erklärungsversuch ist die Anpassung der Krebszellen an die Anforderungen der unkontrolliert proliferierenden Zellen, die vermehrt Kohlenstoffquellen für anabole Prozesse benötigen (Deberardinis et al., 2008, Vander Heiden et al., 2009, Dang, 2012). Auch über die Möglichkeit, dass der Warburg-Effekt direkte „signaling“-Funktionen ausübt, vor allem in Bezug auf das mitochondriale Redoxpotential und ROS, wurde diskutiert (Hamanaka und Chandel, 2011, Locasale und Cantley, 2011).

2.4.2. Intrazellulärer ATP-Transport

2.4.2.1. Mitochondrialer ATP Transport

Die Voraussetzung für die Synthese von ATP im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung von ADP ist eine hohe ADP-Konzentration in der Mitochondrien-Matrix. In Kombination mit der Notwendigkeit ATP für die vielfältigen energieabhängigen Prozesse im Cytosol und den anderen intrazellulären Organellen bereitzustellen, stellt sich die Frage wie die beiden hoch negativ geladenen Moleküle die IMM passieren können. Gelöst hat die eukaryotische Zelle dies über den sogenannten ADP/ATP-Carrier (AAC) (Pfaff und Klingenberg, 1968, Pfaff et al., 1969) Letzterer gehört zur Familie der mitochondrialen Carrier (MCF, SLC25-Familie), die diverse Metabolite in das Mitochondrium herein und heraus transportieren (Palmieri, 2014, Palmieri und Monne, 2016). Der AAC ist der abundanteste Carrier der IMM und als solcher der am besten untersuchte der SLC25-Familie (Kunji et al., 2016).

Da aufgrund des Protonengradienten die cytosolische Seite der IMM positiv und die lumenale Seite der IMM negativ geladen ist, bewegt sich das vierfach negativ geladene ATP-Molekül gegenüber dem nur dreifach negativ geladenen ADP-Molekül verstärkt zu der positiv geladenen cytosolischen Seite der IMM, was einem äquimolaren elektrogenen Austausch entspricht (Klingenberg und Rottenberg, 1977, Kramer und Klingenberg, 1977, Villiers et al., 1979). Somit geht mit einer vermehrten ATP-Produktion ein AAC-Aktivierungsprofil einher, das den Export von ATP favorisiert (Klingenberg, 2008). Für die Aktivität des AAC wurden keine regulatorisch beteiligten Proteine identifiziert (Klingenberg, 2008).

Strukturell besteht der AAC aus sechs Transmembran- α -Helices, die aus drei homologen Domänen aufgebaut sind (Saraste und Walker, 1982). N- und C-Termini sind beide dem Intermembranraum zugewandt (Capobianco et al., 1995). Das Protein enthält eine einzelne zentrale Bindestelle mit drei negativ geladenen Aminosäureresten und zwei Netzwerken aus jeweils drei Salzbrücken auf beiden Seiten der IMM (Kunji et al., 2016). Im cytoplasmatischen Zustand, bildet sich das Matrix-Salzbrückennetzwerk aus und das cytoplasmatische Netzwerk bricht auf, wodurch die Bindestelle für ADP frei wird (Kunji et al., 2016). Die Bindestelle ist alternierend der cytoplasmatischen und der Matrixseite zugewandt und für AAC sind große Konformationsänderungen notwendig, der wahrscheinlich als Monomer den Transport der großen Moleküle ADP und ATP vermittelt (Klingenberg, 2008, Kunji et al., 2016, Pietropaolo et al., 2016).

Die physiologische Bedeutung des AAC wird durch die Existenz von mehreren AAC-Isoformen unterstrichen. So existieren in Hefen drei und in Menschen vier Isoformen, deren

Expressionsmuster sich in Abhängigkeit des Energiebedarfs des Gewebes unterscheiden (Kunji et al., 2016).

2.4.2.2. ATP-Transport in anderen Organellen

ATP dient als Energiequelle für viele ER-residente Chaperone, insbesondere BiP, und stellt so das korrekte Falten und die Rettung fehlgefalteter Proteine sicher (Gething und Sambrook, 1990, Braakman et al., 1992). Insbesondere die BiP-Dissoziation von seinem Substrat stellt einen ATP-abhängigen Schritt dar (Dorner et al., 1990) (siehe Abbildung 2.2), aber weiterhin kann ATP im ER auch zur Erhaltung der oxidierenden Umgebung im ER-Lumen dienen (Braakman et al., 1992). Dies zeigt die Notwendigkeit des ATP-Transports vom Ort der Entstehung entweder im Cytosol oder dem Mitochondrium in das ER (Mayinger und Meyer, 1993, Hirschberg et al., 1998). Dass ein gerichteter Transport stattfinden muss, zeigten bereits einige Untersuchungen in rER-Vesikeln aus der Rattenleber oder dem Hundepankreas, wo es zu einer proteinvermittelten ATP-Translokation kam (Clairmont et al., 1992). Später konnte aus dem rER von Rattenlebern weiterhin ein ATP-Carrier solubilisiert und in Liposomen rekonstituiert werden, der sich durch einen ADP/ATP-Antiport-Mechanismus auszeichnete und nicht sensitiv für Atractylosid war, den spezifischen Inhibitor für den mitochondrialen AAC (Shin et al., 2000). Allerdings blieb die Natur des ADP/ATP-Carriers auf molekularer Ebene weiterhin ungeklärt.

Auch für Vesikel, die dem ER der Hefe *S. cerevisiae* entstammten, wurde die Existenz eines ATP-Transportsystems beobachtet (Mayinger und Meyer, 1993). Sac1p schien ein interessanter Kandidat für ein ATP-Transport-vermittelndes Protein zu sein, da Mikrosomen aus Stämmen mit einer Deletion von Sac1p keine ATP-Transportaktivität mehr aufwiesen (Mayinger et al., 1995). Wenig später wurde Sac1p dann jedoch nicht als eigentlicher ATP-Transporter, sondern lediglich als ein regulatorischer oder akzessorischer Faktor für einen effizienten ATP-Transport charakterisiert (Kochendorfer et al., 1999).

Die molekulare Identität eines ATP-Transporters der ER-Membran konnte bislang für die Pflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* aufgedeckt werden (Leroch et al., 2008, Zhang et al., 2016). AtER-ANT1 (engl. „endoplasmic reticulum-adenine nucleotide transporter 1“) ist ein Mitglied der MCF und ist phylogenetisch eng mit den pflanzlichen mitochondrialen AACs verwandt (Leroch et al., 2008). Seine Lokalisation wurde eindeutig dem ER zugeordnet und AtER-ANT1-KO-Pflanzen wiesen eine schwerwiegende Wachstumsstörung auf und gleichzeitig fand eine Herunterregulation von Proteinen statt, die auf eine konstante ATP-Versorgung angewiesen sind, wie z.B. BiP und Calreticulin (Leroch et al., 2008). Auch in der Plasmamembran existieren für *A. thaliana* Adenin-Nukleotid-

Carrier vom Typ AAC (Rieder und Neuhaus, 2011). Da der KO von AtER-ANT1 nicht letal war, wie es sich für eine völlig fehlende ATP-Versorgung im ER vermuten ließe, gingen die Autoren von der Existenz eines weiteren noch ungeklärten ATP-Transportsystems in das ER aus, wie beispielsweise eines spannungsabhängigen Anionenkanals der ER-Membran (Shoshan-Barmatz und Israelson, 2005, Leroch et al., 2008).

Darüber hinaus wurde in der ER-Membran der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* ein Nukleotid-Antiporter gefunden (PtNTT5), der nur entfernt verwandt zu den bekannten Nukleotid-Transportern (NTT, SLC6) ist und bevorzugt den Transport von (Deoxy-)purin-Nukleotiden vermittelt (Chu et al., 2017). Dies spricht für ein spezifisch angepasstes Nukleotid-Transportsystem in Kieselalgen (Chu et al., 2017).

Vor allem in Hinblick auf den humanen mitochondrialen AAC und auch den ER-ATP-Carrier von *A. thaliana*, die beide der MCF (SLC25) angehören, lässt die SLC-Proteine auf der Suche nach dem humanen ER-ATP-Carrier in den Vordergrund rücken. Bislang sind 195 Transporter aus 52 Familien bekannt, die insgesamt den Transport eines breiten Substratspektrums abdecken, wobei es unter den verschiedenen Transportern/Familien sowohl spezifische, als auch solche gibt, die den Transport von chemisch diversen Substraten ermöglichen (Hediger et al., 2013, Lin et al., 2015). Einige SLC-Familien spielen besonders in Hinblick auf ihre Beteiligung an zellulären Pathologien und für die Entwicklung neuer medikamentöser Angriffspunkte eine Rolle, wie beispielsweise die SLC1-Familie der Glutamat-transporter (Kanai et al., 2013), die SLC6-Familie der Neurotransmittertransporter (Pramod et al., 2013) oder die der mitochondrialen Transporter (SLC25) (Clemencon et al., 2013, Palmieri, 2013).

2.4.3. Intrazelluläres Energie-„sensing“ durch AMPK-„signaling“

In der Zelle hat die Erhaltung der überlebenswichtigen Funktionen, die an eine konstante Versorgung mit ATP gekoppelt sind, oberste Priorität. Darum gilt es Energiemangelzustände zu detektieren und ihnen entgegenzusteuern was die Zelle mit Hilfe des Enzyms AMPK (engl. „5' AMP activated protein kinase“) bewerkstelligt.

Die AMPK ist eine Serin/Threonin Proteinkinase und entstand evolutionär vermutlich zu einem sehr frühen Zeitpunkt, als Wirtzellen begannen primitive Mitochondrien aufzunehmen, deren Energiestatus es zu messen galt (Hardie und Ashford, 2014). Mit der Entwicklung komplexerer multizellulärer Eukaryoten wurde dieser zell-autonome Energiesensor beibehalten und ausgebaut (Hardie und Ashford, 2014). Dieses Energie-Sensing läuft über die Ermittlung des Verhältnisses von AMP:ATP bzw. von ADP:ATP (Gowans et al., 2013).

Im Ruhezustand wird das Verhältnis von ADP:ATP durch den katabolen Stoffwechsel bei etwa 1:10 gehalten und die Reaktion der Adenylatkinase ($2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) ist in Richtung ADP verschoben und AMP bleibt auf einem niedrigen Level (Hardie, 2014). Erfährt die Zelle metabolischen Stress, führt die Reaktion der Adenylatkinase durch eine Verschiebung in Richtung AMP zu einer Umwandlung von ADP in AMP (Hardie, 2014). Somit stellt AMP einen sensitiven Energieindikator dar, der die AMPK reguliert. Sie reagiert auf intrazelluläre Stressreaktionen mit der Aktivierung der katabolen Stoffwechselwege, die ATP produzieren und gleichzeitiger Abschaltung von ATP-verbrauchenden anabolen Reaktionen (Hardie und Ashford, 2014). Die AMPK besteht aus einer katalytischen α -Untereinheit und regulatorischen β - und γ -Untereinheiten (Hardie et al., 2012). Die Stelle der AMPK, die zur Aktivierung phosphoryliert wird, ist ein konserviertes Threonin in der Kinase-Domäne, bezeichnet als Thr172 (Hawley et al., 1996). Die bedeutendste Kinase, die die AMPK an der Stelle Thr172 phosphoryliert ist ein Komplex, der die Proteinkinase LKB1 (engl. „Liver kinase B“) enthält (Hawley et al., 2003, Woods et al., 2003, Shaw et al., 2004). Die Aktivierung der AMPK erfolgt über einen dreigeteilten, sich komplementierenden Mechanismus, der die Bindung von AMP an die AMPK trotz höherer intrazellulärer Konzentration an ATP sicherstellt. Zum einen unterstützt AMP die Phosphorylierung von Thr172 und inhibiert die Dephosphorylierung von Thr172. Zum anderen kommt es zur allosterischen Aktivierung der AMPK.

Eine weitere Möglichkeit wie die AMPK phosphoryliert werden kann läuft über einen Ca^{2+} -aktivierten Mechanismus und die Kinase CaMKK2 (engl. „Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase 2“) (Hawley et al., 2005, Hurley et al., 2005, Woods et al., 2005). Dieser Aktivierungsweg der AMPK ist unabhängig von AMP-Veränderungen und kann eine Möglichkeit sein, um einem Ca^{2+} -Signal-getriggerten ATP-Verbrauch entgegen zu wirken, wie es bei der Aktivierung von Pumpen, die die Ca^{2+} -Hömoostase sicherstellen müssen, der Fall ist (Bonora et al., 2012, Hardie und Ashford, 2014). Abbildung 2.9 fasst das Energiesensing durch die AMPK zusammen.

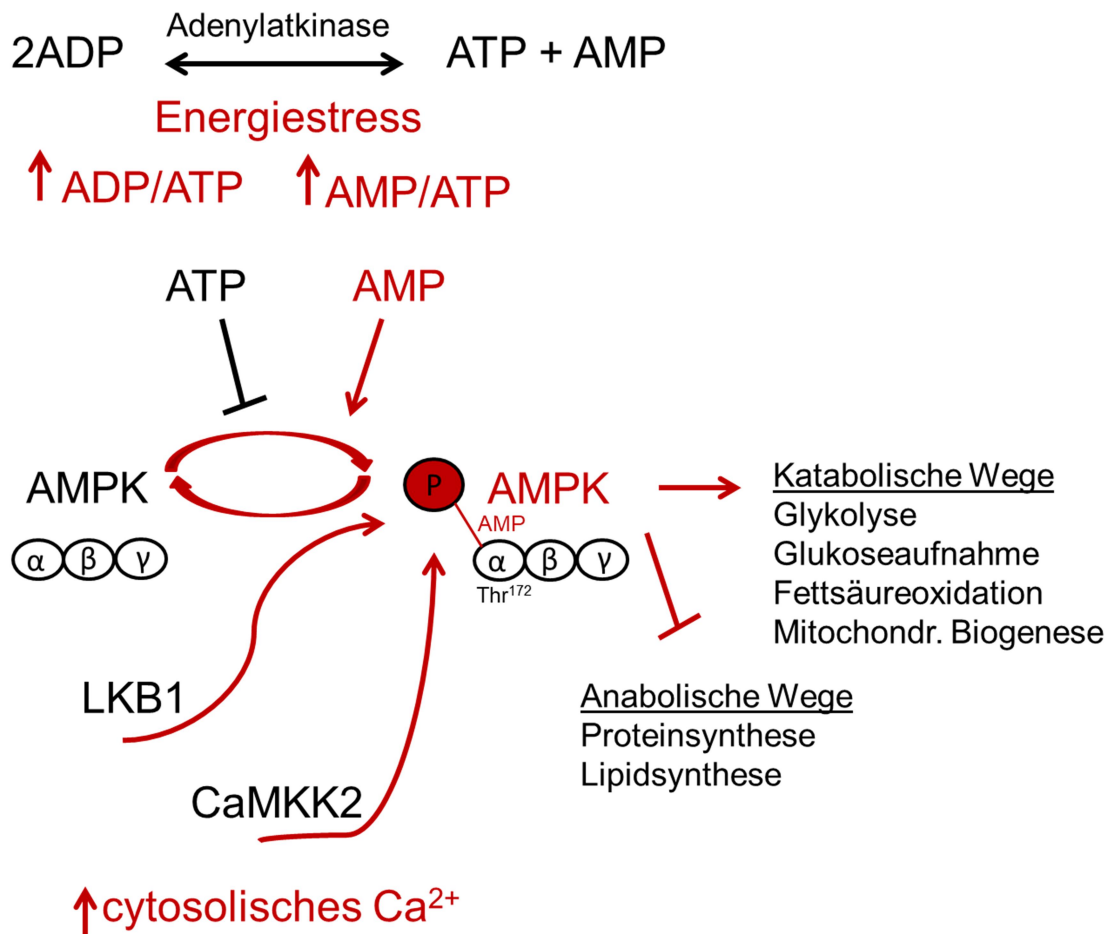


Abbildung 2.9: Energieensing durch die AMPK. In ungestressten Zellen ist die Reaktion der Adenylatkinase nahe des Äquilibrium gelagert, was sich unter Energiestress ändert. Durch ein vermehrtes Energiebedürfnis der Zelle verschiebt sich das Gleichgewicht und das Verhältnis von ADP/ATP und vor allem das von AMP/ATP steigt an. Die AMPK (engl. „5′ AMP activated protein kinase“) besteht aus drei Untereinheiten, der katalytischen α -Untereinheit und den regulatorischen β - und γ -Untereinheiten. Innerhalb der α -Untereinheit ist Thr172 die Phosphorylierungsstelle, die von den beiden Kinasen LKB1(Liver kinase B) und CaMKK2 (Calmodulin-dependent protein kinase kinase) phosphoryliert wird. Letztere agiert unabhängig vom AMP/ATP-Verhältnis und wird durch Veränderungen in der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert. Ziel der Aktivierung der AMPK ist es durch Stimulation der katabolischen Wege, die Energiehomöostase durch ATP-Generation wiederherzustellen, wohingegen anabolische Stoffwechselwege, die selbst ATP konsumieren, inhibiert werden.

Zur Produktion von ATP greift die AMPK in eine Vielzahl von katabolen Stoffwechselwegen ein, indem die Phosphorylierung der Zielproteine entweder zur Aktivierung oder im Falle der anabolen Stoffwechselwege, zur Inhibition benutzt wird (Hardie, 2014). Die Hauptwege, die durch die AMPK aktiviert werden, sind die Glykolyse durch Phosphorylierung der PFK2 (6-Phospho-fructo-2-kinase) (Marsin et al., 2000, Marsin et al., 2002), die mitochondriale Biogenese durch den transkriptionellen Co-Aktivator PGC-1 α (Jager et al., 2007), die Glukoseaufnahme (Holmes et al., 1999, Barnes et al., 2002) und die Fettsäureoxidation (Corton et al., 1995, Merrill et al., 1997). Demgegenüber werden folgende anabole

Reaktionen inhibiert: die Fettsäuresynthese durch Inhibition von ACC1 (Davies et al., 1992), die Cholesterolsynthese (Clarke und Hardie, 1990), Glycogensynthese (Jorgensen et al., 2004) und die Phospholipidsynthese (Muoio et al., 1999). Weiterhin kommt es auch zur Inaktivierung der Proteinsynthese durch mTOR (engl. „mechanistic Target of Rapamycin“) (Gwinn et al., 2008) und der rRNA-Synthese (Hoppe et al., 2009).

2.5. Zielsetzung der Arbeit

Wie in der Einleitung zuvor beschrieben, stellt der Sec61-Komplex neben seiner Rolle als Proteintranslokase für Polypeptide ins ER einen sog. Ca^{2+} -Leckkanal der ER-Membran dar. Letzteres resultiert vor allem aus dem steilen Ca^{2+} -Konzentrationsgradient zwischen dem Cytosol und dem ER als Hauptspeicherorganell für Ca^{2+} . Vergangene Forschungsarbeiten charakterisierten mehrere allosterische Effektoren (BiP, ERj3, ERj6, Ca^{2+} -CaM und Sec62) des Ca^{2+} -Leckkanals und somit als Einflussfaktoren der Ca^{2+} -Homöostase. Mit der murinen Diabetes-verursachenden Y344H-Mutation innerhalb des Proteins Sec61 α wurde erstmals eine Mutante gefunden, deren Pathomechanismus auf die gestörte Ca^{2+} -Homöostase auf der Ebene des Sec61-Komplexes schließen ließ. Die vorliegende Arbeit ergänzt in ihrem ersten Ziel dieses Bild um die Aufklärung des Pathomechanismus für die PAD (engl. „primary antibody deficiency“)-assoziierte Sec61-Mutation V85D, die erstmals in Patienten mit Plasmazelldefizienzen aufgetreten ist. Besonders interessant ist hierbei die Position der Mutation, die eine Aminosäure des hoch konservierten Porenring betrifft, was die Frage aufwirft, ob sich dadurch Auswirkungen für die Integrität des Sec61-Komplexes und seine Ca^{2+} -Permeabilität ergeben. Die Methodik, die zur Beantwortung der Fragestellung herangezogen wurde, war die transiente Sec61 α (V85D)-Expression (mit und ohne vorangehender siRNA-vermittelter Depletion des endogenen Sec61 α) in HeLa-Zellen. Gekoppelt wurde dies mit einem „Live Cell Calcium Imaging“ des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes mit Hilfe des Ca^{2+} -Sensors Fura-2.

Im zweiten Ziel der Arbeit ging es darum an die Ca^{2+} -Homöostase des ER anschließend, ein Modell für die physiologische Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms zu entwickeln unter Einbeziehung der zellulären Energiehomöostase. Dazu wurde das Protein SLC35B1 und insbesondere seine Funktion als ATP-Carrier der ER-Membran untersucht (Kapitel 3.2). Das Augenmerk lag hier auch auf dem Regulationsmechanismus, der zur Aufnahme von ATP in das ER führt, von dem es Hinweise gab, dass er an die Ca^{2+} -Homöostase des ER gekoppelt ist (Vishnu et al., 2014). Die Inhalte der im Folgenden dargestellten Experimente betreffen die zelluläre Charakterisierung nach der SLC35B1-

Depletion in Hinblick auf Morphologie, ER-Stress, Apoptose und Zellwachstum, um weiterhin ein Regulationsmodell für die intrazelluläre ATP-Homöostase zu entwickeln. Dieses umfasst die Schaltstellen SLC35B1, BiP, Sec61 sowie AMPK.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Abena , Eberdingen	Handschuhe
Abimed , Langenfeld	Gilson Pipetten
ACEA Biosciences , San Diego, CA, USA	xCELLigence® RTCA SP
Agfa , Mortsel, Belgien	Röntgenfilmentwickler Curix 60
Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific , Waltham, Ma, USA	qPCR-Cycler StepOnePlus™; Zubehör qPCR: MicroAmp™ optical adhesive covers and optical 8-cap-straps, MicroAmp™ 96 well plate
Beckman , München	Zentrifugen: Optima TLX Ultracentrifuge, L-80 Ultracentrifuge, Optima Max-E Ultracentrifuge, J2-MC Centrifuge, GS-6KR Centrifuge; Rotoren: TLA100.3, JA-20, JA-10, JLA 10.500, 70Ti, GH-3.8
Bio-Rad , Hercules, CA, USA	Trans-Blot® Cell
Braun , Melsungen	Spritzen; Kanülen
Corning Inc. , New York, USA	Corning® 96 well plates clear bottom
CTI	Semi-dry Blot Apparatur
Duran , Wertheim	Laborglasflaschen
Eppendorf , Hamburg	Zentrifugen: Centrifuge 5415C, 5415R; Thermostat 5320; Thermomixer 5436; Multipipette 1ml
Fröbel Labortechnik , Wasserburg	Ultraschallaufschluss; Wipptisch ROCKY; Gel Trockner
GE Healthcare , Uppsala, Schweden	Röntgenfilme; Kassetten zur Filmexposition; Typhoon Trio; Image Scanner III; Image Eraser
Gelaire Flow Laboratories , Meckenheim	Sterilbank
Gilson , Middleton, WI, USA	Multipipette 100 µl
Greiner bio-one , Frickenhausen	96 well Platte (weiß); Zellkulturschalen (6 cm und 3,5 cm); sterile Zellkulturflaschen 75 cm ²
Heidolph , Schwabach	Magnetische Rührer MR3000, MR3002
Heraeus , Hanau	Trockenschrank T12
Hettich , Tuttlingen	HT086 Gefriertruhe -80 °C
Hirschmann Laborgeräte , Eberstadt	Pipetus®-akku Pippetierhilfe
IDL , Nidderau	Parafilm
Infors , Bottmingen, Schweiz	Inkubationsschüttler AJ112/110
Invitrogen , Darmstadt	Countess®; Zählkammern; Autofluor™

	CellChamber
Isotherm KGW , Karlsruhe	Stickstoffbehälter
Julabo , Seelbach	Wasserbad
Millipore Co. , Bedford, USA	Immobilon®-P PVDF Membran (0,45 µm Porengröße); Millipore-Wassieranlage Milli-Q®
Molecular Dynamics , Synnyvale, CA, USA	Storage Phosphor Screen Exponierplatten; Kassetten zur Exposition
NeoLab , Heidelberg	Taumel-Rollenmischer; Deckgläser (rundØ 25 mm, 10 mm); Eisbäder; magnetische Rührfische
New Brunswick , Edison, USA	Inkubator Galaxy 14 S
Nikon Instruments , Düsseldorf	Nikon Eclipse TE 2000-S und Filterset (DAPI, FITC, TRITC, TexR): Nikon Plan Fluor 10x/0,3 Objektiv; Nikon Plan Fluor ELWD 20x/0,45 Objektiv; Nikon Plan Fluor 60x oil/1,25 Objektiv
Panasonic , Hamburg	Mikrowellenherd
PeqLab , Erlangen	Nanodrop™ ND-1000 Spektralphotometer; PCR Cycler Primus 96; Lumi Imager Fusion SL Vilber Lourmat; UV-Detektionstisch
Pharmacia Biotech , Freiburg	Image Master VDS Geldokumentationssystem; Ultraspec 3000 UV/VIS Spektralphotometer; Power Supply EPS 3500, 600, 200, 500/400
Sarstedt , Nürnbergrecht	Pipettenspitzen (1 µl, 200 µl, 1000µl); Röhren (15 ml, 50 ml); Reagiergefäße (1,5 ml); Einweg-Küvetten
Sartorius , Göttingen	Feinwaagen
Schleicher & Schüll , Dassel	Sterilfilter (0,2 µm)
Schott - Duran , Wertheim	Glaswaren: Pipetten, Bechergläser, Kolben
Scientific Industries , Bohemia, USA	Vortexer
Systec , Wetztenberg	Autoklav
Tecan , Männedorf, Schweiz	Plate Reader Infinite® M200
Thermo Scientific , Dreieich	Rapid Flow Bottle Top Filter; Sterilbank; Zellinkubator Heracell™ 150 i
Till Photonics , Gräfeling	iMIC Mikroskop; Polychromator V
VWR , Darmstadt	Pasteurpipetten Glas 150 mm; Tücher
Wenzel Gläsererei , München	Glasplatten
Werkstatt Biochemie 1 , Göttingen	SDS-Gelelektrophorese; Agarose-Gelelektrophorese
Whatman GmbH , Dassel	Whatman FP30/0,2 CA-S rotrand (0,2 µm)
WTW , Weilheim	pH-Meter
Zeiss , Jena	Binokular Axiolab; Fluor 20x/0,75 M27 Objektiv (iMIC)
Ziegler , Isernhagen	Eismaschine

3.1.2. Software

Adobe Systems , San Jose, Ca, USA	Adobe Illustrator, CS6
AECA Biosciences , San Diego, CA, USA	RTCA software version 2.0
Corel , Ottawa, ON, Canada	Corel Draw, X3
DNASTAR Inc. , Madison WI, USA	Seqbuilder
GE Healthcare , Uppsala, Schweden	Labscan
Graph-Pad software , La Jolla, CA, USA	Prism 5.01
Microsoft , Redmond, WA, USA	Microsoft Excel, Word, PowerPoint, Version 2007
Molecular Dynamics , Sunnyvale, CA, USA	ImageQuant Version 5.1
Nikon Instruments , Düsseldorf	NIS Elements AR 3.0 Software
PeqLab , Erlangen	Fusion
Proteom Software , Portland, OR, USA	Scaffold
Tecan , Männedorf, Schweiz	iControl
Thomson Reuters	EndNote X5
Till Photonics , Gräfeling	TILLvisION Software
Zeiss , Jena	Zen Lite (black edition)

3.1.3. Chemikalien

Agfa , Mortsel, Belgien	Entwickler-Lösung G153; Fixierer-Lösung G354
Amersham Pharmacia Biotech , Freiburg	ECL Western Blot Detection Reagent; Nukleosidtriphosphate
Applied Biosystems , Foster City, USA	TaqMan™ Sonden für SLC35B1 (Hs00195184_m1), ACT1 (Hs00357333_m1), HSPA5 (Hs99999174_m1), DDIT3 (Hs99999172_m1)
Bio-Rad , Hercules, USA	Bradford Reagenz
Biospec Products , Bartlesville, OK, USA	Glasbeads 0,5 mm
Calbiochem - Merck , Darmstadt	Tunicamycin; Digitonin; CHAPS; MG132
Enzo life sciences , Lörrach	Staurosporin
Eurofins MWG , Ebersberg	PCR Primer; Sequenzierungsservices

Fermentas - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	GeneRuler 1000 bp; 6 x DNA-Probenpuffer; Restriktionsenzyme
Fisher Chemical - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK GeneON, Ludwigshafen Gibco - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Aceton BSA standard solution GelRed Penicillin/Streptomycin; DMEM + GlutaMAX™-I; PBS (steril); Trypsin; Opti- MEM™; Trypanblau Hygromycin B; Thapsigargin; Ionomycin; Fura- 2 AM
Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
Merck, Darmstadt	Ethidiumbromid; Salzsäure (HCl); Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Magnesiumchlorid (MgCl ₂); Kaliumchlorid (KCl); Essigsäure; Magnesiumacetat (MgAc); Natriumchlorid (NaCl)
Millipore Co. - Merck KGaA, Darmstadt MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich Origene, Rockville, MD, USA	Bromphenolblau Trypsininhibitor (Sojabohne) Positives SLC35B1-exprimierendes HEK-Lysat (LY401770) [³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mmol) Formaldehyd ultrapure SP6-Polymerase; T7-Polymerase; RNasin®, Rabbit Reticulocyte Lysate System (Nuclease treated); FuGene®HD
Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim Polysciences, Warrinton, PA, USA Promega, Madison, WI, USA	T4-Ligase; RNA-Nukleotide; HiPerFect
Qiagen, Hilden	Kaliumacetat (KAc); 2-Propanol
Riedel-de-Haën, Hannover	RnaseA; DTT; Nuklease S7;NP40
Roche, Mannheim	Glucose; Agar-Agar (Bodengele); Roti®-Mount
Roth, Karlsruhe	FluorCare DAPI; LB-Agar; Ethylenglycol- bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA); Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Milchpulver (Blotting grade); Glycerin; Agarose; Trichloressigsäure(TCA)
Serva, Heidelberg	Tetramethylethylendiamin (TEMED); Ethanol (EtOH) absolut; 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES); Kalziumchlorid (CaCl ₂); 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (AMPS); 40 % Acrylamid; Bis-Tris-Acrylamid; Harnstoff; Natriumdodecylsulfat (SDS); TritonX-100; Harnstoff
Sigma-Aldrich - Merck, Darmstadt	ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel; Fätales Kälberserum (FCS); PepstatinA; Leupeptin; Antipain; Chymostatin; Poly-L-Lysin; Saponin; Ampicillin; Kanamycin; Beta-Mercaptoethanol; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Tween-20
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,	Page Ruler™ Prestained Protein Ladder;

USA
 VWR, Darmstadt
Zentrales Chemikalienlager UdS,
 Saarbrücken

SuperSignal™ West Pico; SuperSignal™ West Femto
 Glycin
 Methanol; Ethanol, vergällt

3.1.4. Kits

Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, SuperScript IV VILO Master Mix; Fura-2
 Waltham, MA, USA Calcium Imaging Calibration Kit
Biovision, Milpitas, CA, USA ApoSensor ApoSENSOR™ ATP Cell
 Viability Bioluminescence Assay Kit
Genomed, Löhne Jet star Midi-Präparations- Kit
Promega, Madison, WI, USA RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and
 Necrosis Assay
Qiagen, Hilden Plasmid Maxi Kit; QIAquick® Gel Extraction
 Kit; QIAquick® PCR Purification Kit;
 QIAamp® RNA Blood Mini Kit
Zymo research, Irvine, CA, USA ZR Plasmid Miniprep™

3.1.5. Oligonukleotide

RNA-Oligonukleotide

In Tabelle 3.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten siRNA-Nukleotide aufgeführt. Die siRNAs wurden jeweils lyophilisiert vom Hersteller geliefert und dann mit RNA-freiem H₂O_{bidest} in einer Konzentration von 20 µM gelöst und zur Langzeitlagerung bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 3.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Oligonukleotide (UTR = engl. „untranslated region“).

Zielgen	Interne Nomenklatur	Sequenz („sense“-Strang)	Eingesetzte Konzentration
<i>SEC61A1</i>	#5-UTR	CACUGAAAUGUCUACGUUUtt	20 nM
<i>SEC61B</i>	#1	AGAUUCACCUGGGCUCAAAtt	10 nM
<i>SLC35B1</i>	#4	GGUACCCUGCCAUCAUCAAtt	20 nM
<i>SLC35B1</i>	#1-UTR	GAGACUACCUCCACAUCAAtt	20 nM

HSPA5 | BiP#1-UTR | GCGGCUGUUUACUGCUUUUtt | 35 nM

DNA-Oligonukleotide

Die folgende Tabelle 3.2 enthält die in der Arbeit verwendeten DNA-Primer.

Tabelle 3.2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Primer

Zielgen	Interne Nomenklatur	Sequenz
<i>SLC35B1</i>	A	5' ATGAGGCCCTGCCGCCGGTC3'
<i>SLC35B1</i>	B	5' ATGGCCTCTAGCAGCTCCCTG3'
<i>SLC35B1</i>	I	5' GGGTCAGCGATAATAGCAAGA3'
<i>SLC35B1</i>	II	5' ACGCGTGTGGGATGTCTTCTTAG3'

3.1.6. Plasmide

In Tabelle 3.3 sind die Plasmide aufgeführt, die zur transgenen Expression in intakten HeLa-Zellen benutzt wurden.

Tabelle 3.3: Auflistung der in dieser Arbeit zur Transfektion von HeLa-Zellen verwendeten Plasmide (UdS = Universität des Saarlandes, Amp = Ampicillin, Kan = Kanamycin, IRES = „internal ribosomal entry site“, GFP = „green fluorescent protein“).

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Herkunft
pCMV6-AC-IRES-GFP	Leervektor	Amp	Origene
pCMV6-AC- <i>SEC61A1</i> -IRES-GFP	Sec61 α (<i>homo sapiens</i>)	Amp	Uni Freiburg, D.Schubert
pCMV6-AC- <i>SEC61A1(V85D)</i> -IRES-GFP	Sec61 α (<i>homo sapiens</i>)	Amp	Uni Freiburg, D.Schubert
pCMV6-AC- <i>SEC61A1(Y344H)</i> -IRES-GFP	Sec61 α (<i>homo sapiens</i>)	Amp	UdS, AG Zimmermann
pCDNA3- <i>SEC61B</i> -IRES- <i>SEC61G</i>	Sec61 β , Sec61 γ (<i>homo sapiens</i>)	Amp	UdS, AG Zimmermann
pCDNA3-IRES-GFP	Leervektor	Amp	UdS, U.

			Wissenbach
pCMV6-ENTRY- <i>SLC35B1-Iso1-MYC-DDK</i>	SLC35B1 Isoform 1 mit C-terminalem Myc-DDK-Tag (<i>homo sapiens</i>)	Kan	Origene
pCMV6-ENTRY- <i>SLC35B1-Iso2-MYC-DDK</i>	SLC35B1 Isoform 2 mit C-terminalem Myc-DDK-Tag (<i>homo sapiens</i>)	Kan	Origene
pCMV6-ENTRY- <i>SLC35B1-Iso2DD-MYC-DDK</i>	SLC35B1 Isoform 2 mit C-terminalem Myc-DDK-Tag und Mutation von S15D und S29D (<i>homo sapiens</i>)	Kan	speziell angefertigt von MWG
pCMV6-AC- <i>SLC35B1-Iso1-GFP</i>	SLC35B1 Isoform 1 mit C-terminalem GFP-Tag (<i>homo sapiens</i>)	Amp	Origene
pCMV6-ENTRY- <i>SLC35B1-Iso3/TV2-MYC-DDK</i>	SLC35B1 Isoform 3 mit C-terminalem Myc-DDK-Tag (<i>homo sapiens</i>)	Kan	Origene
ERAT4.01	ATP _{ER} -Sensor	Amp	Next Generation Fluorescence Imaging
ATeam	ATP _{Cyto} -Sensor	Amp	UdS, AG Bogeski

Plasmide, die zur *in vitro* Transkription benutzt wurden sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Auflistung der zur *in vitro* Transkription herangezogenen Plasmide (UdS = Universität des Saarlandes, Amp = Ampicillin, UCSF = University of California, San Francisco, MPI = Max-Planck-Institut)

In-vitro Plasmide

Name	Beschreibung	Promotor	Resistenz	Herkunft
pC1-neo-KS1	Leichte Immunglobulinke tte κ	T7	Amp	I. Haas; MPI Freiburg

	(<i>Homo sapiens</i>)			
pcDNA5- <i>SEC61B</i> -op3	Sec61 β (<i>Homo sapiens</i>)	T7	Amp	S. High; University of Manchester
pB4- <i>PRL</i>	Präprolactin (<i>Bos tauris</i>)	SP6	Amp	P. Walter; UCSF
pcDNA3- <i>DNAJB11</i>	ERj3 (<i>Homo sapiens</i>)	T7	Amp	J. Dudek; UdS
pTNT- <i>APLN</i> -OPG2	Präproapelin (<i>Homo sapiens</i>)	T7	Amp	S. High; University of Manchester

3.1.7. Antikörper

Die Tabelle 3.5 fasst die Antikörper zusammen, die im Rahmen dieser Arbeit zur immunologischen Detektion von Proteinen zum Einsatz kamen. Die Antikörper wurden entweder kommerziell beschafft, oder entstammten der institutsinternen Immunisierung von Kaninchen durch Prof. Dr. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie, UdS).

Tabelle 3.5: Übersicht der in der Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper zur immunologischen Detektion von Proteinen in HeLa-Zellen (UdS = Universität des Saarlandes).

Primäre Antikörper

Zielprotein	Interne Bezeichnung; Besonderheiten	Organismus	Herkunft	Verdünnung in 1 x Blotto (siehe Kapitel 3.2.3.5)
5xHIS-HRP	Chemische Kopplung an Meerrettich-Peroxidase	Maus	Qiagen	1:1000
Aktin	Aktin	Maus	Sigma	1:10000
AMPK α 1 und AMPK α 2	AMPK	Maus	abcam	1:1000
AMPK α 1(phospho T183) und AMPK α 2 (phospho T172)	Phospho-AMPK	Kaninchen	abcam	1:1000

Materialien und Methoden

BiP	Nast 950*	Kaninchen	UdS	1:500
ERj3	Nast 336(2) (affinitätsgereinigt) ; erkennt N-terminales Peptid	Kaninchen	UdS	1:250
ERj6	ERj6	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
FLAG	Flag	Maus	Origene	1:1000
Grp170	ABP150	Kaninchen	UdS	1:1000
Grp94	Grp94	Kaninchen	UdS	1:500
OXPPOS	Cocktail aus 5 Antikörpern, jeweils gegen eine UE der 5 Komplexe gerichtet	Maus	abcam	1:500
PDI	PDI	Kaninchen	UdS	1:500
Rpl23	1087/1088	Kaninchen	UdS	1:500
Rpl4	994	Kaninchen	UdS	1:500
RpS3	680	Kaninchen	UdS	1:500
Sec61 α 1	1362 (affinitätsgereinigt) ; erkennt IQ-Motiv	Kaninchen	UdS	1:250
Sec61 α 1	Sec61 α	Kaninchen	Göttingen	1:250
Sec61 β	179b	Kaninchen	UdS	1:500
Sec62	262b	Kaninchen	UdS	1:500
Sec63	380	Kaninchen	UdS	1:500
SLC35B1	SLC35B1	Kaninchen	Sigma	1:200
tGFP	tGFP	Kaninchen	evrogen	1:2500

Sekundäre Antikörper

Zielorganismus	Detektions- methode/ Kopplung	Organis- mus	Herkunft	Verdünnung in 1 x Blotto
Anti-Kaninchen	Meerrettich- Peroxidase	Ziege	Sigma	1:1000
Anti-Kaninchen	Cy5	Ziege	Sigma	1:1000
Anti-Kaninchen	AlexaFluor594	Ziege	Invitrogen	1:1000
Anti-Maus	Meerrettich- Peroxidase	Ziege	Sigma	1:20000
Anti-Maus	Cy3	Ziege	Sigma	1:2500

3.1.8. Zelllinien

Alle experimentellen *in vivo* Versuche wurden mit der humanen Zelllinie HeLa durchgeführt. Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurde der *E.coli* DH5 α -Stamm verwendet. Besonderheiten der verwendeten Zelllinien sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Verwendete humane und bakterielle Zelllinien.

Humane Zelllinie	Besonderheiten	Anwendung	Kultivierung
HeLa ATCC no. CCL-2 TM	Aneuploid; positiv getestet auf Keratin und HPV-18	Alle zellulären Assays	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep
Bakterienstamm	Genotyp	Anwendung	Kultivierung
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk+) <i>phoA, supE44</i> λ <i>thi-1 gyra96 relA1</i>	Plasmid-vervielfältigung für <i>in vivo</i> -Anwendungen	LB(-Agar), TB

3.2. Methoden

3.2.1. Methoden der Zellkultivierung und -manipulation

3.2.1.1. Kultivierung von HeLa-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Untersuchungen unter Zuhilfenahme der Zelllinie HeLa vorgenommen. HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen, die aus dem Zervixkarzinom der Afroamerikanerin Henrietta Lacks (namensgebend **Henrietta Lacks**) im Jahr 1951 entnommen wurden. Daraus entwickelten Forscher am Johns Hopkins Hospital in Baltimore die erste erfolgreich in Kultur gehaltene Zelllinie, die seitdem die Grundlage zahlloser wissenschaftlicher Meilensteine war (Lucey et al., 2009).

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in DMEM (engl. „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“) mit GlutaMAXTM (L-Alanyl-L-Glutamin), 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S). Die Zellen wurden in einer kontrollierten Atmosphäre unter 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 37 °C in sterilen 75 cm² Zellkulturflaschen inkubiert. Ein Sicherstellen des Wachstums wurde durch regelmäßiges Ablösen und Ausdünnen („Passagieren“) der adhärent wachsenden Zellen garantiert. Hierzu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche mit einer Glaspipette abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml sterilem PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA (PBS mit 0,05 % Trypsin-EDTA) in die Flasche pipettiert, gleichmäßig verteilt und für ca. 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Inkubation führte die proteolytische Aktivität des Trypsins dazu, dass die Adhäsion zur Kulturflasche, sowie zu den umgebenen Zellen gespalten wird und es zu einer Ablösung und Vereinzelung der Zellen nach leichtem "Klopfen" der Flasche kommt. Die Zellsuspension wurde in 4 ml Medium aufgenommen und davon ausgehend wurde 1 ml der Suspension mit 10 ml frischem Medium verdünnt. Das Passagieren der Zellen wurde jeweils bei ca. 80 % Konfluenz der HeLa-Zellen wiederholt.

3.2.1.2. Langzeitkonservierung von Säugetierzellen und Auftauen aus der Kryostase

Einfrieren von HeLa-Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff

Alle Kryogefäße zum Aliquotieren der Zellen wurden auf Eis vorgekühlt und alle folgenden Schritte wurden auf Eis pipettiert. Die einzufrierenden Zellen wurden geerntet und zu 3×10^6 Zellen für 2 min bei 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 750 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 750 µl der Lösung 2 unter stetem

Schütteln des Reaktionsgefäßes tropfenweise zugegeben. Danach wurden die Röhrchen für mindestens 3 h in die Dampfphase von flüssigem N₂ gebracht, wo sie langsam abgekühlt wurden und schließlich in der Stammkollektion in flüssigem N₂ gelagert wurden.

Lösung 1

DMEM + 40 % FCS

Lösung 2

DMEM + 20 % DMSO

Auftauen von HeLa-Zellen aus der Langzeitlagerung

Die Kryotubes aus der Langzeitlagerung wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in Zellkulturmedium wie unter Kapitel 3.2.1.1 beschrieben aufgenommen. Um noch verbleibendes DMSO aus der Kryokonservierung zu entfernen, wurden die Zellen 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert und anschließend in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit frischen DMEM mit GlutaMAXTM, 10 % FCS und 1 % P/S aufgenommen. Bis zur experimentellen Verwendung der Zellen nach der Kryokonservierung wurden sie regelmäßig für zwei Wochen wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, passagiert.

3.2.1.3. Automatisierte Zellzählung mittels Countess®

Zur Zellzählung wurde ein Aliquot mit 11 µl der geernteten Zellsuspension (siehe Kapitel 3.2.1.5) mit dem gleichen Volumen des Farbstoffes Trypanblau versetzt, gevortext und in die produktspezifischen Einweg-Zählkammern pipettiert. Die Zellzählung erfolgte automatisch, wobei insgesamt 0,4 µl der Zellsuspension automatisiert gezählt wurden, was dem gleichen Volumen von 4 Quadraten zu je 1 mm x 1 mm einer herkömmlichen Zählkammer entspricht (Invitrogen, automated cell counting, manual 18.12.2017). Der Farbstoff Trypanblau färbt spezifisch tote Zellen an, da er die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren kann. Mit dem Anteil der Trypanblau-positiven Zellen errechnet der Computer die Lebendzellzahl der zu bestimmenden Zellsuspension, ebenso wie die Gesamtzellzahl und die Viabilität.

3.2.1.4. Transfektionsmethoden in HeLa-Zellen

3.2.1.4.1. siRNA-vermittelte mRNA Depletion in HeLa-Zellen

Der Begriff siRNA steht für "small interfering RNA" und es wurde erstmals 1998 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt, dass diese doppelsträngigen RNA-Moleküle erfolgreich zur sequenzspezifischen Genstilllegung eingesetzt werden können (Fire et al., 1998). Heute ist der Mechanismus dieser Genstilllegung weitgehend verstanden. So wird die doppelsträngige RNA zunächst von der RNase III "Dicer" in kurze RNA-Duplexe gespalten (Siomi und Siomi, 2009). Dann werden diese Duplexe aufgebrochen und ein einzelsträngiger RNA-Strang, der so genannte "guide strand" wird präferentiell in einen Proteinkomplex, den

sogenannten RISC-Komplex eingebaut (Meister und Tuschl, 2004, Siomi und Siomi, 2009). RISC steht für "RNA-induced silencing complex", welcher die Ziel-mRNA findet (Siomi und Siomi, 2009). Die Endonukleasaktivität des RISC-Komplexes, vermittelt durch Proteine der "Argonaute" Familie, führt dann zur Spaltung der Ziel-mRNA und zur Stilllegung des Gens (Hutvagner und Simard, 2008, Siomi und Siomi, 2009). Die typische Länge einer siRNA, die eine erstaunliche Spezifität aufweist, beträgt ca. 21-28 Nukleotide (Elbashir et al., 2001, Meister und Tuschl, 2004). Als molekularbiologisches Werkzeug tragen siRNAs seit geraumer Zeit zu enormem Erkenntnisgewinn bei und wurden auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die Bedeutung einzelner Proteine durch die gezielte Stilllegung ihres Gens zu untersuchen. Die siRNAs, die für diese Arbeit benutzt wurden, wurden von der Firma Qiagen bezogen, die die Auswahl der für die Sequenz des Zielgens geeigneten siRNAs internen Qualitätsstandards folgen lässt (z.B. GC-Gehalt). Getestet wurden pro Zielgen in der Regel mehrere siRNAs in mehreren Konzentration und für unterschiedliche Inkubationszeiten, wobei der allgemeine Standard zugunsten verringerter „off target“-Effekte darin lag, die geringste siRNA-Konzentration zu verwenden, die zufriedenstellende Depletionsraten aufwies. Die Sequenzen der siRNAs sind in Tabelle 3.1 gemeinsam mit den eingesetzten Konzentrationen aufgeführt.

Zur Transfektion der siRNA in die HeLa-Zellen wurde das Reagenz HiPerFect der Firma Qiagen benutzt, das eine Lipofektion mit kationischen und neutralen Lipiden durch die Bildung von Transfektionskomplexen ermöglicht. Diese Komplexe vermitteln die intrazelluläre Aufnahme und Freisetzung der siRNA.

Für die praktische Durchführung wurden die HeLa-Zellen am Vortrag passagiert, sodass sie am Starttag des Versuches eine ungefähre Konfluenz von 80 % aufwiesen (siehe Kapitel 3.2.1.1). Dieser Schritt stellte eine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsreplikaten her, da sich die Zellen so am Tag des Aussäens immer in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Zellkulturflasche wurde am Starttag des Versuchs, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben geerntet und die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Röhrchen gefüllt. Dieses wurde gevortext und eine Probe daraus wurde wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben automatisiert gezählt. Die Versuche wurden in der Regel in 6 cm-Zellkulturschalen durchgeführt. Für eine Schale diesen Durchmessers wurden für alle 72 h und 96 h dauernden Versuche $0,52 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die Ausnahmen bildeten hier siRNA-vermittelte Genstilllegungen von *SEC61A1* und *SLC35B1*. Da in diesen Fällen das Wachstum durch die jeweilige Proteindepletion beeinträchtigt war, wurden hier $0,6 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Das Gesamtvolumen inklusive den 100 µl des Transfektionsansatzes betrug 4 ml DMEM mit

GlutaMAX™, 10 % FCS und 1 % P/S. Der siRNA-Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

siRNA (10-35 nM, s. Tabelle 3.1)	x µl
HiPerFect	20 µl
OptiMEM	ad 100 µl

Das Transfektionsreagenz HiPerFect wurde als letzte Komponente pipettiert, dann wurde das 1,5 ml-Reaktionsgefäß kurz gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch gleichmäßiges Schwenken verteilt. Die Inkubation erfolgte unter den Standard-Kultivierungsbedingungen für HeLa-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1.1).

Nach 24 h erfolgte eine zweite siRNA Transfektion nach dem oben beschriebenen Schema. Bevor der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert wurde, wurde das Medium abgesaugt und durch 3,9 ml frisches Medium ersetzt.

3.2.1.4.2. Plasmidgetriebene Expression transgener DNA in HeLa-Zellen

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Transfektion, also das Einbringen transgener DNA in die HeLa-Zellen mit Hilfe der Lipofektion erreicht. Sie ist nur eine von mehreren Methoden, die der Manipulierung eukaryotischer Zellen zugunsten der Aufnahme von DNA externen Ursprungs dienen. Bei der Lipofektion bildet die DNA mit dem Transfektionsreagenz Komplexe, die die Passage über die Plasmamembran und somit eine Genexpression der artifiziiell eingebrachten DNA ermöglichen. Die Expression ektopischer DNA in HeLa-Zellen wurde vor dem Hintergrund mehrerer Fragestellungen verwendet, die in Tabelle 3.7 aufgeführt sind.

Tabelle 3.7: Übersicht über die *in vivo* Expressionsversuche verschiedener transgener Proteine in HeLa-Zellen, ihren jeweiligen experimentellen Hintergrund und Versuchsaufbau (Ktr = Leervektor).

Anwendung	Kapitel	Plasmide	µg DNA	Dauer Gesamt-experiment [h]	Dauer Expression vor Ernte [h]
Komplementation	4.1.1.1	• pCMV6-SEC61A1	4	96	66

siRNA-vermittelte <i>SEC61A1</i> Genstilllegung	4.1.1.2 4.1.1.2.1	<ul style="list-style-type: none"> • pCMV6- <i>SEC61A1(V85D)</i> • pCMV6- <i>SEC61A1(Y344H)</i> • pCMV6-IRES- GFP (Ktr) 			
Simultane Expression transgener Komponenten des Sec61-Komplexes	4.1.2.1 4.1.2.2 4.1.2.3	<ul style="list-style-type: none"> • pCMV6-<i>SEC61A1</i> • pCMV6- <i>SEC61A1(V85D)</i> • pCMV6- <i>SEC61A1(Y344H)</i> • pCMV6-IRES- GFP (Ktr) <p>und</p> <ul style="list-style-type: none"> • pCDNA3- <i>SEC61B-IRES- SEC61G</i> • pCDNA3-IRES- GFP (Ktr) 	Je 1,6	48	42
Immunfluoreszenz zur Lokalisierung von SLC35B1	4.2.3.1	pCMV6- <i>SLC35B1-Iso1-GFP</i>	4	24	8
Expression der SLC35B1- Isoformen zur Immunopräzipita- tion potentieller Interaktionspartner	4.2.3.1	pCMV6- <i>SLC35B1-Iso1-MYC-DDK</i> oder pCMV6- <i>SLC35B1-Iso2-MYC-DDK</i>	4	60	48
Komplementation siRNA-vermittelte <i>SLC35B1</i> Genstilllegung	4.2.3.2	pCMV6-ENTRY- <i>SLC35B1-Iso1-MYC-DDK</i> oder pCMV6-ENTRY-	4	96	66

		<i>SLC35B1-Iso2-MYC-DDK</i>			
Nachweis der Funktionalität der <i>SLC35B1</i> siRNA	4.2.2.1	pCMV6-AC- <i>SLC35B1-Iso1-IRES-GFP</i>	4	44/96	18/66
Nachweis der Funktionalität der <i>SLC35B1</i> siRNA	4.2.2.1	pCMV6-ENTRY- <i>SLC35B1-Iso2-MYK-DDK</i>	4	96	66
Expression der ATP _{ER} -Sensors ERAT4.01	4.2.3.2		1	96	24
Expression der ATP _{Cyto} -Sensors ATeam	4.2.3.3		1	96	24

Vor der Transfektion wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit GlutaMAX™, 10 % FCS und 1 % P/S) erneuert. Es wurde folgender Transfektionsansatz pipettiert:

Plasmid-DNA	x µg (siehe Tabelle 3.7)
FuGene®HD	x µl (1:4 Verhältnis DNA:FuGene®HD)
OptiMEM	ad 200 µl

Als letzte Komponente wurde das Transfektionsreagenz direkt in die Flüssigkeit pipettiert und der Ansatz gevortext, bevor er bei RT für 15 min inkubiert wurde. Anschließend wurde er tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Zellkulturschale daraufhin vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden unter den Standardkultivierungsbedingungen für HeLa-Zellen inkubiert (siehe Kapitel 3.2.1.1).

3.2.1.5. Zellernte

Um die HeLa-Zellen nach Beendigung der Manipulationen zu ernten, wurde das Zellkulturmedium aus einer 6 cm Zellkulturschale abgesaugt und restliches Medium mit einem Milliliter PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 µl Trypsin auf dem Zellrasen verteilt und die Schale für ca. 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins mit 750 µl DMEM mit GlutaMAX™, 10 % FCS und 1 % P/S gestoppt und die abgelösten Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die

Zellzahl dieser Suspension wurde mit Hilfe des automatisierten Zellzählers (siehe Kapitel 3.2.1.3) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 3000 rpm (Rotor F45-18-11) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet konnte nun einer Zellextraktaufbereitung unterzogen werden (siehe Kapitel 3.2.1.7)

3.2.1.6. Präparation semipermeabilisierter HeLa-Zellen mittels Digitonin

Die Zellen wurden nach ihrer Manipulation, die sich auf die jeweilige Fragestellung bezog, zunächst geerntet. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Menge an Trypsin, die zugegeben wurde, variierte in Bezug auf die Größe der Kulturflasche. Für eine 75 cm² Flasche wurde 1 ml Trypsin zugegeben, für eine 6 cm-Kulturschale 250 µl Trypsin. Um die Peptidase Trypsin zu inhibieren, wurden pro 250 µl Trypsin 5 µl Trypsin-Inhibitor (TI) benutzt. Dieser wurde in kaltem KHM-Puffer verdünnt und dieser KHM-TI-Mix wurde zur Zellernte benutzt, dabei wurden in Abhängigkeit der Zelldichte etwa 5 ml für bis zu drei 6 cm-Schalen benutzt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen gezählt, um das Volumen an Digitonin zur Permeabilisierung der Plasmamembran zu bestimmen. Dabei wurden pro 1×10^6 Zellen 1,1 µl Digitonin (40 mg/ml) eingesetzt (Wilson et al., 1995).

Danach wurden die Zellen 3 min bei 2000 rpm (Rotor GH-3.8) und 4 °C abzentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde in 6 ml KHM-Puffer resuspendiert. Die berechnete Menge an Digitonin wurde hinzugefügt und die Zellen auf Eis 5 min inkubiert. Währenddessen wurde das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß zur Verdünnung des Digitonins mit 9 ml KHM-Puffer aufgefüllt und 3 min bei 2000 rpm (Rotor GH-3.8) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml HEPES-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Dieser Schritt dient dem Auswaschen des Zytoplasmas. Die Zellen wurden erneut 3 min bei 2000 rpm (Rotor GH-3.8) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl KHM-Puffer aufgenommen und zum Verdau endogener RNA wurde 1 µl Nuklease (4000 u/ml) zusammen mit 0,5 µl CaCl₂ (200 mM) hinzugegeben und 12 min bei RT inkubiert. Um anschließend die Nuklease zu inhibieren, wurden 2 µl EGTA (200 mM) hinzugegeben. Die semipermeabilisierten Zellen wurden danach für 3 min bei 2000 rpm (Rotor GH-3.8) und 4 °C zentrifugiert und in ca. 1 ml KHM/1 x 10⁶ Zellen aufgenommen. Dann wurden die Zellen mehrfach mittels des Countess-Zellzählers (siehe Kapitel 3.2.1.3) vermessen und die genaue Zellzahl zur Berechnung des Volumens an KHM bestimmt. Die Zellzahl wurde auf 4×10^4

Zellen/ μ l eingestellt, wobei das berechnete Volumen das Volumen des Zellpellets einschließen musste.

<u>1 x KHM</u>		<u>HEPES</u>	
KAc	110 mM	KAc	50 mM
MgAc ₂	2 mM	HEPES-KOH, pH 7,2 bei 4 °C	90 mM
HEPES-KOH, pH 7,2 bei 4 °C	20 mM		

Trypsininhibitor (TI) aus der Sojabohne

<u>CaCl₂-Lösung</u>		50 mg/ml in H ₂ O _{bidest} gelöst
CaCl ₂	200 mM	
in H ₂ O _{bidest} gelöst		

Digitonin

40 mg/ml in H₂O_{bidest} gelöst

EGTA-Lösung

EGTA	200 mM
in H ₂ O _{bidest} gelöst	

Nuklease

4000 U/ml S7-Nuklease (Mikrococcus) in H₂O_{bidest} gelöst

3.2.1.7. Herstellung eines Zellextrakts aus HeLa-Zellen

Um die Proteine einer Zelle, die im Rahmen dieser Arbeit die Kernelemente der Forschung darstellten, verschiedenen Analysemethoden zugänglich zu machen, wurde eine sogenannte Zelllyse durchgeführt. Hierfür werden die zuvor nach Kapitel 3.2.1.5 geernteten HeLa-Zellen in Lysepuffer und 5 x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 56 °C inkubiert. Das Volumen an Lysepuffer (4/5) und 5 x Lämmli (1/5) wurde dabei so eingestellt, dass 1 μ l Lysat 1 x 10⁴ Zelläquivalenten entsprach. Anschließend wurde eine Spatelspitze mit Glasperlen zu dem Lysat gegeben und 10 min auf dem Vortexer geschüttelt. Dann wurde das HeLa-Zelllysat weiteren analytischen Methoden wie beispielsweise einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.3.1) unterzogen.

<u>1 x Lysepuffer</u>		<u>PLAC-Lösung</u>	
NaCl	10 mM	Pepstatin A	3 mg/ml
Tris, pH 8,0	10 mM	Leupeptin	3 mg/ml
MgCl ₂	3 mM	Antipain	3 mg/ml
Nonidet-P40	0,5 % (v/v)	Chymostatin	3 mg/ml
PLAC	0,01 ‰ (v/v)	in DMSO	

in H₂O_{bidest}

5 x Lämmli

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

3.2.2. Zellbiologische Analysemethoden

3.2.2.1. Echtzeitverfolgung des HeLa-Zellwachstums mit xCELLigence® RTCA

Der xCELLigence® RTCA-Biosensor des Entwicklers ACEA Biosciences ermöglicht eine Verfolgung der Proliferation der zu analysierenden Zellen in Echtzeit. Das Herzstück der Analyse sind die sogenannten 96 well E-Plates, in die Goldelektroden-Arrays integriert sind (Roche Diagnostics GmbH). Als auslesbares Messsignal dient die elektronische Impedanz der Sensorelektroden der E-Plates, welche sich in Abhängigkeit des Zellwachstums auf den Elektroden verändert und als Maß für Zellproliferation herangezogen werden kann. Die Impedanzveränderung geteilt durch einen Hintergrundwert wird von dem Analyseprogramm RTCA in einen dimensionslosen Messparameter, genannt CI ("cell index"), umgewandelt (Roche Diagnostics GmbH) und dieser CI ist auch der Ausgabeparameter der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente.

Zur praktischen Durchführung des Versuchs wurden HeLa-Zellen wie angegeben manipuliert (siehe Kapitel 3.2.1.4.1) und 24 h nach der zweiten siRNA-Transfektion geerntet (siehe Kapitel 3.2.1.5). Das 96-Well E-Plate wurde mit 100 µl vorgewärmten Medium pro Well befüllt und musste zunächst für die Hintergrundmessung in die Apparatur eingesetzt und ausgelesen werden. Die gezählten HeLa-Zellen wurden in einem Volumen von 50 µl/Well auf verschiedenen Zellzahlen eingestellt. Im Rahmen dieses Versuches wurden die Zellzahlen 1×10^4 , 5×10^3 und $2,5 \times 10^3$ je manipulierter Zellpopulation in Quadriplikaten in das E-Plate ausgebracht nachdem die Hintergrundmessung abgeschlossen war. Über die Steuerungssoftware RTCA ließ sich die Belegung des E-Plates definieren und somit die Messung "live" über einen beliebigen Zeitraum, hier 120 h, beobachten. Die Aufnahme eines neuen Messpunktes erfolgte alle 15 min.

3.2.2.2. Methoden zur Visualisierung der Zellmorphologie

3.2.2.2.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die Zellen, die mittels Immunfluoreszenz analysiert werden sollten, wurden auf 25 mm Deckgläsern ausgesät und gegebenenfalls manipuliert. Zur Erleichterung der Adhärenz der Zellen auf dem Deckglas wurde dieses vor dem Aussäen der Zellen mit 200 µl Poly-L-Lysin überschichtet und für 30 min inkubiert. Danach wurde das Poly-L-Lysin abgesaugt und das Deckglas zweimal mit PBS gewaschen bevor die Zellen darauf ausgesät wurden. Das bewachsene Deckglas wurde nach der Manipulation zum gewünschten Zeitpunkt in eine 3 cm Zellkulturschale, die mit 2 ml kaltem PBS_{IF} befüllt war, überführt. Das PBS_{IF} wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und das Deckglas mit 1 ml PFA-Lösung überschichtet und 20 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Dieser Schritt diente der Fixierung der Zellen. Anschließend wurde die PFA-Lösung entfernt und das Deckglas wurde 4 x für 5 min unter leichtem Kippen und lichtgeschützt zum Abstoppen der Fixierung mit 1 x PBS+ inkubiert. Danach wurden die Zellen permeabilisiert und durch Zugabe von PSS und 50 µg/ml RNase für 1 h für den primären Antikörper zugänglich gemacht. Als nächstes wurde der primäre Antikörper (Sec62 262b affinitätsgereinigt 1:50) in PSS verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt und das Deckglas 2 x für 15 min mit 1x PSS gewaschen. Danach wurde der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (goat anti-rabbit-Alexa594) 1:1000 in PSS verdünnt und für 1 h lichtgeschützt inkubiert. Daran anschließend wurde der Antikörper entfernt und das Deckglas wurde 3 x für 5 min mit PSS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Deckglas entnommen und der verbleibende Puffer vorsichtig entfernt. Abschließend wurde das Deckglas in Mounting Medium (Roti®-Mount FluorCare DAPI) auf einen Objektträger gebracht. Das Mounting Medium enthielt zusätzlich den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der die Zellkerne anfärbt. Der Objektträger wurde zum Aushärten über Nacht lichtgeschützt waagrecht gelagert und danach zur Langzeitlagerung lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

4% PFA-Lösung

16 % PFA (Ampulle) 10 ml
 5 x PBS_{IF} 8 ml
 H₂O_{bidest} ad 40 ml

5 x PBS_{IF} (329 mOs)

Na₂HPO₄ 290 mM
 NaH₂PO₄ 85 mM
 CaCl₂ 415 mM
 pH 7,4 mit HCl

<u>PSS</u>		<u>PBS+</u>	
FCS	5 % (v/v)	Glycin	100 mM
Saponin	0,1 % (v/v)	MgCl ₂	4 mM
in 1 x PBS _{IF}		in 1 x PBS _{IF}	

3.2.2.2.2. SIM-Mikroskopie

Der Begriff SIM-Mikroskopie steht für die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (engl. "structured illumination microscopy") und beschreibt ein Verfahren, das es ermöglicht eine mikroskopische Aufnahme jenseits der Auflösungen durch die Limitierung des Abbeschen Gesetzes zu generieren. Dies ist insbesondere für die Analyse von filigranen biologischen Strukturen wie beispielsweise die retikulären Membransysteme des ER von Bedeutung. Wo sich für die Lichtmikroskopie die Auflösungsgrenze, d.h. die Fähigkeit zwei Punkte noch als getrennte Objekte abzubilden, bei ca. 200 nm bewegt, kann dies bei SIM-Mikroskopie maximal um den Faktor zwei verbessert werden (Heintzmann und Benedetti, 2006, Heintzmann und Ficz, 2006). Das erreicht die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie, wie der Name bereits andeutet, indem die Probe seriell beleuchtet wird, was mit einem Gitter im Anregungsstrahlengang geschieht (Heintzmann, 2003). Die Überlagerung gleichmäßiger Gitter führt zu sogenannten Interferenzen, die ein neues, eigenes Muster zu Tage bringen - ein Effekt, der als Moiré-Effekt bezeichnet wird. Entscheidend ist die Rekonstruktion des hochaufgelösten Bildes aus diesen Interferenzmustern, was ein äußerst rechenintensiver Vorgang ist. Dieser macht es möglich Bilder mit einer Auflösung von ca. 100 nm in x-y Richtung und 300 nm in z-Richtung zu erhalten. Die Aufnahmen wurden am Institut für Physiologie (UdS) von PD Dr. Elmar Krause aufgenommen. Das eingesetzte Mikroskop war das Elyra S.1 der Firma Zeiss und war mit einer Plan-Apochromat Oil DIC Linse mit 63x Vergrößerung und 1.4 Numerischer Apertur (Carl Zeiss) und einer XonEM + 885 EMCCD Kamera (Andor Technology) ausgestattet.

Die Visualisierung der ER-Strukturen wurde mit Fluorophoren verschiedener Wellenlängen erreicht. In Tabelle 3.8 sind die eingesetzten Markerproteine und ihre Fluorophore aufgeführt:

Tabelle 3.8: Übersicht der zur SIM-Mikroskopie eingesetzten Fluorophore.

Immun-fluoreszenz	Transgene Fluoreszenz	Fluorophor	Bemerkungen
Sec62		Anti-Kaninchen-	ER-Markerprotein;

		Alexa594	Sec61-assoziiert
		DAPI	Zellkernfärbung, in Einbettungsmedium integriert
	SLC35B1-GFP	tGFP	Lokalisierung des transgen exprimierten Proteins

3.2.2.2.3. Elektronenmikroskopie (EM)

Entwickelt wurden erste elektronenmikroskopische Verfahren in den 1930er Jahren durch Knoll und Ruska (Knoll M., 1932). Das Bild entsteht bei der Elektronenmikroskopie durch Elektronenbeschuss der Proben mit bestimmter Beschleunigungsspannung, wobei dieser Beschuss im Vakuum erfolgen muss, um eine Ablenkung der Elektronen durch andere Gasmoleküle zu verhindern. In Abhängigkeit der Beschaffenheit des Probenmaterials werden die Elektronen dabei unterschiedlich gebeugt, wodurch ein individueller Energieverlust entsteht, der mit Hilfe geeigneter optischer Systeme und Detektoren die Bildgenerierung erlaubt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HeLa-Zellen 96 h mit SLC35B1-spezifischer siRNA behandelt (siehe Kapitel 3.2.1.4.1) und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht. Die spezifische Probenvorbereitung für die EM, sowie die EM-Mikroskopie wurden durch Dr. Claudia Schirra (Physiologie, UdS) durchgeführt.

3.2.2.3. Methoden zum Studium der zellulären Ca^{2+} -Homöostase

3.2.2.3.1. Setup (Filter, Software, Einstellungen)

Das "Live Cell Calcium Imaging" (zu deutsch: Echtzeitmessungen des Calcium-Ions (Ca^{2+})) beschreibt das bildgebende Verfahren, das die zeitliche und räumliche Auflösung intrazellulärer Ca^{2+} -Fluktuationen ermöglicht. Diese Ca^{2+} -Fluktuationen sind Resultate komplexer intrazellulärer Signalkaskaden, die Ca^{2+} als "second messenger" verwenden. Eine Veränderung des intrazellulären Ca^{2+} -Signals wird durch die Verwendung fluoreszenzbasierter Ca^{2+} -Indikatoren sichtbar gemacht. Letztere verändern nach der Bindung von Ca^{2+} ihre optischen Eigenschaften und können als Folge dessen die Ca^{2+} -Veränderungen in ihrer unmittelbaren Umgebung widerspiegeln.

Die "Live Cell Calcium Imaging"-Versuche wurden am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, unter der freundlichen Betreuung von Prof. Adolfo Cavalié, durchgeführt. Eingesetzt wurde das iMIC-Fluoreszenzmikroskop der Firma TILL photonics

und der Monochromator Polychrome V (TILL photonics). Als Lichtfilterset wurde das Fura-2 Set benutzt und als Objektiv ein Fluor 20x/0,75 M27 (Zeiss). Die Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Software TILLvisION Version 4.5 der Firma TILL photonics und die weitere Datenverarbeitung mit Excel 2007 (Microsoft).

3.2.2.3.2. Cytosolische Ca^{2+} Messungen mit dem Ca^{2+} Indikator Fura-2

Der Ca^{2+} Indikator Fura-2 wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu eingesetzt die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in HeLa-Zellen in Echtzeit fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen (Tsien et al., 1982, Tsien et al., 1985).

Fura-2 ist ein Derivat eines Kationenchelators (BAPTA = 1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N, N, N', N'-Tetraessigsäure) und ist somit in der Lage Ca^{2+} zu binden, wobei die Sättigung mit einer Dissoziationskonstante (KD) von 224 nM angegeben wird (Grynkiewicz et al., 1985). Idealerweise wird ein Ca^{2+} -Indikator gewählt dessen KD in einem intermediären Bereich der zu messenden Ca^{2+} -Konzentration liegt, um die Linearität von Indikatorfluoreszenz und Ca^{2+} -Konzentration zu gewährleisten (Bootman, 2014). Fura-2 ist ein ratiometrischer Farbstoff, was in diesem Fall bedeutet, dass es zwei Anregungswellenlängen gibt, die sich in der Bindung von Ca^{2+} unterscheiden. Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 besitzt ein Anregungsmaximum von 340 nm, wohingegen Ca^{2+} -freies Fura-2 bei 380 nm sein Maximum besitzt (Grynkiewicz et al., 1985). Die Emissionswellenlänge liegt einheitlich bei 510 nm. Ratiometrische Ca^{2+} -Indikatoren bergen die Vorteile, dass das Messsignal unabhängig vom Ausbleichen des Farbstoffs, Fokusverschiebungen und Schwankungen der Laserintensitäten, sowie auch der Beladung der Zellen mit dem Farbstoff ist. Während einer Messung werden also sequentiell Aufnahmen der Emissionen der 340 nm und der 380 nm-Anregungswellenlängen gesammelt. Bis zum nächsten Aufnahmezeitpunkt nach 3 s wird das Anregungslicht abgeblendet, wodurch sowohl ein Ausbleichen des Indikators als auch eine vermehrte UV-Lichtbelastung des biologischen Materials verhindert wird und Aufnahmen über einen längeren Messzeitraum möglich sind. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten der beiden Anregungswellenlängen werden dahingehend transformiert, dass Hintergrundfluoreszenzintensitäten (engl. "background"; "BG") subtrahiert werden. Die ROI (engl. "region of interest") des Hintergrunds wird zu Beginn jeder Fura-2-Messung manuell definiert und nach der Messung innerhalb der Auswertung mit der TillVision-Software als hierfür vorgesehenen BG-ROI definiert.

Die gebildete Ratio (R) von 340 nm/380 nm erfolgt somit nach Subtraktion von BG. Formell gesprochen bedeutet das:

$$R = \frac{F340-F340BG}{F380-F380BG} \quad (1)$$

Diese dimensionslose Fura-2-Ratio (F340/F380) repräsentiert in den durchgeführten "Live Cell Calcium Imaging"-Experimenten die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen der zu untersuchenden Zellen.

Zur praktischen Durchführung eines Ca^{2+} -Imaging Experimentes wurden die HeLa-Zellen auf runde Deckgläser mit 25 mm Durchmesser ausgesät, gegebenenfalls manipuliert und bei 37 °C im Brutschrank bis zum Endpunkt kultiviert. Vorbereitend auf die Ca^{2+} -Imaging Versuche wurde jedes bewachsene Deckglas mit einer sterilen Pinzette in eine 3,5 cm Zellkulturschale mit 1 ml frischem DMEM mit GlutaMAX™, 10 % FCS und 1 % P/S überführt und für 30 min bei RT mit 4 μ M Fura-2-Acetoxymethylester (AM) beladen. Im Anschluss an die Beladung wurde das Deckglas der Zellkulturschale entnommen und in die Aussparung der unteren Messkammer eingesetzt. Der obere Teil der Messkammer mit dem Dichtungsring wurde auf das Gewinde gesetzt und fixiert. Das bewachsene Deckglas wurde vorsichtig zweimal mit 300 μ l ES+EGTA gespült und mit 300 μ l frischer ES+EGTA in den Strahlengang des iMIC-Fluoreszenzmikroskops eingesetzt.

Fura-2 ist als hydrophiles Molekül zellimpermeabel und muss zur erfolgreichen Diffusion durch die hydrophobe Plasmamembran mit der Estergruppe AM fusioniert werden (Fura-2 AM) (Grynkiewicz et al., 1985). Diese AM-Gruppen sind an die vier Carboxygruppen des Fura-2 gebunden, maskieren deren Hydrophilie und werden nach erfolgreicher Diffusion über die Plasmamembran von intrazellulären Esterasen hydrolysiert, wodurch die negativ geladenen Carboxygruppen des Fura-2 wieder zur Interaktion mit Ca^{2+} -Ionen zur Verfügung stehen, aber nun intrazellulär gefangen sind (Tsien, 1981).

<u>External Solution (ES)</u>		<u>Fura-2AM</u>
NaCl	140 mM	1 mM in DMSO
KCl	5 mM	
MgCl ₂	1 mM	<u>ES + EGTA</u>
Glukose	10 mM	ES + 0,5 mM EGTA
HEPES/KOH, pH7,35	10 mM	

3.2.2.3.3. Messprotokolle

1. Mobilisierung des ER-Ca²⁺ Pools mittels Thapsigargin

Thapsigargin (Tg) ist ein Sesquiterpen-Lakton pflanzlicher Herkunft und wurde 1990 von zwei Gruppen als ein Stoff charakterisiert, der sowohl Calcium-Pools entleert, als auch die Wiederaufnahme von Ca²⁺ in das ER verhindert (Thastrup, 1990, Bian et al., 1991). Der Grund hierfür ist eine irreversible Inhibition der SERCA. Somit dient Tg als Werkzeug, um ER-mobilisierte Ca²⁺-Pools zu analysieren.

Hierfür wurden das in die Messapparatur eingeschraubte Deckglas mit den adhärenen HeLa-Zellen, wie oben beschrieben, mit ES + EGTA gewaschen und die Aufnahme des Fura-2-Signals in 300 µl ES + EGTA gestartet. Es wurde eine Gesamtmesszeit von 10 min gewählt, wobei nach 1 min Aufnahmezeit vorsichtig 300 µl der 2-fach-konzentrierten Tg-Lösung auf die Zellen pipettiert wurden (Endkonzentration Tg = 1 µM).

2. Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ durch Ionomycin

Ionomycin (Iono) ist ein divalentes Ca²⁺-Ionophor und führt zur Ca²⁺-Freisetzung aus allen intrazellulären Speichern. Es fand innerhalb dieser Arbeit Anwendung, um den Ca²⁺-Status der behandelten Zellpopulationen zu vergleichen. Die Messungen wurden 5 min durchgeführt, wobei nach 1 min Aufnahmezeit in 300 µl ES + EGTA 300 µl der 2-fach-konzentrierten Ionomycin-Lösung vorsichtig auf die Zellen pipettiert wurden (Endkonzentration Ionomycin = 5 µM).

3. Messungen zur Ermittlung der basalen Ca²⁺-Konzentration und des prä-aktivierten SOCE

Dieses Messprotokoll diente dem Zweck den basalen cytosolischen Ca²⁺-Status der zu analysierenden Zellpopulationen aufzudecken. Hierzu wurden die Zellen zu Beginn der Messung nicht in Ca²⁺-freie Lösung gebracht, sondern in 300 µl ES + 1 mM Ca²⁺, was der physiologischen Ca²⁺-Konzentration des extrazellulären Raums entspricht. Als Gesamtmesszeit wurden 20 min festgesetzt. Nach 5 min Aufnahmezeit wurden 300 µl ES + 1,5 mM EGTA in die Messkammer pipettiert, wodurch die Ca²⁺-Konzentration der Messlösung auf 0 mM gepuffert wurde. Nach weiteren 5 min, was der Hälfte der gesamten Aufnahmezeit entsprach, wurden 300 µl ES + 21 mM CaCl₂ (Endkonzentration Ca²⁺ = 6,5 mM) zu den Zellen pipettiert. Die Höhe des durch die Applikation von Ca²⁺ initiierten Einstroms an Ca²⁺ in das Cytosol gibt Aufschluss darüber, ob die Mechanismen des SOCE in der betrachteten Zellpopulation aktiv sind.

4. Messungen zur Verteilung von Ca²⁺ auf die intrazellulären Ca²⁺ Speicher

Um die Ca²⁺-Konzentration des intrazellulären Hauptspeichers, dem ER, von der weiterer intrazellulären Ca²⁺-Pools, wie beispielsweise dem Mitochondrium, zu unterscheiden, wurde

folgendes Messprotokoll eingesetzt: die Aufnahme des Fura-2-Signals begann in 300 µl ES + EGTA. Nach 1 min wurden 300 µl 2-fach konzentrierte Tg-Lösung in die Messkammer pipettiert (Endkonzentration Tg = 1 µM). Als nächstes wurden nach 14 min 300 µl der 3-fach konzentrierten Ionomycin-Lösung (Endkonzentration Ionomycin= 5 µM) auf die Zellen pipettiert und das Fura-2-Signal wurde über einen Zeitraum von weiteren 15 Minuten aufgezeichnet.

Tg-Stocklösung

1 mM in DMSO

Ionomycin-Stocklösung

10 mM in DMSO

3.2.2.3.4. Datenauswertung und Statistik

Von jeder Zellpopulation unterschiedlicher Behandlung wurden pro Versuchstag mindestens Duplikate in unabhängig behandelten 6 cm-Zellkulturschalen angefertigt. Die bewachsenen Deckgläser daraus wurden in die Messapparatur eingespannt und die Fura-2 Ratios aufgezeichnet (siehe Kapitel 3.2.2.3.2). Die hintergrundkorrigierten Fura-2-Ratios wurden mit Microsoft Excel 2007 tabellarisch gesammelt. Dabei wurden die Daten mehrerer Versuchstage der gleichen Behandlung kumuliert statistisch ausgewertet. Es wurde der ungepaarte t-Test angewendet, welcher prüft, ob sich zwei unabhängige Stichproben anhand ihrer Mittelwerte signifikant voneinander unterscheiden. Die Signifikanzniveaus wurden hierfür wie folgt festgesetzt:

$p \geq 0,05 \triangleq$ n.s. (nicht signifikant)

$p < 0,05 \triangleq$ *

$p < 0,01 \triangleq$ **

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

Bei dem in den Abbildungen angegebenen Fehler handelt es sich um den Standardfehler (SEM engl. "standard error of the mean").

3.2.2.4. Methoden zur Bestimmung des intrazellulären Energiestatus der HeLa-Zellen

3.2.2.4.1. Biolumineszente Detektion von ADP und ATP mit ApoSENSOR

Diese Methode basiert auf der Detektion von Licht, das durch eine Reaktion von ATP und Luciferin freigesetzt wird. Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Assays dieser Art werden dazu genutzt einen Einblick in den Energiehaushalt der Zelle zu gewinnen, da Zellen, die aktiv proliferieren einen hohen ATP-Gehalt aufweisen, verglichen mit

apoptotischen Zellen. Letztere besitzen einen niedrigen ATP-Gehalt, jedoch einen erhöhten ADP-Gehalt. Somit erlaubt der Energiestatus einer Zelle die Abstufung zwischen den Zuständen Proliferation, Wachstumsarrest, Apoptose und Nekrose zu unterscheiden.

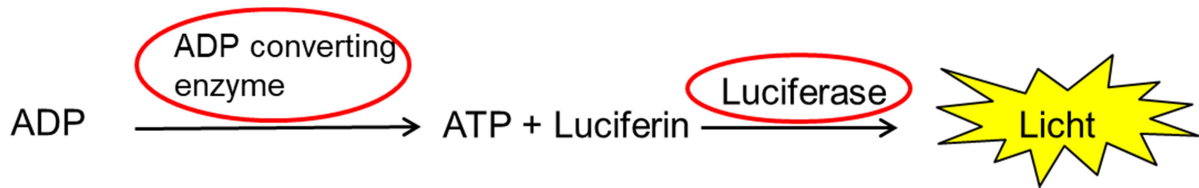


Abbildung 3.1: Funktionsprinzip des ApoSENSOR-Assays zur Detektion von ADP und ATP in Zelllysaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Screening nach ADP und ATP dazu genutzt, den Energiestatus von Zellen, die siRNA-vermittelt eine Depletion des Proteins SLC35B1 aufwiesen mit Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, zu vergleichen. Zum Induzieren der Apoptose wurde Staurosporin in einer Konzentration von 1 μM für 6 h appliziert. Kurz bevor die Zellen zur Durchführung des Assays geerntet wurden, wurden die Zellen mit 2 ml PBS überschichtet und mikroskopische Aufnahmen generiert, um die Morphologie der Zellen zu untersuchen. Anschließend wurden die Zellen geerntet (siehe Kapitel 3.2.1.5) und automatisiert die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.3). Anschließend wurden die Zellen zu 1×10^5 Zellen/ml in 1 x PBS verdünnt und davon ausgehend wurden pro Reaktionsansatz 1×10^4 Zellen abzentrifugiert.

Die Detektion der Lumineszenz erfolgte in einer weißen 96-Well-Platte im Tecan-Reader (Plate Reader Infinite M200) mit den Einstellungen "integration time" 1000 ms. Zunächst wurde der Hintergrund vermessen, wofür 10 μl „ATP monitoring enzyme“ mit 90 μl „nucleotide releasing buffer (NRB)“ als Reaktionsmix in jeweils ein Well pipettiert wurden (A). Als nächstes wurden die abzentrifugierten Zellen in 50 μl NRB resuspendiert und 5 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen zu dem Reaktionsmix pipettiert und durch leichtes Schütteln der Platte gemischt. Nach 2 min wurde die Messung inklusive der Zellen gestartet (B). Dieselbe Reaktion wurde erneut vermessen (C) bevor ein Reaktionsmix aus 1 μl „ADP converting enzyme“ und 9 μl NRB in das Well hinzupipettiert wurden. Die Reaktion wurde erneut durch leichtes Schütteln der Platte gemischt und nach 2 min der Datenpunkt D vermessen. Aus diesen vier Datenpunkten ließen sich der Gehalt an ADP und ATP sowie das Verhältnis beider bestimmen. Dabei galt:

$$\frac{\text{ADP}}{\text{ATP}} = \frac{\text{D}-\text{C}}{\text{B}-\text{A}} = \frac{\text{umgewandeltes ADP-ATP(Zellen)}}{\text{ATP (Zellen)-ATP (Hintergrund)}} \quad (2)$$

Zunächst wurde, wie in Abbildung 3.2, A gezeigt ist, das Grundprinzip des Assays nachvollzogen. Hierzu wurden zwei HeLa-Zellpopulationen miteinander verglichen, die einmal für 6 h mit Staurosporin, einem potenten Induktor der Apoptose (Falcieri et al., 1993), und einmal nur mit dem Vehikel DMSO behandelt wurden. Dabei fiel auf, dass in den Staurosporin-behandelten HeLa-Zellen um ein Vielfaches weniger ADP und zu einem noch größeren Ausmaß auch weniger ATP vorhanden war als in der Kontrollpopulation. Demzufolge stieg der Quotient aus ADP und ATP enorm an, was an der rechten Achse aus Abbildung 3.2, A abzulesen ist. Ein hoher Quotient, d.h. ein Verhältnis von ADP und ATP, das in Richtung ADP verschoben ist zeigt Apoptose bzw. Nekrose an, was sich auch mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.2, B deckt.

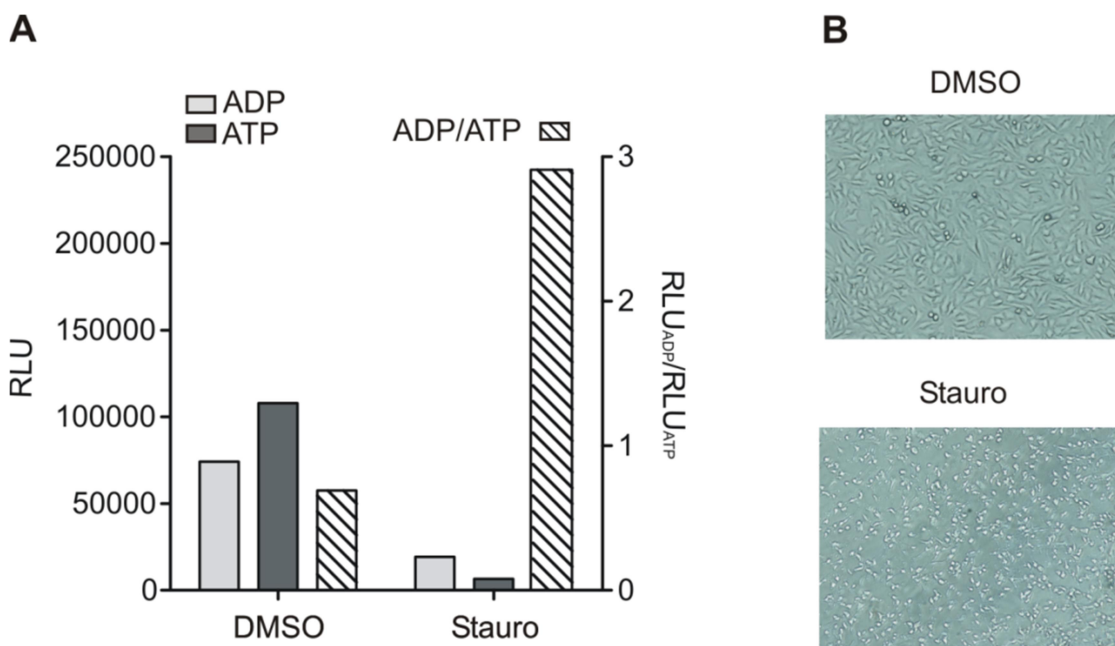


Abbildung 3.2: Bestimmung des intrazellulären ADP- und ATP-Gehaltes mit Hilfe von ApoSensor™. A Kontrolleexperiment mit dem Apoptose-induzierenden Staurosporin (1 μ M) für 6 h. Bestimmt wurde ATP durch die relative Lumineszenz (RLU), die bei der Umsetzung von ATP und Luciferin durch das Enzym Luziferase freigesetzt wurde. ADP wurde in dem Assay durch ein Enzym in ATP umgewandelt, welches dann wieder lumineszent detektiert wurde. Gebildet wurde außerdem die Ratio aus ADP/ATP, die an der rechten Achse abzulesen ist. B Durchlichtmikroskopische Aufnahmen für die Zellen, deren ADP- und ATP-Gehalt in A dargestellt sind. (Stauro = Staurosporin, RLU = "relative luminescence units")

Fraktionierte ADP und ATP Messung in semipermeabilisierten Zellen

Neben dem Energiestatus des gesamten Zelllysats der HeLa Zellen wurde auch getrennt voneinander der Energiestatus der Organellenfraktion und des Cytosols bestimmt. Für die Organellenfraktion wurde je Bedingung in Anlehnung an das Protokoll zur Präparation semipermeabilisierter Zellen 3×10^6 HeLa-Zellen geerntet, in 200 μ l KHM-Puffer (Kapitel

3.2.1.6) resuspendiert und mit Digitonin (1,1 μl pro 3×10^6 HeLa-Zellen) 5 min auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 3 min bei 2000 rpm (Rotor GH-3.8) und 4 °C abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand, der die Fraktion des Cytosols darstellt, wurde abgenommen und das Pellet, die Organellenfraktion, wurde in 200 μl NRB aufgenommen. Die Organellenfraktion wurde 5 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Wie oben beschrieben wurden nun je Bedingung 50 μl pro Einzelmessung und alles in Triplikaten in die 96-Well Platte zu dem Reaktionsmix pipettiert. Die Messung der Datenpunkte A bis D erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.2.4.2. Bestimmung des ATP_{ER} bzw. ATP_{Cyto} -Gehalts in HeLa-Zellen mit Hilfe der FRET-basierten ERAT4.01 bzw. ATeam-Sensoren

Zur Bestimmung des ATP-Gehalts im ER (ATP_{ER}) wurde in der vorliegenden Arbeit der von Vishnu et al. weiterentwickelte Sensor ERAT4.01 verwendet (Vishnu et al., 2014). Dieser wird mit Hilfe der Calreticulin-Signalsequenz gezielt ins ER gelenkt, wo ATP an die integrierte ϵ -Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase von *B. subtilis* bindet und eine konformationelle Änderung des Sensors nach sich zieht (Vishnu et al., 2014). Als Folge treten die beiden Fluorophore eCFP (FRET-Donor) und YFP (FRET-Akzeptor) in räumliche Nähe, wodurch ein FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Signal entsteht (Abbildung 3.3). Zur Berechnung von ATP_{ER} wird folglich die Ratio aus den Fluoreszenzemissionen bei 535 nm (YFP) und 435 nm (eCFP) gebildet. Angeregt wurde der Sensor bei 410 nm.

Auch für die cytosolischen ATP-Messungen (ATP_{Cyto}), wurde der FRET-basierte Energietransfer von CFP auf YFP zur Signalgenerierung eingesetzt. Der Sensor hierbei war ATeam (Imamura et al., 2009).

Zur praktischen Versuchsdurchführung wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen SLC35B1-spezifischen siRNAs transfiziert und für 96 h inkubiert (siehe Kapitel 3.2.1.4.1) und 24 h vor der Messung mit 1 μg des Sensors ERAT4.01 oder ATeam transfiziert (siehe Kapitel 3.2.1.4.2). 8 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf runde Deckgläser mit 25 mm Durchmesser ausgesät. Das „Live Cell ATP Imaging“ erfolgte nach 96 h am Institut für Biophysik durch Katharina Zimmermann (Institut für Biophysik, UDS).

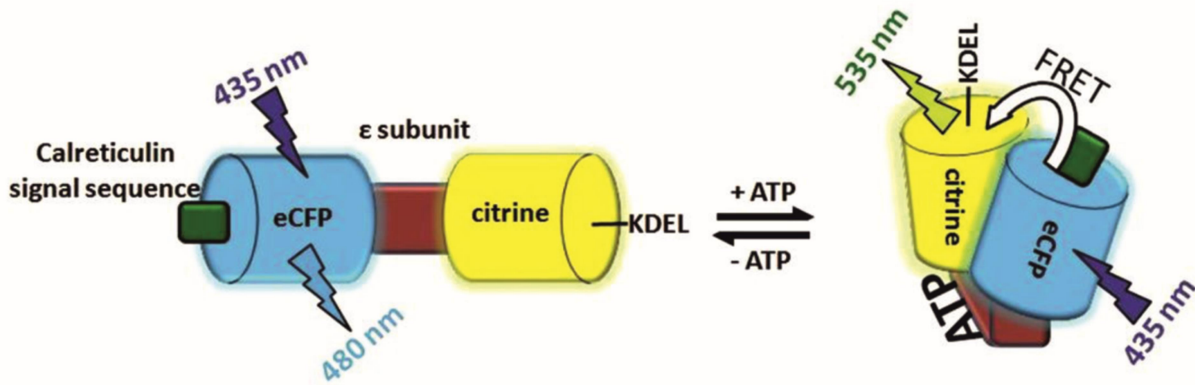


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des ER-spezifischen ATP-Sensors ERAT4.01. Der ATP_{ER}-Sensor wird über die Calreticulin-Signalsequenz ins ER gelenkt und mit Hilfe des ER-Retentionssignals KDEL dort gehalten. Sobald ATP an die integrierte ε-Untereinheit der F₀F₁-ATP-Synthase bindet, treten eCFP und YFP in räumliche Nähe und es kommt zum FRET-Signal, das durch Bildung der Ratio der Fluoreszenzemissionen bei 535 nm und 435 nm die Veränderungen des ATP_{ER}-Gehalts anzeigt (nach Vishnu et al., 2014 mit Erlaubnis von American Society for Cell Biology via Copyright Clearance Center).

3.2.2.4.3. Heterologe Expression und Nukleotid-Import von SLC35B1 in *E. coli*

Die ORFs (engl. „open reading frames“) der humanen SLC35B1-Isoformen wurden mittels Gateway-Verfahren in pET300-Vektoren kloniert (Dr. Patrick Klemens, Pflanzenphysiologie, TU KL) und zur Transformation von Rosetta 2 (DE3) pLysS Zellen (Novagen) eingesetzt. Anschließend wurde die Aufnahme von radioaktivem ATP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$) bzw. ADP ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{ADP}$) in den SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen über einen Zeitraum von 30 min verfolgt und mit nicht-induzierten Zellen verglichen (Klein et al., 2018). Darüber hinaus wurden solche Experimente gekoppelt mit der Applikation eines zehnfachen Überschusses an ungelabeltem ATP, wodurch ein Efflux induziert und der Antiport-Modus analysiert wurde. Die Bestimmung des Antiport-Modus erfolgte auch mit Hilfe von Liposomen, die mit solubilisierten Proteinen der SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen rekonstituiert wurden. Dazu wurden die Proteoliposomen mit ungelabeltem ATP und ADP vorgeladen und der Import von radioaktiv markiertem ATP und ADP verfolgt (Klein et al., 2018). Verglichen wurden letztere mit Proteoliposomen, die keine vorgeladenen Substrate enthielten. Die Herstellung der Liposomen wurde von Dr. Ilka Haferkamp (Pflanzenphysiologie, TU KL) durchgeführt und ist, genau wie die Durchführungen der ATP-Transportassays ausführlich in Klein et al., 2018 beschrieben.

Weiterhin wurden Kompetitionsassays mit nicht-radioaktiv gelabelten Substraten und Effektoren zur Ermittlung des Substratspektrums von SLC35B1 durchgeführt.

Sämtliche *in vitro* Transportstudien von heterolog exprimierten SLC35B1 in *E. coli*-Zellen wurden von Dr. Ilka Haferkamp (Pflanzenphysiologie, TU KL) durchgeführt.

Zur Überprüfung der heterologen Expression von SLC35B1 in *E. coli* wurde außerdem die Membranfraktion aufbereitet (siehe Kapitel 3.2.3.9) und zur SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.3.1) sowie Western Blot (siehe Kapitel 3.2.3.5) eingesetzt.

3.2.2.5. Bestimmung des Apoptose/Nekrose-Status in HeLa-Zellen mit dem RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay

Das Kit der Firma Promega kombiniert die biolumineszente Detektion einer Luziferase-katalysierten Lichtemission als Maß einer frühen Apoptose mit einer fluoreszenzbasierten Detektion sekundärer Nekrose. Zugrunde liegt im Falle der Apoptosedetektion das Auftreten des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Seite der Zellmembran als Folge der gestörten Membranintegrität nach Induktion der Apoptose. Annexin V, das in diesem Assay als Fusionsprotein zweier komplementierender Nano-Luc-Luziferase-Untereinheiten vorliegt, bindet das auf der äußeren Seite der Zellmembran auftretende PS und bringt somit die komplementierenden Domänen der Luziferase in räumliche Nähe. Das in dem Kit ebenfalls vorhandene Substrat der Luziferase wird nun umgesetzt und die emittierte Biolumineszenz dient als Readout. Die sekundäre Nekrose wird innerhalb dieses Assays mit einem DNA-bindenden Farbstoff nachgewiesen, der erst nach Verlust der Zellintegrität Zugang zur DNA erhält.

Für die Durchführung des Assays wird ein 2 x Reaktionsmix hergestellt, der sowohl die beiden fusionierten Annexin V-Luziferase Fusionsproteine, das Luziferase-Substrat, als auch das Nekrosedetektionsreagenz enthält und somit die beiden Readouts vereint. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers jeweils in Triplikaten. Als Positivkontrolle für induzierte Apoptose wurden 500 nM Staurosporin verwendet. Die HeLa-Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.1.4.1 beschrieben in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und mit den jeweiligen siRNAs behandelt (Ktr, SLC35B1-UTR #1, SLC35B1 #4, BiP, Ktr + Stauro, Ktr + DMSO). Nach 48 h bzw. 72 h wurden die einzelnen Zellpopulationen geerntet, gezählt und in die 96-Well Platte ausgesät, so dass sich pro Well 10000 Zellen befanden. Nach dem Anwachsen der adhärennten HeLa-Zellen (ca. 5 h) wurden die Zellen mit dem 2 x Detektionsmix versetzt und die Positivkontrollen mit den Apoptose-induzierenden Agenzien. Außerdem wurde eine Kontrolle ohne Zellen zur Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz mitgeführt. Es wurden schwarze 96-well Platten mit durchsichtigem Boden verwendet (Corning) und die Messungen erfolgten zu definierten Zeitpunkten mit dem Tecan-Reader (Plate Reader Infinite M200) mit den Einstellungen 2000 ms „integration time“ für die Lumineszenz-Messungen bzw. ein manueller Gain von 100 für die Fluoreszenzmessungen mit folgenden Wellenlängen: 485 nm_{Ex}/525 nm_{Em}. Zur Validierung des Assays wurde gezielt mit

Hilfe von Staurosporin die Apoptose in einer Kontrollzellpopulation induziert (Abbildung 3.4, A, rote Linie). Staurosporin ist dafür bekannt einen rein durch Apoptose induzierten Zelltod hervorzurufen, im Gegensatz zu anderen Apoptoseinduzierern, die auch nekrotischen Zelltod auslösen (Falcieri et al., 1993). Erwartungsgemäß ergab sich für Staurosporin-behandelte HeLa-Zellen ein schneller Anstieg der Lumineszenz, der nach ca. 7 h seinen Höchstwert erreichte und fast dreifach erhöht war, verglichen mit der Kontrollpopulation, bestehend aus HeLa-Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden. Die Fluoreszenzmessungen, die nekrotischen Zelltod anzeigten, stiegen im Laufe der Zeit kontinuierlich an und zeigten keine Unterschiede zwischen Staurosporin- oder DMSO-Behandlung (Abbildung 3.4, B).

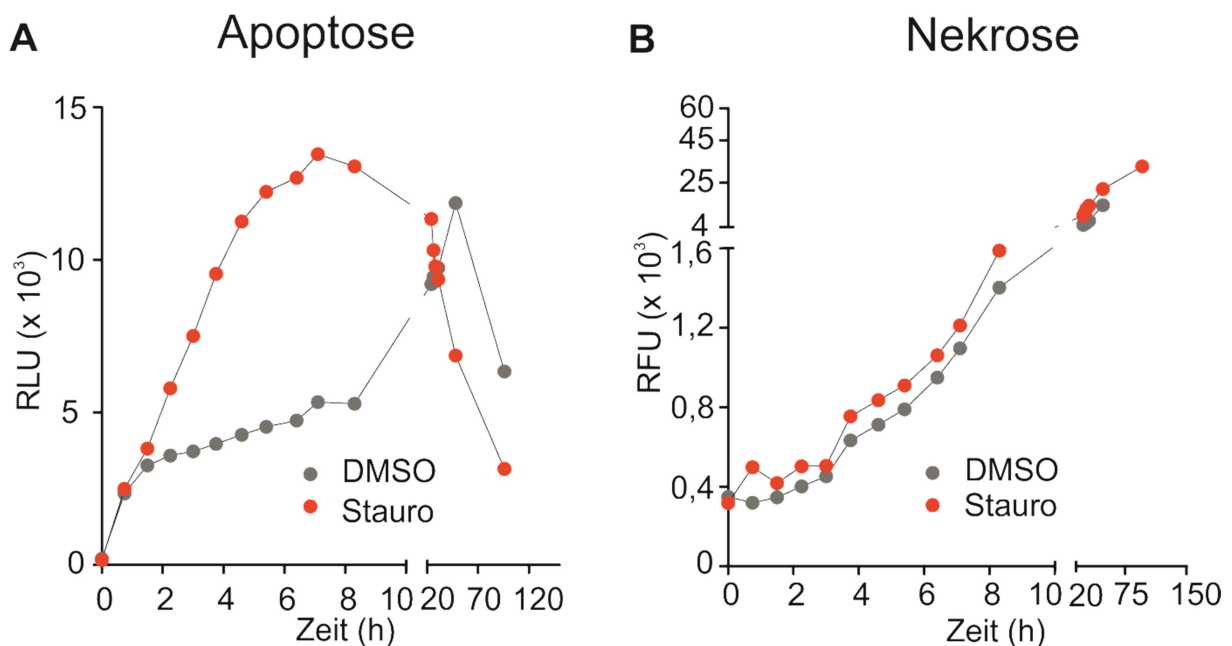


Abbildung 3.4: Kinetische Untersuchungen zu Apoptose und Nekrose in HeLa-Zellen nach Staurosporinbehandlung. A,B Die HeLa-Zellen wurden geerntet, automatisiert gezählt und zu 10000 in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht adhärirt waren, wurde das Apoptose/Nekrose-Reagenz, sowie DMSO und zur Induktion der Apoptose Staurosporin (EK 500 nM) appliziert. Alle 45 min wurde die Lumineszenz (Apoptose, A), sowie die Fluoreszenz (Nekrose, B) der Zellen mit Hilfe des Tecan infinite M200 ausgelesen. (EK = Endkonzentration, Stauro = Staurosporin, RLU = "relative luminescence units", RFU = "relative fluorescence units")

3.2.3. Methoden der Proteinbiochemischen Analytik

3.2.3.1. Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteingemischen basierend auf ihrer unterschiedlichen molekularen Masse. Als Trennmatrix dient ein chemisch inertes Polyacrylamidgel, das je nach Bedarf an die Porengröße der Gelmatrix durch Anpassung der Prozentigkeit an Polyacrylamid variiert werden kann. Da das Molekulargewicht nativ

gefalteter Proteine nicht von Nettoladung und molekularem Radius anhängig ist, bedient man sich bei der SDS-Page einer vereinheitlichenden Methode: die Proteingemische werden vor ihrer Trennung in der Gelmatrix mit dem Detergens SDS versetzt und somit einheitlich negativ geladen. Dies erfolgt in einem Schritt, bei dem die aufzutrennenden Proteingemische mit einem SDS-Probenpuffer versetzt werden, der weiterhin ein reduzierendes Agens für Disulfidgruppen, wie β -Mercaptoethanol, enthält. In diesem sogenannten Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) werden die Proteine bei 56 °C für 10 min erhitzt und erfahren dadurch eine vollständige Denaturierung ihrer tertiären und quartären Struktur. Das Molekül SDS lagert sich hierbei in einem Verhältnis von 1,4 g SDS/1 g Protein an das lineare Protein an, maskiert somit die intrinsischen Ladungen des Proteins und verleiht eine uniforme negative Ladung. Diese einheitlich negative Ladung ermöglicht die Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele zur Gelelektrophorese benutzt. Ihre Diskontinuität bezieht sich auf die unterschiedlichen Gelsysteme von Trenn- und Sammelgel bezüglich pH-Wert und Polyacrylamidkonzentration. Bei der Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten mit einem Abstandhalter für eine Dicke des Gels von 0,1 cm nach unten mit einem Bodengel, bestehend aus 2 % Agar, abgedichtet. Als nächstes wurde das Trenngel (höherer pH-Wert, höhere Polyacrylamidkonzentration verglichen mit dem Sammelgel) zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Das Trenngel entsprach ungefähr 3/4 der Gesamthöhe des Gels. Die Prozentigkeit des Polyacrylamids variierte je nach gewünschter Trennung in bestimmten Molekulargewichtsbereichen zwischen 10 % und 17,5 %. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde hierauf ein Sammelgel gegossen, in das auch ein sogenannter Kamm mit Aussparungen für den späteren Probenauftrag integriert wurde. Vor dem Auftragen der Proben, die wie unter Kapitel 3.2.1.7 beschrieben vorbereitet wurden, wurde der Kamm entfernt und die das Gel enthaltenden Glasplatten wurden in die Elektrophoresekammer überführt. Diese wurde mit 1 x Elektrophoresepuffer auf Anoden-, sowie Kathodenseite gefüllt und die Proben anschließend auf das Gel geladen. Das Sammelgel, durch das die Proteingemische nach Anlegen einer konstanten Stromstärke als erstes in Richtung Anode migrieren, dient dem Zweck die Proteine zu konzentrieren und zu fokussieren bevor sie im Trenngel die hauptsächliche Trennung nach Molekulargewicht erfahren. Die Gesamtgröße des Gels betrug 14 cm Breite x 11 cm Höhe. Für diese Trennstrecke wurde die Elektrophorese entweder für 3 h mit 40 mA oder über Nacht bei 5 mA durchgeführt. Um den aufgetrennten Proteinen ihr Molekulargewicht zuzuweisen, wurde der kommerziell erhältliche Proteinmarker PageRuler von Fermentas zusammen mit

den Proben in der SDS-Page aufgetrennt. Dieser enthält angefärbte Proteine definierten Molekulargewichts zwischen 10 kDa und 180 kDa. In der folgenden Tabelle 3.9 sind die Pipettierschemata für Trenn- und Sammelgele aufgeführt.

Tabelle 3.9: Pipettierschema für die Herstellung von Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE.

Lösung	Trenngel				Sammelgel
	10%	12,50%	15%	17,50%	
Acrylamidkonzentration	10%	12,50%	15%	17,50%	5%
40 % (w/v) Acrylamid (ml)	3,75	4,7	5,6	6,6	0,9
2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	1	1,25	1,5	1,8	0,2
H ₂ O _{bidest.} (ml)	4,05	2,9	1,7	0,4	5,0
1,875 M Tris/HCl pH 8,8 (ml)	6				-
1 M Tris/HCl pH 6,8 (ml)	-				0,9
10 % (w/v) SDS (µl)	150				72
TEMED (µl)	5				10,5
20 % (w/v) AMPS (µl)	45				67,5
Gesamtvolumen (ml)	15				7,2

1 x Elektrophoresepuffer

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

3.2.3.2. Harnstoff-SDS-Polyacrylamidelektrophorese (HS-SDS-PAGE)

Die Harnstoff-SDS-PAGE wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Auftrennung von Proteinen kleinen Molekulargewichts benutzt (Präproapelin, Sec61β). Die Verwendung von Harnstoff (HS) stabilisiert Gele mit höheren Acrylamidkonzentrationen, die in diesem Falle 19,4 % betrug. Das Pipettierschema für HS-Trenn- und Sammelgele ist in

Tabelle 3.10 aufgelistet.

Tabelle 3.10: Pipettierschema für die Herstellung von HS-Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE (HS = Harnstoff).

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

Das Gießen der Gele erfolgte in Analogie zu Kapitel 3.2.3.1 Die in die Elektrophoresekammern eingespannten HS-Gele wurden mit 1 x HS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese wurde für 8 h bei 20 mA oder über Nacht bei 5 mA durchgeführt.

1 x HS-Elektrophoresepuffer

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

3.2.3.3. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, kommt die Färbemethode mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliantblau zum Einsatz. Die Färbelösung besteht aus einem Gemisch aus Coomassie R-250 und G-250. Die beiden Farbstoffe interagieren mit den Seitenketten basischer Aminosäuren und färben diese somit an. Zum Färben wird die Coomassie-Lösung für 1 h mit dem SDS-Gel unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgt die Entfärbung zunächst in Entfärber I für 15 min, wonach erste Bandenmuster in Erscheinung treten. Zur Entfärbung des Hintergrunds wird das

Gel danach bis zur gewünschten Entfärbung in Entfärber II inkubiert, wobei diese Lösung währenddessen mehrfach gewechselt wird. Zur Digitalisierung wurde das entfärbte Gel mit dem Image Scanner III (GE) und dem Programm LabScan eingescannt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe der ImageQuant Software.

<u>Coomassie-Färbelösung</u>		<u>Entfärber I</u>	
Coomassie-Brilliantblau R 250	0,2 % (w/v)	Methanol	40 % (v/v)
Coomassie-Brilliantblau G 250	0,005 % (w/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)	Glycerin	2 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)		
<u>Entfärber II</u>			
Methanol	10 % (v/v)		
Essigsäure	5 % (v/v)		
Glycerin	2 % (v/v)		

3.2.3.4. Fixieren von SDS-Polyacrylamidgelen und Trocknen

Nach der SDS-Page wurden die Gele für 30 min in der entsprechenden Lösung fixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 min in der Neutralisationslösung. Danach wurden die SDS-Gele auf ein feuchtes Whatman-Papier gelegt und nach oben mit Folie bedeckt. Die Gele wurden ca. 90 min mittels Vakuumpumpe und heizbarem Trockner getrocknet und anschließend zur Exposition auf Europium-Platten aufgelegt und in die dafür vorgesehenen Kassetten fest eingespannt.

<u>Neutralisierungslösung</u>		<u>Fixierlösung</u>	
Methanol	50 % (w/v)	Methanol	40 % (v/v)
Glycerin	1 % (w/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
		Glycerin	2 % (v/v)

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

Bei einem Western Blot werden die zuvor mittels SDS-Page (siehe Kapitel 3.2.3.1) aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Elektrophorese auf eine Trägermembran, in diesem Falle eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran der Porengröße 0,45 µm übertragen (Gultekin und Heermann, 1988). Die Methode ermöglicht es die ihrer Größe nach aufgetrennten Proteingemische einer immunologischen Detektion zu unterziehen und somit

das Proteom verschiedener Zellpopulationen auf spezielle Proteine hin zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Arten des Western Blots benutzt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Tank Blot

Bei dem hier verwendeten System der "Trans-Blot™ Cell-Apparatur" der Firma Biorad erfolgte die Elektrophorese senkrecht zu dem Polyacrylamidgel. Dieses wurde auf ein in 1 x Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt, das auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten war. Die PVDF-Membran wurde vor Gebrauch kurz in Methanol getränkt, um die Hydrophobie des PVDF zu mindern. Anschließend wurde sie auf das Polyacrylamidgel gelegt. Als nächstes wurde wieder ein getränktes Whatman-Papier aufgebracht. Jeweils nach außen schlossen nach beiden Seiten in 1 x Transferpuffer getränkte Schwämme das sogenannte "Sandwich" ab, welches dann in die eigens hierfür vorgesehene Kassette gespannt wurde. Diese wurde in die Apparatur eingesetzt und die Trans-Blot-Kammer wurde vollständig mit 1 x Transferpuffer (ca. 2,5 l) aufgefüllt. In der Blotkammer befand sich zusätzlich eine wasserführende Kühlschleife, die einem Überhitzen des Western Blots vorbeugte. Die Elektrophorese erfolgte für mindestens 3 h bei 400 mA. Die negativ geladenen Proteine wandern hierbei in Richtung Anode auf die PVDF-Membran, auf der sie durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen arretiert werden.

1 x Transferpuffer

Glycin	96 mM
Tris	12,4 mM

Semi Dry Blot

Beim Semi Dry Blot (System der Firma cti) ist das SDS-Polyacrylamidgel waagrecht zu Anode und Kathode ausgerichtet und auch die Zusammensetzung und das geringe Volumen des 1 x Transferpuffer unterscheiden sich zum Tank Blot. Die Kathode wurde dünn mit 1 x SD-Transferpuffer benetzt und in 1 x SD-Transferpuffer getränktes Whatman-Papier aufgelegt. Hierauf wurde die in Methanol getränkte PVDF-Membran und dann das SDS-Polyacrylamidgel geschichtet. Es folgte eine weitere Schicht Whatman-Papier und dann wurde der Semi Dry Blot geschlossen indem die Anodenseite aufgelegt wurde. Pro cm² Gel wurde eine Spannung von 0,8 mA für 2-3 h angelegt.

1 x SD-Transferpuffer

Glycin	150 mM
Tris	20 mM

MeOH 20 %

Nachdem der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran abgeschlossen war, wurde die Membran mit den übertragenen Proteinen mit einer proteinhaltigen Lösung (1 x Blotto) inkubiert. Dieser Schritt diente der Absättigung der unspezifischen Membranbindungsstellen und wurde entweder 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

<u>1 x Blotto</u>		<u>1 x TBS</u>	
Magermilchpulver	5 % (w/v)	NaCl	150 mM
in TBS-T		Tris/HCl, pH 7,4	10 mM

1 x TBST
 TritonX-100 0,05 % (v/v)
 in TBS

3.2.3.6. Immunologische Detektion von Proteinen

Bei der immunologischen Detektion von Proteinen macht man sich die hoch affine Antigen-Antikörperbindung zu Nutze. Polyklonale Antikörper können durch Hervorrufen einer Immunreaktion bei einem geeigneten Versuchstier (z.B. Maus, Kaninchen) in Folge der Immunisierung mit einem Antigen hergestellt werden. Hierzu beobachtet man die Immunreaktion des Versuchstiers über einen längeren Zeitraum, indem man das Antiserum des Tieres als primären Antikörper auf das gewünschte Zielprotein testet. Diese polyklonalen Antiseren beinhalten sehr viele verschiedene Antikörper gegen die antigenen Determinanten des Antigens. Viele der in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper wurden institutsintern durch Prof. Dr. Martin Jung in dem Versuchstier Kaninchen hergestellt (Tabelle 3.5). Neben diesen polyklonalen Antikörpern, die im Rahmen der Immunreaktion einer Vielzahl von Immunzellen entstammen, besteht die Möglichkeit Antikörper monoklonal, also gegen ein einziges Epitop gerichtet, herzustellen.

Der Antikörper, der direkt das gewünschte Epitop erkennt, wird im Rahmen der immunologischen Detektion primärer Antikörper genannt. Er wurde laut Tabelle 3.5 in 1 x Blotto (siehe Kapitel 3.2.3.5) verdünnt und entweder 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit der PVDF-Membran unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x für jeweils 10 min unter leichtem Schütteln mit 1 x TBST (siehe Kapitel 3.2.3.5) gewaschen.

Um die immunologische Reaktion des primären Antikörpers und seines Antigens sichtbar zu machen, bedient man sich eines sogenannten sekundären Antikörpers, der die konstante

Region des primären Antikörpers erkennt. Der sekundäre Antikörper ist beispielsweise gekoppelt mit dem Enzym Peroxidase, das die Umwandlung von einem Substrat wie Luminol vermittelt und durch die daraus resultierende Chemilumineszenz nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit den sekundären Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und die spezifischen Wellenlängen dieses Farbstoffs mit einem geeigneten Imager zu detektieren.

Der sekundäre Antikörper wurde in Analogie zum primären Antikörper in 1 x Blotto verdünnt und für 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit der PVDF-Membran inkubiert. Danach wurde der Western Blot chemilumineszent detektiert. Benutzt wurde in der Regel das „SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate“ der Firma Thermo Fisher (Alternativ für SLC35B1 SuperSignal West Femto). Dieses besteht aus zwei Komponenten, dem Substrat(+ Enhancer) und dem Peroxidase-Puffer. Beide Komponenten werden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt und auf den gewaschenen und mit sekundärem Antikörper inkubierten Western Blot aufgebracht. Letzterer wird zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und mit Hilfe des Fusion SL Imager detektiert. Zur Aufnahme und Prozessierung der Daten wurde das Programm Fusion der Firma Invitrogen benutzt.

Wenn als sekundärer Antikörper ein fluoreszenzgekoppelter Antikörper benutzt worden war, erfolgten alle folgenden Schritte lichtgeschützt und die Membran wurde nach dem dritten Waschschrift in 1x TBST lichtgeschützt getrocknet und danach mit Hilfe des TyphoonTrio detektiert.

3.2.3.7. Immunpräzipitation

Die HeLa-Zellen mit ihrer an die Fragestellung angepassten Manipulation wurden geerntet wie in Kapitel 3.2.1.5 beschrieben und in 15 ml-Reaktionsgefäßen bei 1000 rpm (Rotor GH-3.8) für 3 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert, wobei pro 2×10^6 Zellen 100 µl Lysepuffer (inklusive 0,1 mM PMSF und 1:2000 PLAC) verwendet wurden. Die Zellsuspension wurde in ultrazentrifugationsstabile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zur Zellyse für 45 min bei 4 °C und geschüttelt. Anschließend wurden die lysierten Zellen in der Optima MAX-E Ultrazentrifuge (Rotor TLA100.3) für 25 min bei 68000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert. Von dem Überstand wurden i.d.R. 2×10^5 Zelläquivalente zur späteren Analyse entnommen (Proben vor IP) und der Rest der Zellyse im gleichen Volumenverhältnis mit der äquilibrierten Affinitätsmatrix zusammengebracht und ü. N. bei 4 °C gerollt.

Als Affinitätsmatrix wurde das „anti-FLAG M2 affinity gel“ von Sigma verwendet. Es wurde 1/10 des Volumens an eingesetztem Lysepuffer, mindestens jedoch 50 µl mit abgeschnittener

Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 2000 rpm (Rotor F45-24-11) und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das "affinity gel" wurde in Lysepuffer äquilibriert, wobei das gleiche Volumen an Lysepuffer wie bei dem Zellpellet eingesetzt wurde.

Die Immunpräzipitation wurde danach bei 2000 rpm (Rotor F45-24-11) und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde gelagert (Probe nach IP). Die Affinitätsmatrix, an die nun die FLAG-getaggten Proteine des Lysats gebunden waren, wurde dreimal gewaschen, indem das Gel jeweils mit 200 µl Lysepuffer für 5 min bei 4 °C gerollt und anschließend für 2 min bei 2000 rpm (Rotor F45-24-11) und 4 °C abzentrifugiert wurde. Die Überstände wurden jeweils abgenommen und gelagert (W1-W3). Die anschließende Elution erfolgte kompetitiv mit einem FLAG-Peptid (5 mg/ml). Hierzu wurden 50 µl des FLAG-Peptids auf das Gel gegeben und damit 5 min bei 4 °C gerollt und anschließend für 2 min bei 2000 rpm (Rotor F45-24-11) und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (E1). Diese Elution der Proteine von der Affinitätsmatrix wurde weitere zwei Male wiederholt (E2, E3). Weiterhin besteht die Möglichkeit die Eluatfraktionen zu vereinigen und mittels Trichloressigsäure (TCA) die enthaltenen Proteine zu fällen und somit zu konzentrieren. Hierzu wurde 50 % TCA den vereinigten Eluatfraktionen im Verhältnis 1:4 zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die gefällten Proteine für 25 min mit 13200 rpm (Rotor F45-24-11) und bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem Aceton resuspendiert. Anschließend wurde die Fällung für 30 min bei -20 °C inkubiert und danach 20 min mit 13200 rpm (Rotor F45-24-11) bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vollständig getrocknet bevor es in 1x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 56 °C erhitzt wurde.

Abschließend wurde das verbleibende Matrixgel mit 1 x Lämmli-Puffer für 10 min bei 56 °C erhitzt. Die Analyse der Immunpräzipitation erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel Kapitel 3.2.3.1) und anschließender Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 3.2.3.3) sowie Western Blot (siehe Kapitel 3.2.3.5) und immunologischer Detektion mit spezifischen Antikörpern (siehe Kapitel 3.2.3.6).

<u>1 x Lysepuffer</u>		<u>1 x Lämmli-Puffer</u>	
Hepes/KOH, pH 7,5	20 mM	Tris/HCl, pH 6,8	60 mM
KCl	400 mM	Glycerin	10 % (v/v)
MgCl ₂	2 mM	SDS	2 % (w/v)
EDTA	1 mM	β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
DTT	2 mM	Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Glycerin	30 % (v/v)
CHAPS	0,65 % (w/v)

3.2.3.8. Massenspektrometrische Analyse zur Bestimmung des SLC35B1-Interaktoms

3.2.3.8.1. Fixieren und Färben von SDS-Gelen mit kolloidalem Coomassie zur Vorbereitung der MS

Im Vergleich mit löslichem Coomassie (siehe Kapitel 3.2.3.3) ist es möglich mit kolloidalem Coomassie eine Erhöhung der Färbesensitivität von Proteinbanden, sowie eine Vereinbarkeit mit einer massenspektrometrischen Analyse zu erreichen. Hierzu wurden die TCA-gefällten Eluate der Co-Immunopräzipitation auf ein 10 % „MINI-PROTEAN®“ (Biorad) aufgetragen und für 5 min bei 200 V in 1 x Elektrophoresepuffer (Kapitel 3.2.3.1) aufgetrennt. Dann wurde das Gel in der Fixierlösung für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal mit H₂O_{bidest} gewaschen und anschließend mit der kolloidalen Coomassie-Lösung überschichtet. Die Inkubationszeit des SDS-Gels mit der Färbelösung muss hierfür auf ca. 12 h verlängert werden. Die Entfärbung des Gels erfolgte mit H₂O_{bidest} bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden. Der Hintergrund des Gels verbleibt bei der kolloidalen Coomassie-Färbung hellblau.

<u>Kolloidale Coomassie-Färbelösung</u>		<u>Fixierlösung</u>	
Coomassie-Brilliantblau G 250	0,12 % (w/v)	Ethanol	40 % (v/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)	Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)		
Phosphorsäure	10 % (v/v)		

Die gefärbten Proteinbanden wurden anschließend aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) analysiert. Alle Schritte der Probenvorbereitung der ausgeschnittenen Proteinbanden für die MS, sowie deren praktische Durchführung wurden durch Dr. Claudia Fecher-Trost (Pharmakologie, UdS) anhand zuvor etablierter Methoden durchgeführt (Fecher-Trost et al., 2013).

3.2.3.9. Membranreicherung aus *E. coli*-Rosetta

Die Anzucht der SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen des Stammes Rosetta wurde in der AG Neuhaus, Pflanzenphysiologie der TU Kaiserslautern durchgeführt. Das daraus resultierende abzentrifugierte Zellpellet wurde nach folgendem Protokoll aufgearbeitet.

Das Pellet aus 500 ml Kultur wurde auf Eis aufgetaut und mit 40 ml BBM-Puffer resuspendiert. Zu der Zellsuspension wurde PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Dann wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Zellpellet bei 37 °C im Wasserbad zügig aufgetaut und mittels Ultraschallsonde aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde hierzu ständig auf Eis gehalten und dreimal für 1 min sonifiziert. Zwischen den jeweiligen Intervallen wurde eine Pause von 1 min eingehalten, in der die Probe wieder abkühlen konnte. Nach dem erfolgreichen Zellaufschluss, aus dem das Lysat als klare Flüssigkeit hervorging, wurde Letzteres mit 3200 rpm (Rotor F45-24-11) für 2 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der aus diesem Zentrifugationsschritt resultierende Überstand enthielt die löslichen Proteine und die Membranen der *E. coli*-Zellen und ist somit die Fraktion, die weiter aufgereinigt wurde. Hierzu wurde der Überstand in Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 min bei 54000 rpm (Rotor ML-80) (100000 g) und 4 °C in der Ultrazentrifuge Optima MaxE-ML-80 zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das bräunliche Pellet in BBM-Puffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Die Proteinkonzentration dieser Membranfraktion wurde mittels Bradford-Bestimmung (siehe Kapitel 3.2.3.10) ermittelt.

<u>BBM-Puffer</u>		<u>PMSF</u>
Tris, pH 8,0	10 mM	100 mM in EtOH
EDTA	1 mM	

3.2.3.10. Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Dem Bradford-Test zur Bestimmung einer Proteinkonzentration liegt eine Änderung des Coomassie brilliant blue G-250 Absorptionsspektrums vor und nach Bindung an Proteine (hauptsächlich basische und aromatische Aminosäuren) zugrunde. Proteingebunden absorbiert der Farbstoff bei 595 nm, was auch der Messwellenlänge entspricht (Bradford, 1976). Die Proteinlösung wird in mehreren Verdünnungen in dem entsprechenden Puffer aufgenommen und in einer 1 ml-Einweg-Küvette mit 200 µl des Reagenz (BioRAD) gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wird die Küvette in den Strahlengang eines Photometers gestellt und bei 595 nm vermessen. Weiterhin wird ein Leerwert mit 200 µl Reagenz und 800 µl Puffer mitgeführt. Als Standard diente jeweils eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen von BSA (bovines Serumalbumin). Alle Messwerte wurden dreifach bestimmt. Der Standard wurde zusammen mit den zu bestimmenden Proteinlösungen

vermessen und in einem Diagramm aufgetragen. Ausgehend von der Geradengleichung der Kalibriergerade lässt sich die unbekannte Konzentration der Proteinlösungen ermitteln.

3.2.3.11. *In vitro* Proteinsynthese

3.2.3.11.1. *In vitro* Transkription mit SP6 oder T7 RNA-Polymerase

Bei der *in vitro* Transkription wird unter Zuhilfenahme einer plasmidkodierten DNA als Grundlage und eines viralen Promotors, im Falle der hier benutzten Konstrukte SP6 und T7, im Reagenzglas ein Transkript mit substituierten Bestandteilen der physiologischen Transkriptionsmaschinerie synthetisch erzeugt. Die Plasmide, die für die eingesetzten Substrate kodieren sind in Tabelle 3.4 mit der Information über die zugehörigen Promotoren aufgeführt. Der Pipettieransatz zur *in vitro* Transkription ist folgender:

Prämix A	30 µl
m ⁷ GpppG solution	2,5 µl
Rnasin (40 U/µl)	1,5 µl
SP6/T7 Polymerase (20 U/µl)	1 µl
DNA	1 µg
<hr/>	
H ₂ O _{dest}	ad 50 µl

Der Transkriptionsansatz wird für 3 h bei 40 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend zur *in vitro* Translation benutzt. Zur längeren Lagerung wurden die Transkripte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>Prämix A</u>		<u>10 x Salzlösung</u>	
Salzlösung	10 % (v/v)	MgAc ₂	60 mM
BSA	0,1 mg/ml	HEPES/KOH, pH 7,4	400 mM
DTT	10 nM		
Nukleotidmix	0,5 mM	<u>m⁷GpppG-Lösung</u>	
GTP	0,1 mM	m ⁷ GpppG	5 U
		in 300 µl 10 mM HEPES/KOH, pH 7,4	

Nukleotidmix

ATP, CTP, UTP	jeweils 50 mM
HEPES/KOH, pH 7,4	10 mM

3.2.3.11.2. *In vitro* Translation und gleichzeitige radioaktive Markierung mit ^{35}S

Als geeignetes Werkzeug zur *in vitro* Translation haben sich Kaninchen-Retikulozyten etabliert, da sie viele Vorteile besitzen, die eine Translation unter kontrollierten Bedingungen zulassen. Bei Retikulozyten handelt es sich um Vorläufer-Erythrozyten, die bereits im Zuge ihrer Reifung sämtliche Organellen, mithin auch den Nukleus, abgestoßen haben. Dies hat zur Folge, dass Retikulozyten arm an endogener DNA sind. Zum Einsatz kam im Rahmen dieser Arbeit das "Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated" der Firma Promega, das mit der Nuklease S1 behandelt ist, was einen Verdau endogener mRNAs sicherstellt und zusammen mit dem natürlicherweise Vorhandensein von Ribosomen, tRNAs, Proteinen sowie Elongations- und Terminationsfaktoren ein ideales System für die Translation der hergestellten Transkripte (siehe Kapitel 3.2.3.11.1) darstellt.

Zur radioaktiven Markierung wurde [^{35}S] markiertes Methionin zur Verfügung gestellt zusammen mit einem unmarkierten Aminosäuremix ohne Methionin. Ein Translationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Retikulozytenlysat	12,5 μl
AS-Mix ohne Methionin	0,5 μl
[^{35}S] - Methionin (1000 Ci/mmol)	1 μl
RNasin (40 U/ μl)	0,5 μl
mRNA	1 μg
<hr/>	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	ad 25 μl

3.2.3.11.3. *In vitro* Transport unter co- und posttranslationalen Bedingungen

Natürlicherweise existieren zwei Modi des Polypeptidimports in das ER, bei gleichzeitiger Translation (cotranslational) oder nach abgeschlossener Polypeptidsynthese (posttranslational). Experimentell können beide Modi *in vitro* rekonstruiert werden. Als ER-Äquivalente wurden semipermeabilisierte Zellen (SP-Zellen) eingesetzt, die aus zuvor manipulierten HeLa-Zellen mittels Digitoninbehandlung (siehe Kapitel 3.2.1.6) präpariert wurden. Im Falle von Substraten, deren Transport in diesen SP-Zellen unter cotranslationalen Bedingungen erfolgen sollte, wurde die in Kapitel 3.2.3.11.2 beschriebene *in vitro* Translation mit dem *in vitro* Transport gleichzeitig durchgeführt. Hierzu wurde dem Translationsansatz eine bestimmte Menge an SP-Zellen (6-32 %, siehe Tabelle 3.11) zugesetzt, deren Volumen von dem des $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ subtrahiert wurde. Um den Hintergrund und die Laufhöhe des unprozessierten, bzw. reifen Proteins in der SDS-Page zu bestimmen, wurde pro untersuchtem Substrat ein Kontrollansatz mitgeführt, bei dem die Menge an SP-Zellen durch KHM-Puffer, in dem die

SP-Zellen resuspendiert sind, ersetzt wurde. Der cotranslationale Transport erfolgte 60 min bei 30 °C und Schütteln im Thermomixer bei 650 rpm.

Um die posttranslationale Translokation zu simulieren, wurde die Translation der posttranslational zu transportierenden Substrate wie in Kapitel 3.2.3.11.2 beschrieben, für 15 min bei 30 °C durchgeführt. Dann wurde die Translation durch Zugabe von Puromycin (Endkonzentration 1 mM) gestoppt und für 5 min bei 30 °C inkubiert. Puromycin ist ein Nukleosid-Antibiotikum, das aufgrund seiner Ähnlichkeit zu einer Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle des Ribosoms bindet, aber zu einer verfrühten Freisetzung des in Synthese befindlichen Polypeptids führt. Im Anschluss wurden die SP-Zellen (16 % oder 32 %, siehe Tabelle 3.11) bzw. der KHM-Puffer für die Kontrollansätze zu dem Translationsansatz pipettiert und der ER-Import wurde für 20 min (Preproapelin) beziehungsweise 30 min (Sec61 β) bei 30 °C und 650 rpm erlaubt.

Nach dem *in vitro* Transport wurde das komplette Probenvolumen (5 μ l) mit 5 μ l 2 x Lämmli-Puffer versetzt, 10 min bei 56 °C denaturiert und direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 3.2.3.1), dessen Prozentigkeit sich nach dem Molekulargewicht des zu analysierenden Substrates richtete. Im Folgenden wurden die radioaktiven Gele fixiert, getrocknet und mittels Phosphorimaging (siehe Kapitel 3.2.3.12) analysiert. Eine Ausnahme bildeten die Substrate Preproapelin und Sec61 β . Diese wurden vor der SDS-PAGE bei 13200 rpm (Rotor F45-24-11) und 4 °C für 20 min pelletiert. Der Grund hierfür besteht in dem kleinen Molekulargewicht von 10-15 kDa der beiden Substrate, das in den Größenbereich des Hämoglobins fällt, welches in dem Reticulozytenlysat vorhanden ist und mit den gewünschten Signalen interferiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und das Pellet in 20 μ l 1 x Lämmli-Puffer aufgenommen und vor der SDS-PAGE 10 min bei 56 °C denaturiert.

Tabelle 3.11: Experimentelle Bedingungen für den *in vitro* Transport der zu analysierenden Vorläuferproteine.

Substrat	SPC-Konzentration cotranslational (%)	SPC-Konzentration posttranslational (%)	Zusätzlicher Zentrifugations-schritt	Verwendetes SDS-Gelsystem
ERj3	24	-	nein	groß 10 %
Kappa	16	-	nein	klein 12,5 %
Preproapelin-OPG2	6	32	ja	klein 19,5 %
Preprolaktin	32	-	nein	klein 12,5 %
Sec61 β -opsin3	16	16	ja	klein 19,5 %

3.2.3.12. Autoradiographie

Bei der Autoradiographie wird radioaktive β -Strahlung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit in Form von ^{35}S -markierten Proteinen vorkommt, sichtbar gemacht. Hierzu wurden Phosphorplatten auf das fixierte und getrocknete SDS-Gel aufgelegt (siehe Kapitel 3.2.3.4), wodurch die radioaktive β -Strahlung der Probe von dem Beschichtungsmaterial der Phosphorplatte (Europium) absorbiert und in einen energiereichen, angeregten Zustand gehoben wird. Nachdem das Gel für eine bestimmte Zeit (in Abhängigkeit der verschiedenen Substrate) auf der Phosphorplatte exponiert war, wurde die Platte in dem Typhoon Trio-Scanner ausgelesen. Dabei verursacht die Laseranregung der Platte ein Zurückfallen der angeregten Moleküle in den Grundzustand, wobei Energie in Form von Photonen frei wird, die als Signal detektiert und als digitales Bild ausgegeben wird. Dabei ist die Signalstärke von der Menge an Radioaktivität abhängig, der sie ausgesetzt wurde. Somit sind Quantifizierungen der Signalunterschiede möglich.

3.2.3.13. Densitometrie

Die Densitometrie beschreibt das Verfahren der quantitativen Messung der Farbdichte. Dies wurde genutzt, um die Signale aus der immunologischen Detektion von Proteinen zu analysieren. Die Software Fusion der Firma Peqlab wurde zur Densitometrie von Aufnahmen der Fusion SL Geldokumentation genutzt (POD-gekoppelte Antikörper, die mit ECL detektiert wurden). Kamen fluoreszenzmarkierte Antikörper (Cy3/Cy5) zum Einsatz, wurden die getrockneten PVDF-Membranen mit dem Typhoon Trio gescannt und mit der Software ImageQuant densitometrisch ausgewertet. Diese Hard- und Software wurde ebenfalls dazu genutzt Phosphorplatten mit den Signalen radioaktiv markierter Proteine zu scannen und zu quantifizieren. Gele, die mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt wurden, konnten mit dem Image Scanner III eingescannt und ebenfalls mit ImageQuant quantifiziert werden.

3.2.4. Methoden der Nukleinsäureanalytik

3.2.4.1. DNA-Konzentrationsbestimmungen mit Hilfe des Nanodrop ND-1000

Das UV/VIS Spektralphotometer Nanodrop ND-1000 (PeqLab) hat den Vorteil, dass es nur ein geringes Probenvolumen zur Bestimmung der DNA-Konzentration benötigt (üblicherweise 1 μl). Neben der Konzentration wird auch die Reinheit der vermessenen DNA angegeben. Hierfür wird die Absorption der Probe in bestimmten Wellenlängen-Bereichen

ermittelt und die Ratio gebildet. Liegt die Absorptionsratio 260/280 nm bei 1,8 handelt es sich um reine DNA (NanoDrop Technologies, 2007). Ein kleinerer Wert legt eine Verunreinigung durch Protein oder Phenol mit starker Absorption im Bereich von 280 nm nahe. Eine weitere Ratio wird gebildet aus den Absorptionen von 260 nm und 230 nm, welche Aufschluss über weitere Verunreinigung der Probe durch EDTA, Kohlenhydrate und Phenol gibt. Der ideale Wert liegt zwischen 1,8 und 2,2.

3.2.4.2. Präparation chemisch-kompetenter *E. coli*-DH5 α -Zellen

Der *E.coli*-Stamm DH5 α wurde in einem Verdünnungsausstrich auf eine LB-Agarplatte geimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkultur dieser Platte wurde gepickt und zum Animpfen einer 10 ml-Vorkultur in LB-Flüssigmedium benutzt. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml dieser Vorkultur in 200 ml LB-Medium überimpft und diese bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert, was nach ca. 3 h der Fall war. Die Kultur wurde in einen kalten Zentrifugenbecher überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (J2 MC-Zentrifuge mit JA-10-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 80 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert und danach 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann erneut für 5 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 8 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert und zu 200 μ l Aliquots in vorgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Aliquots wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C langzeitgelagert. Um die Effizienz der kompetenten *E. colis* zu überprüfen, wurde eine Testtransformation mit einer definierten Konzentration p-Bluescript-DNA durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter Kapitel 3.2.4.3 beschrieben mit 10 pg und 100 pg DNA transformiert, die durch Vorverdünnungen des Plasmidstocks (1 μ g/ μ l) in TE-Puffer hergestellt wurden. Nach der Hitzeschocktransformation wurde der Transformationsansatz auf LB_{AMP}-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien der beiden Plasmidkonzentrationen gezählt und die Effizienz der kompetenten *E.coli*-DH5 α nach folgender Formel berechnet:

Transformationseffizienz = Anzahl d. Transformanden / μ g eingesetzte DNA.

Puffer 1

KOAc	30 mM
RbCl ₂	100 mM

Puffer 2

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM

CaCl ₂	10 mM	RbCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM	Glycerin	15 % (v/v)
Glycerin	15 % (v/v)	pH mit KOH auf 6,5 eingestellt	
pH mit Essigsäure auf 5,8			

1 x TE

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

LB-Agar

LB Agar (Lennox) 35 g
 ad 1 l mit H₂O_{bidest}, autoklavieren, danach noch warm in Petrischalen gießen und erstarren lassen. Falls ein Antibiotikum zugesetzt wird, den autoklavierten LB-Agar vor Zugabe des Antibiotikums auf Handwärme abkühlen lassen

LB-Medium

LB Medium 25 g

"lysogeny broth"

ad 1 l mit

H₂O_{bidest},

autoklavieren

3.2.4.3. Hitzeschocktransformation von kompetenten *E. coli*-DH5α-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen werden dazu benutzt heterologe DNA zu vervielfältigen. Dies spielt vor allem im Rahmen von Klonierungen eine wichtige Rolle. Zu Nutzen macht man sich hierbei die intrinsische Antibiotikaresistenz des zu vervielfältigenden Plasmids. Die Resistenz sichert das Überleben und Proliferieren der erfolgreich transformierten Bakterien in Anwesenheit des Antibiotikums im Wachstumsmedium. Bakterien, die keine Plasmid-DNA aufgenommen haben, sterben unter diesen Bedingungen. Zur Hitzeschocktransformation wurden 0,2-1 µg Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten DH5α-Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C in einem Wasserbad für 90 sec. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen direkt auf Eis gestellt und es wurden 500 µl warmes LB-Medium hinzugegeben. Bei 37 °C im Rollinkubator wuchsen die Zellen für 45 min, bevor sie 1 min bei 3000 rpm (Rotor F45-18-11) und RT abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in dem Rest des Überstandes resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum pipettiert. Mit einem sterilen Glasspatel wurde die Bakteriensuspension gleichmäßig ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Zum weiteren Vervielfältigen des Plasmids

oder Testen der Plasmide im Rahmen von Klonierungsschritten wurden die Folgekulturen stets mit einer Einzelkolonie angeimpft.

3.2.4.4. Plasmidpräparation (verschiedene Maßstäbe)

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurde zunächst eine Transformation der Plasmid-DNA in hitzekompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 α durchgeführt, wie in Kapitel 3.2.4.3 beschrieben. Es wurde flüssiges LB-Medium inklusive des jeweiligen Selektionsantibiotikums mit den transformierten *E. coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 220 rpm inkubiert. Das Volumen der Kultur und die Menge der transformierten Bakterien entschieden über die verschiedenen Maßstäbe der Präparation. So wurde eine Midi-Präparation mit 100 ml LB-Medium und eine Mega-Präparation mit 500 ml LB-Medium durchgeführt. Zunächst wurden die Zellsuspensionen abzentrifugiert und resuspendiert. Der erste Schritt der Plasmidpräparation war die alkalische Lyse der Zellen, wobei die Zellwände der Bakterien instabil werden und die dem Lysepuffer zugesetzte RNase A die bakterielle RNA verdaut. Anschließend wurden die Bakterien mit SDS und NaOH vollständig lysiert. Ziel der alkalischen Lyse ist es selektiv die Plasmid-DNA freizusetzen und gleichzeitig die chromosomale DNA der Bakterien intakt zu lassen. Im nächsten Schritt wurde zur Neutralisierung Kaliumacetatpuffer zugesetzt, der dazu führt, dass denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zelldebris ausfallen, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Zur weiteren Reinigung werden in kommerziellen Kits Anionenaustauschersäulen benutzt, die die negativ geladene DNA binden. Dadurch können mit niedriger Salzkonzentration degradierte RNA und Proteine von der Säule ausgewaschen werden und anschließend kann mit höherer Salzkonzentration die Plasmid-DNA eluiert werden. Die eluierte DNA wird anschließend mit Isopropanol gefällt, zentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Zuletzt wird die DNA getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nanodrop-Spektrophotometers (siehe Kapitel 3.2.4.1). Die genaue Durchführung der Plasmidpräparation erfolgte nach den jeweiligen Herstellerangaben.

1 x TE

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

3.2.4.5. RNA-Präparation aus HeLa-Zellen

Die RNA-Präparation aus den manipulierten HeLa-Zellen wurde mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden zunächst bis zu 5×10^6 Zellen in 350 μ l RLT-Puffer mit 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Wichtig bei der Arbeit mit RNA ist die Vermeidung von RNase-Kontaminationen, die ubiquitär vorkommen, äußerst stabil sind und für ihre Aktivität keine Cofaktoren benötigen. Wichtig ist daher das Arbeiten mit RNase-freien Verbrauchsmaterialien. Die Zellen wurden aufgetaut und die RNA-Präparation, die auf der Grundlage des Anionenaustauschs basiert, wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Präparation enthielt außerdem eine DNase-Behandlung auf der Säule, wodurch Kontaminationen durch genomische DNA eliminiert werden sollten. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten RNA erfolgte mit Hilfe des des Nanodrop- Spektrophotometers (siehe Kapitel 3.2.4.1).

3.2.4.6. cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurde ein spezifisch auf die Kombination aus reverser Transkriptase-Reaktion und quantitativer Real-time-PCR abgestimmtes Kit der Firma Invitrogen benutzt (Superscript IV VILO). Zur reversen Transkription wurden bis zu 2,5 μ g RNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.4.7. Quantitative „real-time“-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative „real-time“ PCR dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Im Rahmen dieser Arbeit kam sie zum Einsatz, um Aussagen über die mRNA-Menge von SLC35B1-depletierten Zellen mittels siRNA zu treffen. Dies wurde durch den Einsatz von Taqman-Sonden möglich, die genspezifisch von Thermo Scientific (ursprünglich Applied Biosystems) erworben werden können und am 5' -Ende kovalent mit einem Fluorophor gekoppelt sind. Am 3'-Ende der Sonde befindet sich ein Quencher, der im intakten Zustand der Sonde das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht absorbiert und somit kein Fluoreszenzsignal detektiert wird. Wenn die Zielsequenz vorhanden ist, bindet die Sonde an die DNA und wird durch die 5' Nukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase abgebaut, was zu einer räumlichen Trennung von Fluorophor und Quencher führt und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (Holland et al., 1991). Die Zunahme der Fluoreszenz erfolgt in Abhängigkeit der vorhandenen

Zielsequenzen, die exponentiell synthetisiert werden. Als interner Standard wurde *ACTB* als Haushaltsgen mitgeführt.

Die qRT-PCR wurde in einer 96 Well-"MicroAMP"-Platte, die spezifisch zu dem qRT-PCR-Cycler passte, vorbereitet. Dazu wurde pro Well 10 μ l „TaqMan Gene Expression Mastermix“ und 1 μ l „Expression Assay“ pipettiert. Als nächstes wurden 50 ng cDNA und H₂O bis zu einem Volumen von 9 μ l pro Well pipettiert, wodurch sich das Gesamtvolumen von 20 μ l pro Well ergab. Als nächstes wurde die Platte mit einer speziellen Folie luftblasenfrei versiegelt und kurz zentrifugiert. Alle Bestimmungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Auswertung der qRT-PCR-Daten erfolgte nach der $\Delta\Delta$ ct-Methode. Dabei steht das Ergebnis für die n-fache Veränderung des zu testenden Gens in Bezug auf die mitgetesteten Kontrollzellen (Ktr siRNA) und korrigiert anhand des mitgeführten Haushaltsgens, in diesem Fall *ACTB* (Livak und Schmittgen, 2001, Schmittgen und Livak, 2008).

4. Ergebnisse

Der Sec61-Komplex mit seiner porenbildenden α -Untereinheit ist neben seiner viel beachteten und untersuchten Rolle in der Proteinbiogenese auch eine zentrale Schaltstelle für die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Dem liegt physiologisch betrachtet ein ca. 1000-facher Ca^{2+} -Konzentrationsgradient zwischen dem ER, als Hauptspeicherorganell für Ca^{2+} und dem Cytosol zugrunde (Clapham, 2007). Beim Transit von Polypeptiden ins ER, der die Öffnung des Kanals erfordert, wird somit auch Ca^{2+} -Ionen der Durchtritt erlaubt, wodurch der Sec61-Komplex zu einem sog. passiven Ca^{2+} -Leckkanal der ER-Membran wird (Lomax et al., 2002, Van Coppenolle et al., 2004, Flourakis et al., 2006, Ong et al., 2007, Lang et al., 2011a, Lang et al., 2011b). Die Regulation des Sec61-Kanals, die der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase dient, ist zentraler Forschungsbestandteil der jüngeren Vergangenheit, wobei als Regulatoren bisher das lumenale Hsp70-Chaperon BiP (Schäuble et al., 2012), seine Hsp40 Co-Chaperone ERj3 und ERj6 (Schorr et al., 2015), das Membranprotein Sec62 (Greiner et al., 2011, Linxweiler et al., 2013), sowie auf cytosolischer Seite Ca^{2+} -CaM (Erdmann et al., 2011) identifiziert wurden.

Eingebettet in diesen Hintergrund war es die Aufgabe dieser Arbeit zu analysieren, inwieweit sich die Sec61 α -Mutation V85D auf die Integrität des Sec61-Komplexes und insbesondere auf seine Ca^{2+} -Permeabilität auswirkt. Dies war von besonderem Interesse, da die V85D-Mutation von Sec61 α in PAD (engl. „primary antibody deficiency“-)Patienten mit Plasmazelldefizienzen aufgetreten war, deren Pathogenese und innerhalb derer die Rolle von Sec61 α es zu verstehen gilt (Kapitel 3.1). Vor diesem Hintergrund wurden vor allem Untersuchungen zu Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase in HeLa-Zellen durchgeführt, aber auch die Aspekte des Proteintransports und der UPR wurden beleuchtet.

4.1. Einfluss der Sec61 α -Integrität auf die Ca^{2+} -Homöostase am Beispiel der PAD-assoziierten Sec61 α -Mutation V85D

Die erste Fragestellung dieser Arbeit beinhaltet die Charakterisierung einer Mutation in der porenbildenden Untereinheit Sec61 α des heterotrimeren Sec61-Komplexes. Bei der Mutation handelt es sich um eine der nichtpolaren Porenring-Aminosäuren (Van den Berg et al., 2004, Junne et al., 2007, Voorhees und Hegde, 2016a), bei der ein Valin an der Stelle 85 durch ein Aspartat ausgetauscht wurde (V85D). Die heterozygote Mutation wurde in mehreren Patienten einer Familie identifiziert, die unter den Folgen einer primären Immundefizienz

leiden (Schubert et al., 2018). Die Patienten wiesen normale B- und T-Zellpopulationen im peripheren Blut auf. Erstere besaßen jedoch ein geringeres Potential sich in Plasmazellen weiterzuentwickeln und sezernierten weniger Immunglobuline. Letzteres ist der Grund für den klinischen Phänotyp der Erkrankung, die sich in immer wiederkehrenden Infektionen, vor allem des oberen Atmungstraktes, bemerkbar macht (Verma et al., 2015).

Der Frage nach der Pathogenese der Plasmazellen und die molekulare Grundlage der primären Immundefizienz wird in den folgenden Kapiteln nachgegangen, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Ca^{2+} -Homöostase (Kapitel 4.1.1.2 und Kapitel 4.1.2.2) und den Proteintransport (Kapitel 4.1.2.3) gelegt wird.

4.1.1. Funktionelle Komplementationsanalyse mit Sec61 α (V85D) nach Depletion des endogenen Sec61 α

Der pathologische Mechanismus von PAD im Organismus der Mutationsträger wurde zur vereinfachten Untersuchung in ein Zellmodell mit vielfachen analytischen Möglichkeiten übertragen. Das Zellmodell der Wahl für die heterologe Expression der *SEC61A1(V85D)*-Mutation waren humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, die als HeLa-Zellen bekannt sind und deren Handhabung und Kulturbedingungen einfach und etabliert waren. Die bereits zuvor beschriebene Methode der siRNA-vermittelten Depletion von SEC61A1 in HeLa-Zellen (Lang et al., 2012) in Kombination mit der plasmidgetriebenen Komplementation durch SEC61A1(V85D) wurde zur Abbildung des SEC61A1(V85D)-Phänotyps genutzt.

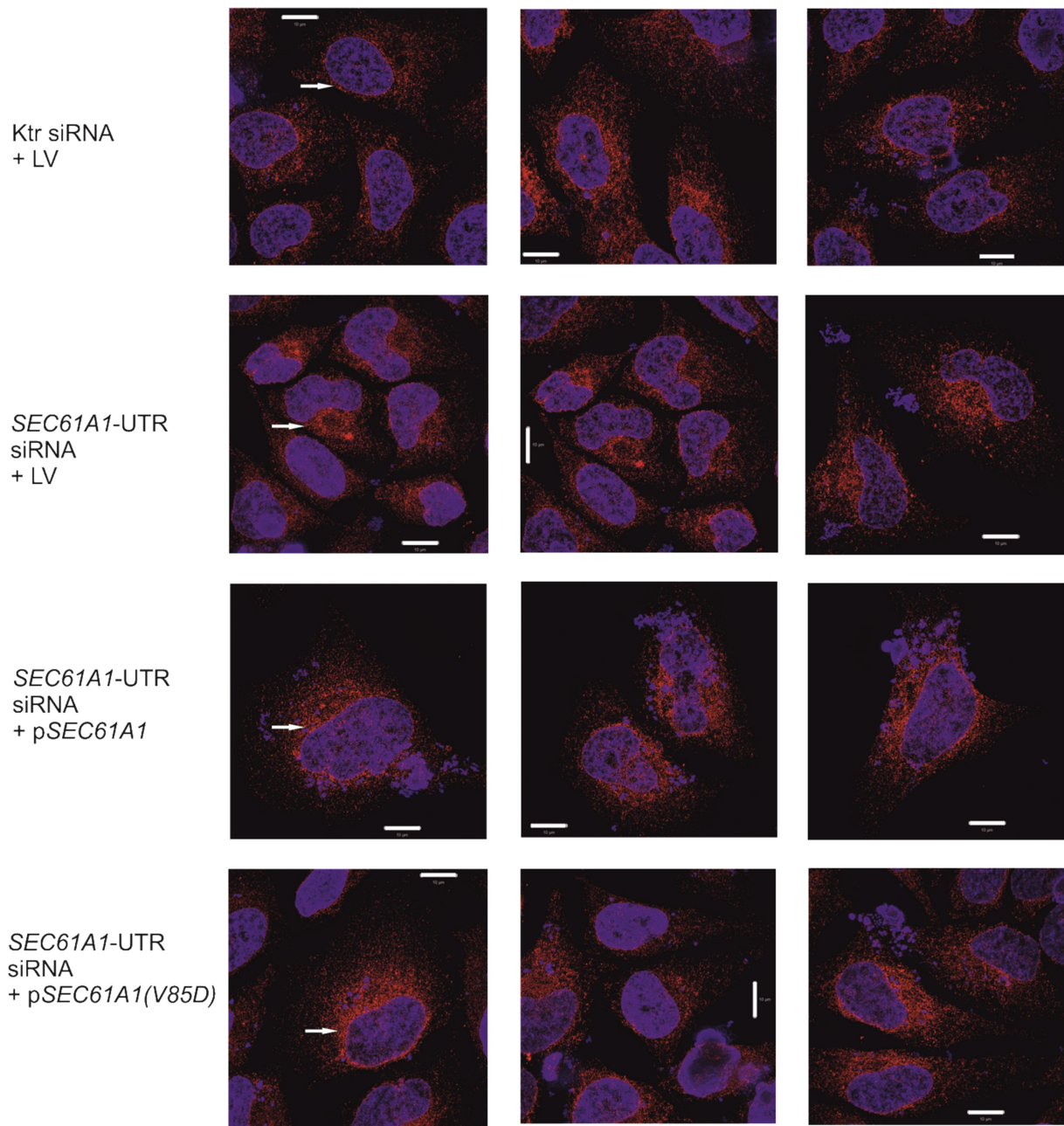
4.1.1.1. Einfluss von Sec61 α (V85D) auf die ER-Morphologie von HeLa-Zellen

In vorangehenden Studien zur Morphologie von HeLa-Zellen, die siRNA-vermittelt einer Depletion von Sec61 α für 96 h unterlagen, wurden keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu Zellen ermittelt, die mit Kontroll (Ktr) siRNA behandelt wurden (Lang et al., 2012). Vor diesem Hintergrund wurden nun Sec61 α -depletierte und mit Sec61 α -Wildtyp (Wt) beziehungsweise Sec61 α (V85D) komplementierte HeLa-Zellen ebenfalls in einer hochauflösenden 3D-SIM-Mikroskopie auf morphologische Abweichungen analysiert. Kontrollpopulationen an HeLa-Zellen wurden entsprechend mit Ktr siRNA und Leervektor transfiziert. Eine Visualisierung des retikulären Netzwerkes des ER wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz des Sec62-Proteins erreicht. Wie bereits zuvor beschrieben, führte die siRNA-vermittelte Depletion von Sec61 α für 96 h nicht zu sichtbaren Veränderungen der retikulären Struktur des ER. Ebenso wiesen Zellen nach partieller Komplementation mit entweder Sec61 α -Wt oder Sec61 α (V85D) keine Strukturveränderungen in Sec62-markiertem

ER auf (Abbildung 4.1). Zu beobachten war die dichtere ER-Verteilung um den Zellkern herum (weiße Pfeile), wobei es sich hauptsächlich um ER-Cisternen handelt, die im Allgemeinen flach aufeinander liegen und nicht so verzweigt sind wie die ER-Tubuli, die sich in die Zellperipherie erstrecken.

Die partielle Komplementation von ca. 50 % wurde mittels Western Blot bestätigt (Abbildung 4.1, B).

A



B

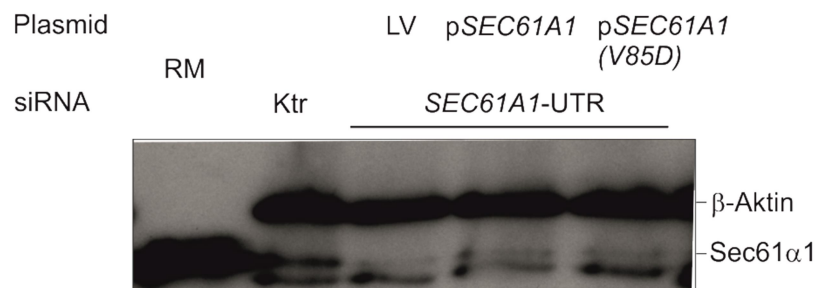


Abbildung 4.1: Effekt der Komplementation mit Sec61 α (V85D) auf die ER-Morphologie von HeLa-Zellen. A Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden 96 h mit der *SEC61A1*-UTR bzw. Ktr siRNA behandelt (3.2.1.4.1). Nach 30 h wurde das Kontroll- bzw. die Komplementationsplasmide zur Expression gebracht (3.2.1.4.2). Paraformaldehyd wurde zur

Fixierung der Zellen genutzt bevor die ER-Struktur mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gerichtet gegen Sec62 abgebildet wurde (3.2.2.2.1). Die hochauflösenden Aufnahmen des an den sekundären Antikörper gekoppelten Alexa594-Fluorophors wurden mithilfe des Elyra-SIM-Mikroskop angefertigt (Dr. Elmar Krause, Physiologie, Uds). Die blauen Strukturen stellen DAPI-Färbungen der Zellkerne dar. Größenstandard: 10 μm (weiße Linie). **B** Western Blot der mit Sec61 α (V85D)-komplementierten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren Sec61 α -Gehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladekontrolle mitgeführt. (LV = Leervektor, RM = raue Mikrosomen)

4.1.1.2. Einfluss von Sec61 α (V85D) auf die Ca²⁺-Homöostase

Wie eingangs erklärt, stellt der Sec61-Komplex einen passiven Ca²⁺-Leckkanal dar, der unter physiologischen Bedingungen stets einer strengen Kontrolle gegenüber einer Ca²⁺-Durchlässigkeit unterliegen muss (Lomax et al., 2002, Van Coppenolle et al., 2004, Erdmann et al., 2011, Lang et al., 2011a, Lang et al., 2011b, Schorr et al., 2015). Die Aminosäure Valin an der Stelle 85 ist von besonderem Interesse aufgrund ihrer Lokalisation im Porenring des Kanals (Voorhees und Hegde, 2016a). Die Substitution V85D, wodurch an Stelle einer hydrophoben Aminosäure eine polare, negativ geladene tritt, wirft die Frage auf, inwiefern sich diese auf die Ionenpermeabilität des Kanals auswirkt. Deshalb wurde auf einen veränderten Ca²⁺-Phänotyp gegenüber dem Sec61 α -Wt hin untersucht, der ursächlich für die Pathologie der PAD sein könnte.

Um diesen Fall zellulär abzubilden, wurde ein Komplementationstest nach siRNA-vermittelter Depletion des endogenen Sec61 α durchgeführt. Die zur Komplementation eingesetzten Plasmide trugen siRNA-resistente cDNA des wildtypischen *SEC61A1*-Gens, sowie der mutierten Variante *SEC61A1(V85D)*. Die Ansätze, die keine Komplementationsplasmide enthielten wurden mit einem Leervektor (LV) transfiziert, um gleiche Versuchsbedingungen für alle Populationen herzustellen. Zur Untersuchung mittels „Live Cell Calcium Imaging“ wurden die auf diese Weise behandelten Zellen mit dem Ca²⁺-Indikator Fura-2 beladen (Kapitel 3.2.2.3.2) und anschließend den Effektoren Thapsigargin (Tg) und Ionomycin (Iono) ausgesetzt. Die Ca²⁺-Konzentration ist deshalb im Folgenden als Fura-2 Veränderung, d.h. als Quotient der Fluoreszenzintensitäten von 340 nm und 380 nm dargestellt. Wie Abbildung 4.2, B zeigt, führte die Sec61 α -Depletion zu einer Reduktion des Ca²⁺-Ausstroms um 30 %, welcher nach Applikation von Tg durch Demaskierung des passiven Ca²⁺-Leckstroms sichtbar wurde. Die Komplementation mit Sec61 α -Wt in Sec61 α -depletierten Zellen resultierte in einem Ca²⁺-Ausstrom nach Tg-Applikation, der mit dem von nicht depletierten Zellen vergleichbar war. Im Falle der Komplementation mit Sec61 α 1(V85D) blieben die Ca²⁺-Level nach Tg-Applikation ebenfalls um ca. 30 % signifikant reduziert und somit vergleichbar mit der Kontrollpopulation bestehend aus Ktr

siRNA + LV. Da die Ca^{2+} Imaging-Versuche nach Tg-Applikation lediglich Aussagen über den ER- Ca^{2+} -Pool zulassen, wurden weitere Messungen mit Iono angeschlossen. Dieses Calcium-Ionophor mobilisiert den intrazellulären Pool an Ca^{2+} ohne zwischen den verschiedenen Speicherkompartimenten zu unterscheiden. Somit spiegeln diese Messungen den intrazellulären Ca^{2+} -Status der verschiedenen Zellpopulationen wider. In Analogie zu den Tg-Messungen wurden die verschiedenen Komplementationsansätze mit dem Effektor Iono auf ihren Ca^{2+} -Status hin überprüft (Abbildung 4.2, C-D). Dabei wurde ein ausgeprägter Phänotyp für die mit Sec61 α (V85D)-komplementierte Zellpopulation beobachtet: diese Zellen wiesen 43 % weniger Ca^{2+} auf als die Ktr siRNA + LV. Auch die Sec61 α -depletierten Zellen wiesen einen signifikant verringerten Gehalt an Ca^{2+} auf als die Kontrolle, jedoch weniger ausgeprägt als in Sec61 α (V85D)-komplementierten Zellen.

Zur Validierung der Expressionseffizienz wurden die Zellen mittels Western Blot auf ihren Sec61 α -Gehalt hin überprüft (Abbildung 4.2, E). Nach siRNA-vermittelter Sec61 α -Depletion war ein Restproteingehalt von lediglich 17 % im Mittel nachweisbar. Die Komplementation mit Sec61 α -Wt war mit einem durchschnittlichen Sec61 α -Gehalt von 103 % sehr effizient. Für Sec61 α (V85D) wurde eine partielle Komplementation mit 57 % Sec61 α -Proteingehalt im Mittel erreicht. Des Weiteren wurde die Lebendzellzahl der verschiedenen Zellpopulationen zum Endzeitpunkt von 96 h bestimmt, der ebenfalls für anschließende „Live Cell Calcium Imaging“-Experimente gewählt wurde. Hierbei fiel auf, dass nach der Expression von pSEC61A1(V85D) die Lebendzellzahl im Vergleich zur Kontrollpopulation (Ktr siRNA + LV= 1,6 Mio) im Mittel mit 1,1 Mio etwas niedriger war. Dieser Trend in Richtung verringerter Zellzahl ließ sich für alle Populationen, die mit SEC61A1-UTR-siRNA behandelt wurden, beobachten (Abbildung 4.2, F).

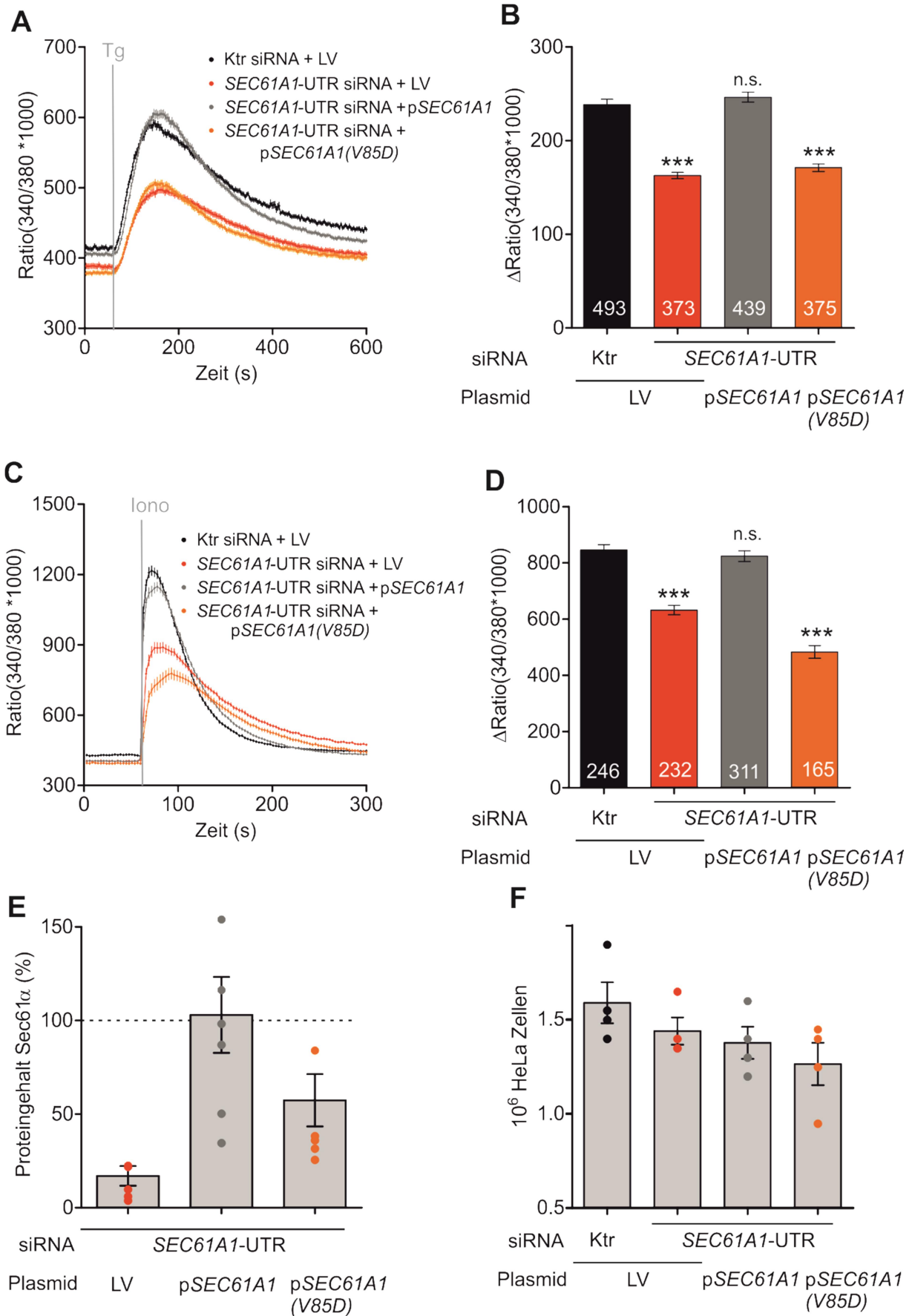


Abbildung 4.2: Effekt der Komplementation mit Sec61 α (V85D) auf den cytosolischen Ca²⁺-Gehalt Sec61 α -depletierter HeLa-Zellen. Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden 96 h

mit der *SEC61A1*-UTR bzw. Ktr siRNA behandelt (3.2.1.4.1) und zusätzlich wurden nach 30 h Kontroll- bzw. Komplementationsplasmide zur Expression gebracht (3.2.1.4.2). Nach 96 h wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM (4 μM) beladen und anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in Ca^{2+} -freier Lösung (ES + EGTA) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Die Effektoren wurden nach 1 min „online“ appliziert und die Fura-2-Fluoreszenz für 9 Minuten (Tg, EK 1 μM , (A)) bzw. für 4 min (Iono, EK 5 μM , (C)) in Echtzeit verfolgt. **B+D** Statistische Auswertung der in A und C aufgezeichneten cytosolischen Ca^{2+} -Veränderungen des Ca^{2+} -Indikators Fura-2. Die Balkendiagramme entsprechen den Differenzen aus basaler und maximaler Ca^{2+} -Konzentration \pm SEM nach Applikation des jeweiligen Effektors. Am Fuße der Balken ist die Anzahl zur Berechnung herangezogenen Einzelzellen angegeben. Für die verschiedenen Populationen gab es folgende Anzahl biologischer Replikate: Tg n = 6; Iono n = 5. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, dabei galt: nicht signifikant (n.s.) = p-Werte \geq 0,05; *** = p-Werte \leq 0,001. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation (Ktr siRNA + LV). **E** Sec61 α -Proteingehalt im Verhältnis zur Kontrolle (Ktr siRNA + LV). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren Sec61 α -Gehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladkontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 5 Replikaten. **F** Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulationen nach 96 h SEC61A1-siRNA vermittelter Depletion und gegebenenfalls Komplementation mit Sec61 α oder Sec61 α (V85D). Die Zellen wurden geerntet (3.2.1.5) und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10^6) aus 4 Einzelerperimenten. (LV = Leervektor, Tg = Thapsigargin, Iono = Ionomycin, EK = Endkonzentration, SEM = "standard error of the mean", ES = "External solution")

4.1.1.2.1. Kinetik der Komplementation mit Sec61 α (V85D) nach Depletion des endogenen Sec61 α

Um die Beobachtungen der partiellen Komplementation der Sec61 α -Depletion auf Proteinebene durch Sec61 α (V85D) (Abbildung 4.2) näher zu beleuchten, wurde eine kinetische Untersuchung des Sec61 α -Proteingehalts in einem Zeitfenster von 48 h bis 120 h nach der ersten siRNA-Behandlung durchgeführt. Die HeLa-Populationen, die hierbei verglichen wurden, waren *SEC61A1*-UTR + LV, *SEC61A1*-UTR + pSEC61A1, *SEC61A1*-UTR + pSEC61A1(V85D) und *SEC61A1*-UTR + pSEC61A1(Y344H). Letztere Mutante ist in der Maus Diabetes-assoziiert (Lloyd et al., 2010) und wurde in vorangegangenen Studien auf ihren Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase in HeLa-Zellen hin untersucht (Schäuble et al., 2012). Dabei fiel auf, dass diese Mutation die BiP-Bindestelle an Sec61 α kompromittiert, was zu einem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom führt. Die Sec61 α (Y344H)-Mutante diente in dieser Studie als eine weitere Vergleichspopulation. Bezogen sind alle Werte auf die Kontrollpopulation Ktr + LV (gestrichelte Linie bei 100 %). Neben Sec61 α wurden die Zellen auch auf ihren Gehalt an Sec61 β hin überprüft. Die „tail-anchor“-insetierten Proteine Sec61 β und Sec61 γ sind neben Sec61 α die Komponenten des heterotrimeren Sec61-Komplexes, der zur funktionellen Integrität auf alle drei Komponenten angewiesen ist. Eine siRNA-vermittelte Depletion von Sec61 α führt gleichzeitig zur Destabilisierung der β - und γ -Untereinheiten (Lang et al., 2012). Somit wurde der Gehalt an Sec61 β als Indikator für die funktionelle Integrität des Sec61-

Komplexes herangezogen. Die Abbildung 4.3, A zeigt die effiziente Proteindepletion von Sec61 α bereits 48 h nach der ersten siRNA-Behandlung. Dieser konstant niedrige Wert mit einem Restproteingehalt von 25-30 % blieb bis 96 h aufrecht und schien erst danach langsam wieder anzusteigen. Ebenfalls auffällig war die gleichzeitige Destabilisierung von Sec61 β nach der siRNA-vermittelten Depletion von Sec61 α , was den kompletten Verlust des heterotrimeren Sec61-Komplexes nach Depletion der porenbildenden α -Untereinheit reflektiert. In Abbildung 3.3, B ist der Komplementationsansatz mit p*SEC61A1* im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die transiente Expression des für Sec61 α kodierenden Plasmids, erreichte nach 60 h ein Maximum von ~250 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 96 h betrug der Sec61 α -Gehalt im Mittel noch 152 %. Der Gehalt von Sec61 β stieg langsam über die Zeit an, erreichte jedoch erst nach 96 h ein Maximum von 120 %. Folglich wurde nach 96 h siRNA-vermittelter Sec61 α -Depletion und Komplementation mit p*SEC61A1* eine Zellpopulation generiert, der ein vollständig assemblierter und funktionaler Sec61-Komplex zur Verfügung stand, vergleichbar mit der Kontrollpopulation (Ktr siRNA + LV). Darum wurde der Betrachtungszeitraum 96 h für weitere Komplementationsversuche mit Sec61 α -Mutanten verwendet. Bei der Betrachtung des Komplementationsansatzes mit p*SEC61A1(V85D)* fiel in Analogie zur Expression des Wildtyps der starke Sec61 α -Anstieg nach 60 h auf. Im weiteren Zeitverlauf fiel dieser Wert nach 96 h wieder ab auf im Mittel 63 %. Der Sec61 β -Gehalt stieg im Zeitverlauf nur langsam an und erreichte nach 96 h seinen höchsten Wert, der bei 53 % im Mittel lag. Die Komplementation mit der Diabetes-assoziierten Sec61 α -Mutation Y334H glich sehr stark dem Muster, das die Komplementation mit dem Sec61 α -Wildtyp aufwies. Nach 96 h lag hier ein Sec61 β -Gehalt von 101 % vor, weshalb von einer vollständigen Komplementation des Sec61-Komplexes auszugehen ist. Abbildung 4.3, E zeigt die Lebendzellzahlen der jeweils indizierten Zeitpunkte. Bei den Betrachtungszeiträumen von 48 h bis 72 h ließen sich keine Unterschiede zwischen den Populationen feststellen. Nach 96 h jedoch war auffallend, dass alle Populationen, in denen siRNA-vermittelt das *SEC61A1*-Gen stillgelegt wurde, unabhängig einer Komplementation, im Wachstum deutlich hinter der Kontrollpopulation (Ktr siRNA + LV) zurückblieben.

Die Versuche zur Komplementationskinetik zeigten, dass beim Betrachtungszeitraum 96 h, der auch für die in Abbildung 4.2 dargestellten „Live Cell Calcium Imaging“-Versuche gewählt wurde, die HeLa-Population *SEC61A1*-UTR siRNA + p*SEC61A1(V85D)* nur einen Sec61 β -Gehalt von 50 % aufwies und somit der Anteil vollständig assemblierter Sec61-Komplexe halbiert war. In Hinblick dessen stellte sich nun die Frage ob die beobachteten

Phänotypen aus Kapitel 4.1.1.2 ihre Ursache in der Beeinträchtigung der funktionellen Integrität des Sec61-Komplexes fanden, was im Folgenden näher untersucht wurde.

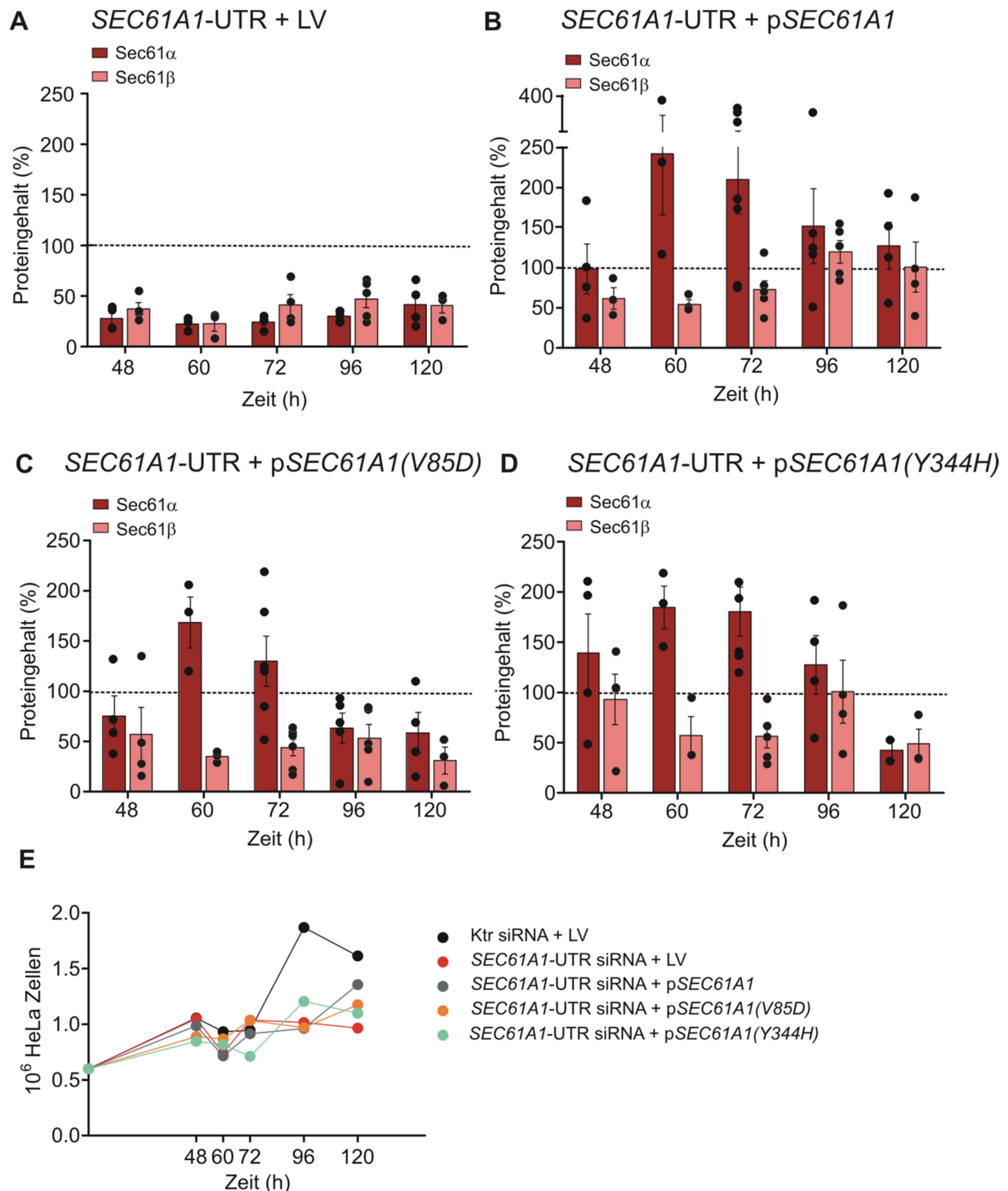


Abbildung 4.3: Expressionskinetik nach Komplementation mit Sec61 α , Sec61 α (V85D) und Sec61 α (Y344H) in HeLa-Zellen. A-D Dargestellt ist die kinetische Veränderung des Proteingehalts von Sec61 α (dunkelrot) und Sec61 β (hellrot). Die HeLa-Zellen wurden hierfür 96 h mit *SEC61A1*-UTR siRNA und nach 30 h zusätzlich mit den Komplementationsplasmiden p*SEC61A1* (B), PAD-assoziiierter Mutante p*SEC61A1*(V85D) (C) und Diabetes-assoziiierter Mutante p*SEC61A1*(Y344H) (D) bzw. LV (A) transfiziert (3.2.1.4.2). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5), zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot

(3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) der Proteingehalt bestimmt. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladkontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die relativen Werte beziehen sich auf die Ktr siRNA + LV (gestrichelte Linie). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 3-7 Replikaten. **E** Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulationen aus A-D zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten. Die Zellen wurden geerntet und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10^6) aus 2-5 Einzelexperimenten. (LV = Leervektor, SEM = engl. "standard error of the mean")

4.1.1.2.2. Einfluss der Sec61 β -Depletion auf die Ca²⁺-Homöostase – eine Phänokopie der verminderten Synthese von Sec61 β nach Komplementation mit Sec61 α (V85D)

Im vorangehenden Abschnitt wurde deutlich, dass sich die Komplementation des Sec61 α siRNA-Effekts durch Expression von *SEC61A1(V85D)* bzw. *SEC61A1* unterschiedlich auf den Gehalt von Sec61 β auswirkt. Deshalb stellte sich die Frage ob der in Hinblick auf die gestörte Ca²⁺-Homöostase beobachtete Phänotyp der Sec61 α -Mutante V85D (vgl. 4.1.1.2) auf die Mutation selbst oder indirekt auf eine Reduktion funktionaler Sec61-Komplexe zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden „Live Cell Calcium Imaging“-Experimente mit Fura-2 durchgeführt (Kapitel 3.2.2.3.2), denen eine siRNA-vermittelte Depletion der HeLa-Zellen von Sec61 β voranging. Die Depletionszeit und Konzentration der siRNA wurden dabei so gewählt, dass ein ungefährender Restproteingehalt von 50 % Sec61 β erreicht wurde und die zelluläre Situation nach Sec61 α -Depletion und Komplementation mit *SEC61A1(V85D)* simuliert werden konnte. Abbildung 4.4, A zeigt den zeitlichen Verlauf und die statistische Auswertung der Ca²⁺-Messungen nach Applikation von Tg zur Entleerung des ER-Ca²⁺-Pools. Die siRNA-vermittelte Depletion von Sec61 β wies hierbei keinerlei Unterschiede zur Ktr siRNA-behandelten Zellpopulation auf. Im Falle der Behandlung mit Iono zur Bestimmung des Ca²⁺-Status der gesamten Zellen verhielten sich die *SEC61B*-siRNA-behandelten Zellen ebenfalls vergleichbar mit den Zellen der Kontrollpopulation (Abbildung 4.4, D). Der Proteingehalt von Sec61 α und Sec61 β ist in Abbildung 4.4, E dargestellt und beträgt im Mittel der drei Versuche für Sec61 α 57 % und für Sec61 β 36 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Lebendzellzahlen nach 72 h wiesen zwischen den beiden betrachteten Populationen keine bedeutenden Unterschiede auf (Abbildung 4.4, F).

Der niedrige Sec61 β -Gehalt nach Expression von *SEC61A1(V85D)* ließ eine ineffiziente Komplementation und einen indirekten Effekt der Mutation vermuten, welche allerdings auf Basis dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden konnte und im Folgenden der Einfluss des mutierten Sec61 α -Allels selbst weiterverfolgt wurde.

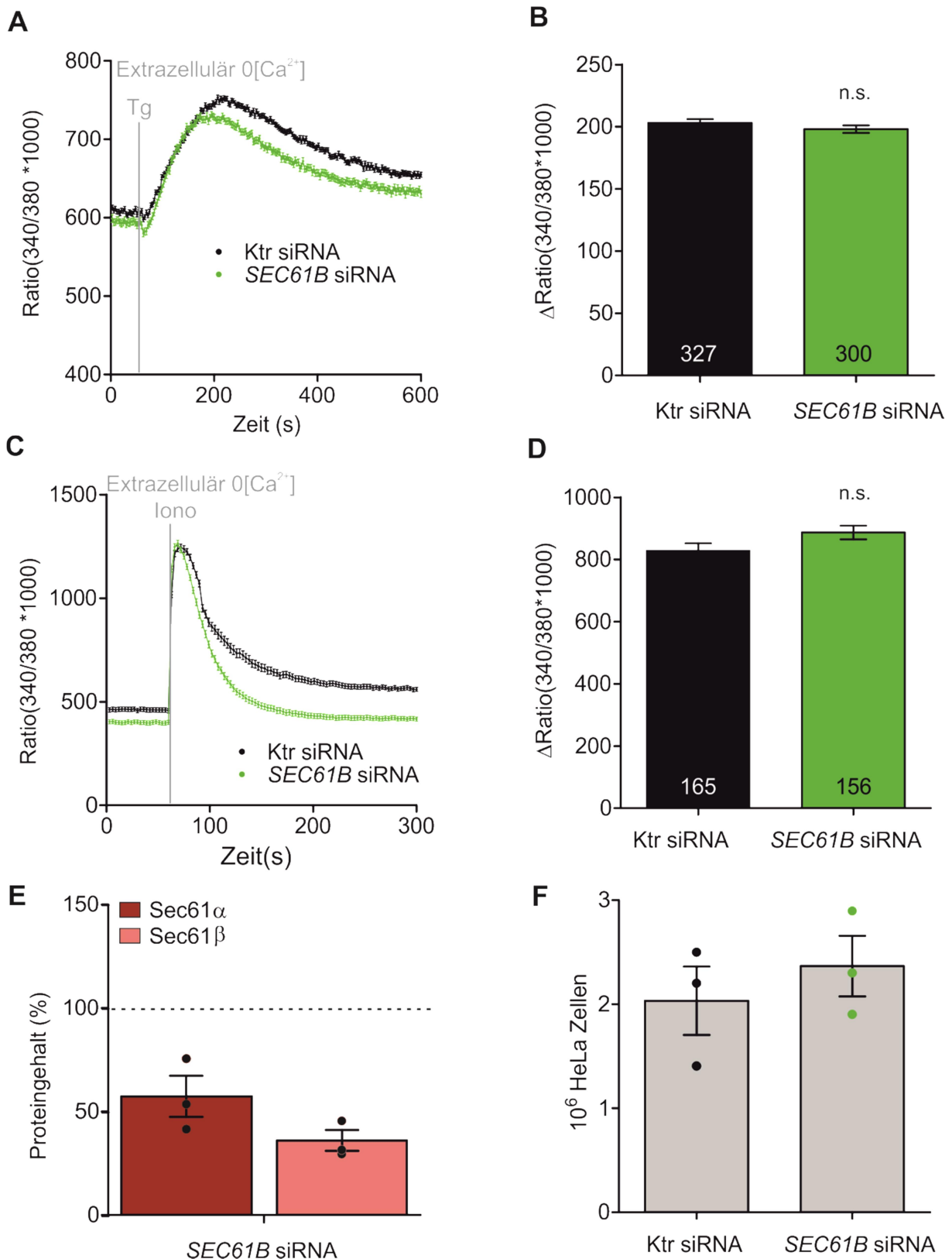


Abbildung 4.4: Effekt der Depletion von Sec61β auf den cytosolischen Ca²⁺-Gehalt von HeLa-Zellen. A-D Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden 72 h mit der SEC61B siRNA behandelt (3.2.1.4.1). Dann wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM (4 μM) beladen und anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in Ca²⁺-freier Lösung (ES +

EGTA) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Die Effektoren wurden nach 1 min „online“ appliziert und die Fura-2-Fluoreszenz für 9 min (Tg, EK 1 μM , (A)) bzw. für 4 min (Iono, EK 5 μM , (C)) in Echtzeit verfolgt. **B, D** Statistische Auswertung der in A und C aufgezeichneten cytosolischen Ca^{2+} -Veränderungen durch den Ca^{2+} -Indikator Fura-2. Die Balkendiagramme entsprechen den Differenzen aus basaler und maximaler Ca^{2+} -Konzentration \pm SEM nach Applikation des jeweiligen Effektors. Am Fuße der Balken ist die Anzahl zur Berechnung herangezogenen Einzelzellen angegeben. Für die verschiedenen Populationen gab es folgende Anzahl biologischer Replikate: Tg n = 3; Iono n = 2. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei p-Werte $\geq 0,05$ als nicht signifikant (n.s.) definiert wurden. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation. **E** Sec61 α -Proteingehalt im Verhältnis zur Kontrolle (Ktr siRNA). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren Sec61 α -Gehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladekontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 3 Replikaten. **F** Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulation nach 72 h *SEC61B*-siRNA vermittelter Genstilllegung. Die Zellen wurden geerntet (3.2.1.5) und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10^6) aus 3 Einzelerperimenten. (Tg = Thapsigargin, Iono = Ionomycin, EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean", ES = engl. "External solution")

4.1.2. Transgene Expression von *SEC61A1(V85D)* vor endogenem Hintergrund – genetische Annäherung an die PAD-Patientensituation

4.1.2.1. Evaluierung der Expressionseffizienz von *SEC61A1(V85D)* und Auswirkung auf die UPR

Nachdem im Komplementationsansatz die HeLa-Zellen zunächst siRNA-vermittelt von Sec61 α depletiert und anschließend mit der Sec61 α (V85D)-Mutante komplementiert wurden, ließ sich für diese Zellpopulation ein geringerer Ca^{2+} -Gehalt nachweisen (vgl. Kapitel 4.1.1.2). Die PAD-Patienten, in denen die Sec61 α (V85D)-Mutation identifiziert worden war, besitzen diese in heterozygoter Ausprägung. Dies bedeutet, dass neben dem Allel, das die Mutation trägt, ein weiteres Allel mit Sec61 α -Wt vorhanden ist. Die Vermutung liegt nahe, dass das Vorhandensein einer intakten Kopie des essentiellen Proteins Sec61 α die Ausprägung des Sec61 α (V85D)-Phänotyps abschwächt. Der kombinierte Ansatz der endogenen Depletion von Sec61 α und der Komplementation durch die plasmidgetriebene Expression von Sec61 α (V85D) ermöglicht die zelluläre Abbildung des vollen Phänotyps der Mutation, überbewertet möglicherweise aber die Gendosis in der pathologischen Situation der Patienten. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Versuchsaufbau gewählt, der zum einen den endogenen Sec61 α -Status der Zelle unberührt lässt und es zum anderen ermöglicht dominant-negative Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase (Kapitel 4.1.2.2) oder den Proteintransport (Kapitel 4.1.2.3) zu identifizieren.

Dazu wurde vor endogenem Hintergrund neben *SEC61A1* bzw. *SEC61A1(V85D)* ein weiteres Plasmid (*SEC61B-SEC61G*) transfiziert, das für die beiden anderen Untereinheiten des heterotrimeren Sec61-Komplexes kodiert. Dadurch sollte der Einbau von Sec61 α (V85D) stimuliert werden, da bereits ein verringerter Sec61 β -Gehalt in Zusammenhang mit der Expression von *SEC61A1(V85D)* gefunden wurde (s. Abbildung 3.2, C).

Die erfolgreiche Synthese der Sec61-Untereinheiten wurde mittels Western Blot und immunologischer Detektion von Sec61 α und Sec61 β nachgewiesen und zusammenfassend für alle Versuche aus Kapitel 3.1.2 dargestellt (Abbildung 4.5, A). Es zeigte sich bei der Expression von *SEC61A1* und *SEC61B-SEC61G* ein Sec61 α -Gehalt von 286 ± 32 %, demgegenüber ein Sec61 α -Gehalt von 224 ± 15 % bei Expression von *SEC61A1(V85D)* und *SEC61B-SEC61G* stand.

Neben dieser 2- bis 3-fachen Überexpression der porenbildenden Sec61 α -Varianten, diente der Gehalt an Sec61 β , wie in 4.1.1.2.1 gezeigt, als Maß für die Assemblierung funktioneller heterotrimerer Sec61-Komplexe. Der Sec61 β -Gehalt betrug im Mittel 190 ± 55 % wenn die cDNA des Sec61 α -Wildtyps zur Expression gebracht wurde und 145 ± 41 % im Falle der Sec61 α (V85D)-Mutante. Somit kann von einem 1,5- bis 2-fach erhöhten Gehalt vollständig assemblierter Sec61-Komplexe ausgegangen werden.

Dieses Bild wurde nun noch um die Proteine BiP und den Nukleotidaustauschfaktor Grp170 ergänzt, die beide im Falle der UPR induziert werden (siehe Kapitel 2.3.5.2). Dabei waren nach Expression der cDNA von Sec61 α -Wt die beiden Proteine unverändert (BiP 118 ± 13 % und Grp170 116 ± 20 %), wohingegen die Expression von *SEC61A1(V85D)* zu einem merklichen Anstieg führte (BiP 160 ± 21 %, Grp170 139 ± 30 %). Die Lebendzellzahlen aller Versuche unter diesen Bedingungen zeigten zwischen den drei betrachteten Populationen keine Unterschiede (Abbildung 4.5, F).

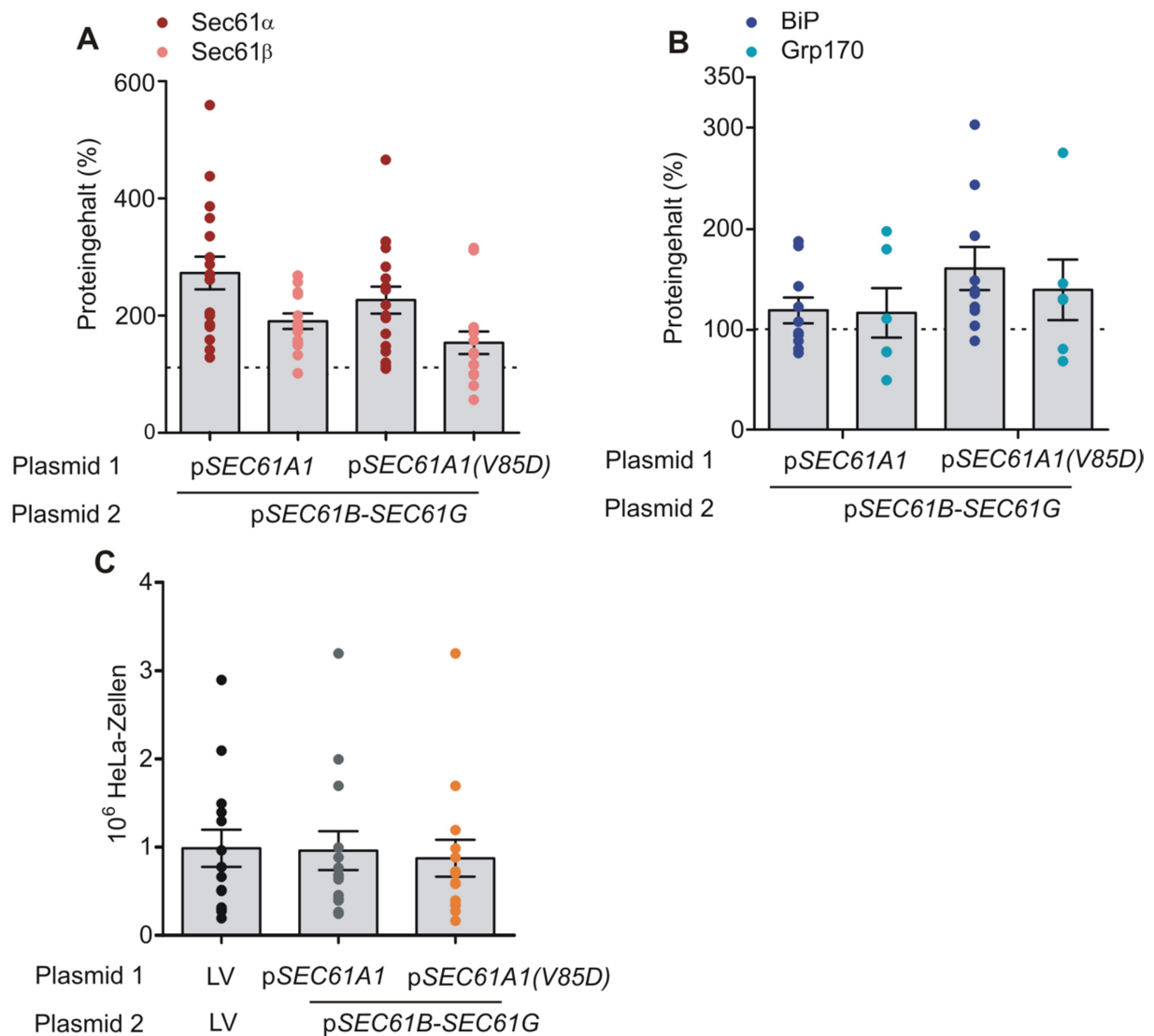


Abbildung 4.5: Proteingehalt von Sec61 α , Sec61 β sowie der stressinduzierten Proteine BiP und Grp170 nach transgener Expression von SEC61A1(V85D) sowie SEC61B-SEC61G in HeLa-Zellen. Proteingehalt von Sec61 α und Sec61 β (A) bzw. BiP und Grp170 (B) im Verhältnis zur Kontrolle (LV + LV; entspricht eingezeichneter Linie). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladekontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 15-17 (Sec61 α und Sec61 β) bzw. 6-10 (BiP und Grp170) Replikaten. C Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulation nach 48 h Expression von LV + LV oder SEC61A1 bzw. SEC61A1(V85D) + SEC61B-SEC61G. Die Zellen wurden gerntet und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10⁶) aus 14 Einzelexperimenten. (LV = Leervektor, SEM = engl. "standard error of the mean")

4.1.2.2. Einfluss von Sec61 α (V85D) auf die Ca²⁺ Homöostase

Einfluss von Sec61 α (V85D) auf den cytosolischen Ca²⁺-Gehalt

Die Veränderungen des cytosolischen Ca²⁺-Gehaltes nach Applikation von Tg zur Ca²⁺-Entleerung des ER dieser genannten Zellen sind in Abbildung 4.6, A und B gezeigt. Als Kontrollpopulation dienten mit den jeweiligen Leervektoren transfizierte HeLa-Zellen (LV +

LV). Zellen, die vor endogenem Hintergrund zusätzlich plasmidgetrieben die Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ synthetisierten, zeigten entsprechend dem erhöhten Gehalt an Sec61-Wt-Komplexen (Abbildung 4.6, E) einen um ca. 30 % vergrößerten Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER (132 % der Kontrollpopulation). Jene Zellen zeigten zusätzlich eine höhere Ca²⁺-Konzentration in allen intrazellulären Ca²⁺-Pools, die nach Iono-Applikation freigesetzt wurden (110 % der Kontrollpopulation) (Abbildung 4.6, C und D). Wurden die HeLa-Zellen in gleicher Weise mit der mutierten Form der Sec61 α -Untereinheit transfiziert, war im Gegensatz dazu sowohl ein geringerer Pool an Tg-mobilisierbaren Ca²⁺, als auch eine niedrigere Gesamtkonzentrationen an Ca²⁺ in der ganzen Zelle zu beobachten. Beide Effektoren führten zu einem im Vergleich zur Kontrollpopulation um 20 % verringerten Ca²⁺-Gehalt. Dass die exprimierten Sec61-Untereinheiten den Proteingehalt erhöhten, wurde durch einen Western Blot und die immunologische Detektion mit Antikörpern gegen Sec61 α und Sec61 β nachgewiesen. Es zeigte sich bei der Expression von pSEC61A1 und pSEC61B-SEC61G ein Sec61 α -Gehalt von 255 \pm 37 %, demgegenüber ein Gehalt von 219 \pm 21 % Sec61 β stand. Wurden die beiden Plasmide pSEC61A1(V85D) und pSEC61B-SEC61G exprimiert, lag der Gehalt von Sec61 α bei 232 \pm 35 % und von Sec61 β bei 183 \pm 35 % (Abbildung 4.6, E). Die Lebendzellzahlen aller drei beobachteten Zellpopulationen unterschieden sich nicht wesentlich (Abbildung 4.6, F). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der SEC61A1(V85D)-Mutante schwächer ausfiel als im vergleichbaren Versuchsaufbau mit SEC61A1-Wt. Trotz der im Vergleich zum Wildtyp schwächeren Synthese der SEC61A1(V85D)-Mutante, konnte hier ein starker Phänotyp beobachtet werden, der sich in einer verringerten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration im Vergleich zur Kontrollpopulation manifestierte. Diese Beobachtungen reihen sich in die Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe zur Komplementation einer endogenen Sec61 α -Depletion mit plasmidgetriebener Expression von SEC61A1(V85D) ein (Kapitel 4.1.1.2). Somit wurde ein weiterer Hinweis auf den Einfluss der Porenringmutation V85D von Sec61 α auf die Ca²⁺-Homöostase erbracht.

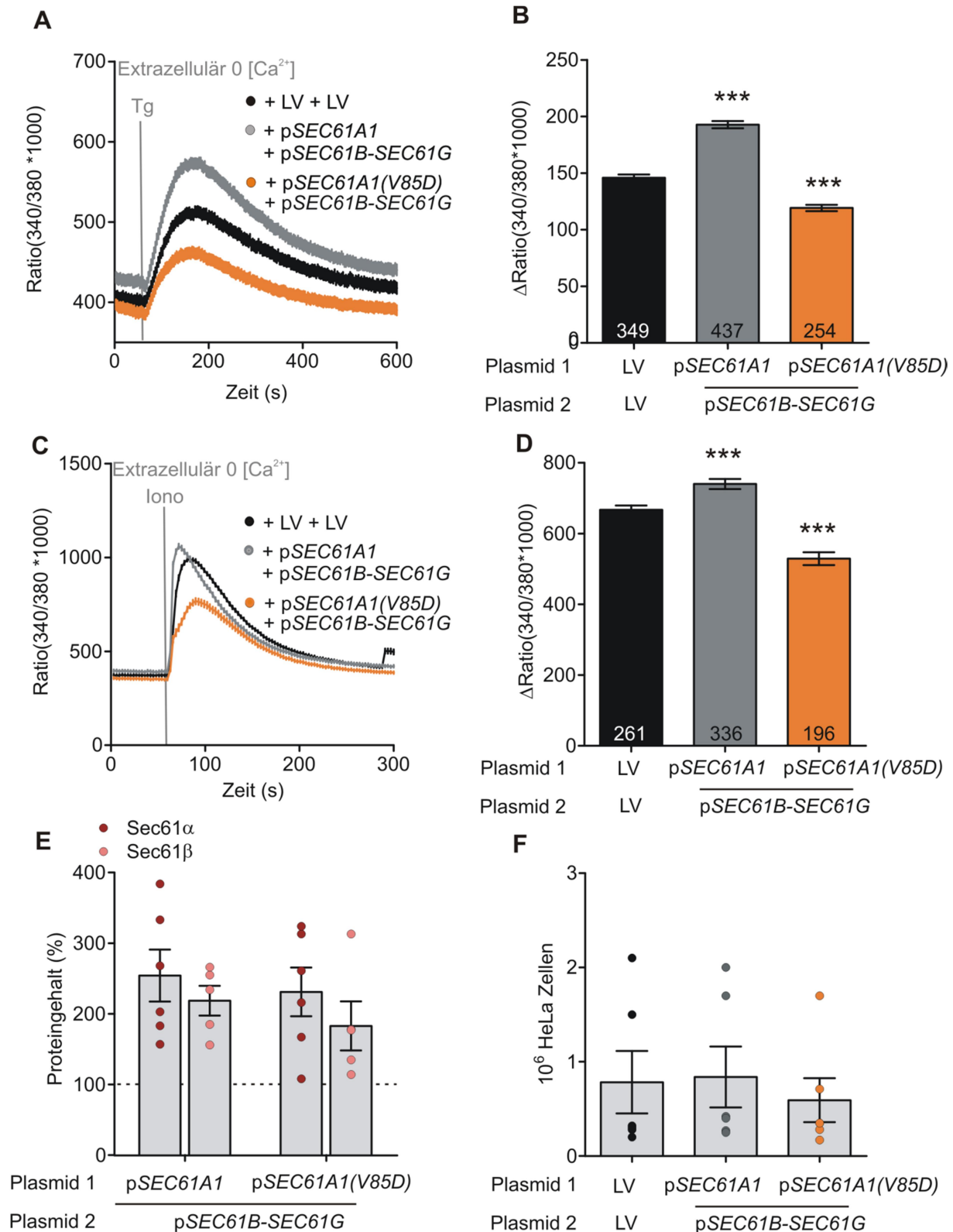


Abbildung 4.6: Effekt der heterologen Expression von *SEC61A1(V85D)* sowie *SEC61B-SEC61G* auf den cytosolischen Ca²⁺-Gehalt in HeLa-Zellen. A-D Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und für 42 h inkubiert (3.2.1.4.2). Dann wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM (4 μM) beladen und anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in Ca²⁺-freier Lösung (ES + EGTA) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Die Effektoren wurden nach 1 min „online“ appliziert und die Fura-2-Fluoreszenz für 9 min (Tg, EK 1 μM, (A)) bzw. für 4 min (Iono, EK 5 μM,

(C)) in Echtzeit verfolgt. **B+D** Statistische Auswertung der in A und C aufgezeichneten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Balkendiagramme entsprechen den Differenzen aus basaler und maximaler Ca^{2+} -Konzentration \pm SEM nach Applikation des jeweiligen Effektors. Am Fuße der Balken ist die Anzahl zur Berechnung herangezogenen Einzelzellen angegeben (biologische Replikate: $n = 5$ (Tg), $n = 4$ (Iono)). Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei p-Werte $\leq 0,001$ als hoch signifikant (***) definiert wurden. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation (LV + LV). **E** Sec61 α -Proteingehalt im Verhältnis zur Kontrolle (LV + LV). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren Sec61 α -und Sec61 β -Gehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladkontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 5-6 Replikaten. **F** Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulation nach 42 h Expression von *SEC61A1* oder *SEC61A1(V85D)* sowie *SEC61B-SEC61G*. Die Zellen wurden geerntet und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10^6) aus 5 Einzelexperimenten. (LV = Leervektor, Tg = Thapsigargin, Iono = Ionomycin, EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean", ES = engl. "External solution") (A-D veröffentlicht in Schubert et al., 2018)

Einfluss von Sec61 α (V85D) auf die Mechanismen des SOCE

Der SOCE ist ein zellulärer Mechanismus, um die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase zu steuern und zu regulieren (Putney, 1990, Putney et al., 2001). Wie in Kapitel 2.3.2 ausführlich beschrieben, nutzen Zellen die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol als vielfältiges Signal, welches mit einer Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem ER-Speicher und dessen Entleerung einhergeht. Im Zuge des SOCE wird dieser Verlust an Ca^{2+} detektiert und eine Auffüllung der intrazellulären Speicher durch Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran bewirkt. In der folgenden Versuchsreihe wurde mittels „Live Cell Calcium Imaging“ untersucht, ob die Synthese der Sec61 α (V85D)-Mutation in HeLa-Zellen zu einer permanenten Aktivierung des SOCE und somit zu einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase führt. Im Gegensatz zu vorangehenden Messungen in Ca^{2+} -freiem Medium (engl. „External solution“ (ES) + EGTA) wurden hierzu die Zellen in ES + 1 mM CaCl_2 aufgenommen. Diese extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM entspricht physiologischen Bedingungen. In Abbildung 4.7, B sind die basalen Ca^{2+} -Konzentrationen gegenübergestellt. Nach 5 min wurde das freie Ca^{2+} in der extrazellulären Lösung mit EGTA chelatiert, um eine Ca^{2+} -freie Umgebung zu schaffen und ein vereinheitlicht niedriges Ca^{2+} -Niveau innerhalb der Zellen zu generieren. Durch anschließende Applikation von Ca^{2+} (EK 6,5 mM) wurde die Ca^{2+} -Aufnahme aus dem umgebenen Medium forciert, wobei Höhe und Kinetik des Verlaufs Aufschluss über eine Praktivierung des SOCE geben. Das jeweilige Delta vor und nach Applikation der hohen Ca^{2+} -Konzentration wurde in Abbildung 4.7, C gebildet und auf potenzielle Unterschiede zwischen den Zellpopulationen untersucht. In Analogie zu den Versuchen aus Abbildung 3.6 wurden drei Zellpopulationen gegenübergestellt: die Kontrollpopulation nach Transfektion

mit zwei Leervektoren, sowie die Transfektionen von *SEC61A1* bzw. *SEC61A1(V85D)* jeweils mit *SEC61B-SEC61G*. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede, weder im basalen cytosolischen Ca^{2+} -Level noch bei der Betrachtung des prä-aktivierten SOCE. Der Sec61 α -Gehalt in den beiden zur Analyse herangezogenen Versuchen betrug bei *SEC61A1* + p*SEC61B-SEC61G* im Mittel 420 % und bei *SEC61A1(V85D)* + *SEC61B-SEC61G* im Mittel 264 %. Die Synthese von Sec61 β zeigte sich, wie bereits zuvor beobachtet, weniger ausgeprägt mit 175 % bei der Expression von *SEC61A1* und 133 % bei der Expression von *SEC61A1(V85D)* (Abbildung 4.7, D). Die Expression beider *SEC61A1*-Varianten führte zu einer leichten Verringerung der Lebendzellzahlen im Vergleich zur Kontrollpopulation (LV + LV 1,35 Mio; p*SEC61A1* + p*SEC61B-SEC61G* 0,84 Mio; p*SEC61A1(V85D)* + p*SEC61B-SEC61G* 0,9 Mio) (Abbildung 4.7, D).

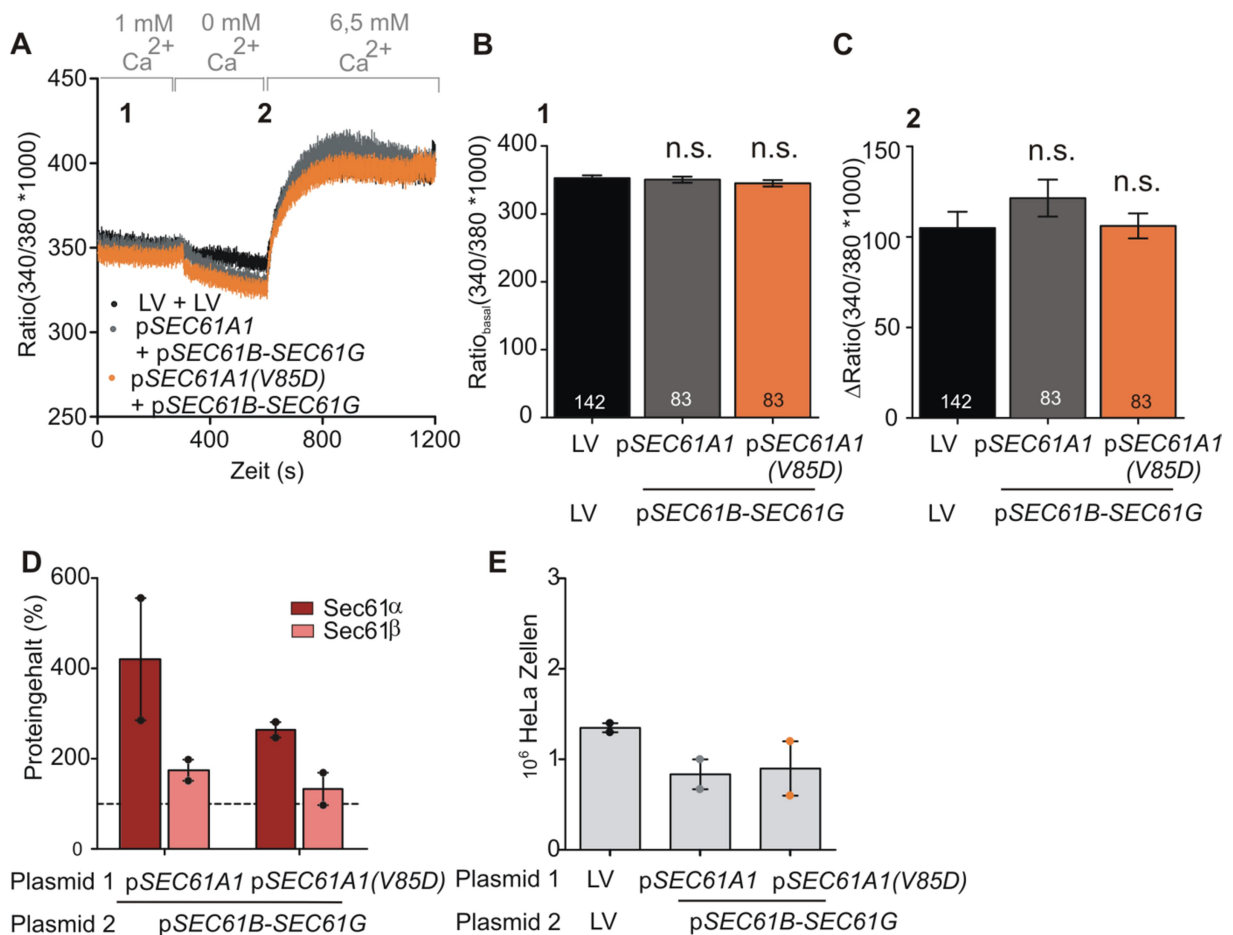


Abbildung 4.7: Effekt der heterologen Expression von *SEC61A1(V85D)*, sowie *SEC61B-SEC61G* auf den SOCE. A-C Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und für 42 h inkubiert (3.2.1.4.2). Dann wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM (4 μM) beladen und anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in ES + CaCl_2 (EK 1 mM) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Nach 5 min wurden durch die Zugabe von ES + EGTA (EK 0,5 mM) alle Ca^{2+} -Ionen chelatiert und eine Ca^{2+} -freie Messlösung generiert. Nach weiteren 5 min wurde ES + CaCl_2 appliziert (EK 6,5 mM). A Kinetische Aufnahmen der cytosolischen Ca^{2+} -Level. Gezeigt sind die Mittelwerte aller Zellen \pm SEM. Statistisch ausgewertet wurden sowohl die basale Ca^{2+} -Konzentration (1), als auch die

Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vor und nach Applikation von Ca^{2+} (2), was jeweils in **B** und **C** dargestellt ist. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler SEM. Am Fuße der Balken ist die Anzahl zur Berechnung herangezogenen Einzelzellen angegeben ($n = 2$ biologische Replikate). Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei p-Werte $> 0,05$ als nicht signifikant (n.s.) definiert wurden. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation (LV + LV). **D** Proteingehalt von Sec61 α und Sec61 β im Verhältnis zur Kontrolle (LV + LV; entspricht eingezeichneter Linie). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren Sec61 α und Sec61 β -Gehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladeprotein mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 2 Replikaten. **E** Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulation nach 48 h Expression von LV + LV oder pSEC61A1 bzw. pSEC61A1(V85D) + pSEC61B-SEC61G. Die Zellen wurden geerntet und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10^6) aus 2 Einzelexperimenten. (LV = Leervektor, EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean", ES = engl. „External solution“)

Einfluss von Sec61 α (V85D) auf die verschiedenen intrazellulären Ca^{2+} -Pools

Obwohl das ER das intrazelluläre Hauptspeicherorganell für Ca^{2+} darstellt, kommt Ca^{2+} auch in anderen Organellen vor, wie den Mitochondrien (siehe Kapitel 2.3.5.1). Vor allem vor dem Hintergrund des bereits beobachteten Phänotyps der Sec61 α (V85D)-Mutante, die augenscheinlich zu einem verringerten Ca^{2+} -Gehalt im ER führt, stellte sich die Frage nach deren Einfluss auf die übrigen intrazellulären Ca^{2+} -Pools. Hierzu wurde in einem zweistufigen Protokoll zuerst die Ca^{2+} -Entleerung des ERs mittels Tg provoziert ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$), um dann im zweiten Schritt durch zusätzliche Applikation von Iono den Anteil an Ca^{2+} aus den übrigen Organellen abzubilden ($\text{Ca}^{2+}_{\text{intrazellulär}} - \text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$) (Abbildung 4.8, A). Verglichen wurden vor endogenem Hintergrund erneut die plasmidgetriebene Expression des heterotrimeren Sec61-Komplexes mittels zweier Plasmide: zum einen pSEC61A1 + pSEC61B-SEC61G und zum anderen pSEC61A1(V85D) + pSEC61B-SEC61G. Als Kontrollpopulation dienten HeLa-Zellen, die mit zwei Leervektoren transfiziert wurden. Im Falle der Population pSEC61A1 + pSEC61B-SEC61G lag der mittels Western Blot ermittelte Sec61 α -Gehalt bei 212 ± 46 % und der Sec61 β -Gehalt bei 189 ± 26 % (Abbildung 4.8, C). Für pSEC61A1(V85D) + pSEC61B-SEC61G lagen die entsprechenden Werte bei 239 ± 112 % und 188 ± 63 %. Die Lebendzellzahlen der drei verschiedenen Behandlungen wiesen keinerlei Unterschiede auf (Abbildung 4.8, D). Für den ersten Teil der Ca^{2+} -Messung, der analog den Messungen aus Abbildung 4.6 erfolgte, ergab sich für beide exprimierten SEC61A1-Plasmide eine signifikante Verringerung des mobilisierbaren ER- Ca^{2+} -Pools, welche für SEC61A1(V85D) jedoch stärker ausgeprägt war. Für den zweiten Teil, der die Mobilisierung von Ca^{2+} aus den übrigen Ca^{2+} -Pools repräsentiert, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrolle. Auffällig war jedoch, dass im Gegensatz zu den beiden anderen Populationen

sich die beiden Deltas für *SEC61A1(V85D)+ SEC61B-SEC61G* annäherten, d.h. dass der Anteil des Ca^{2+} , das aus Nicht-ER-Pools mobilisiert wurde, einen größeren Anteil ausmachte (Abbildung 4.8, B).

Mit Ausnahme des dominant-negativen Effekts der *Sec61 α (V85D)*-Mutante auf die Ca^{2+} -Homöostase des ER, der in diesen Versuchen nochmals bestätigt wurde, wurden keine signifikanten Veränderungen bezüglich weiterer intrazellulärer Ca^{2+} -Pools beobachtet.

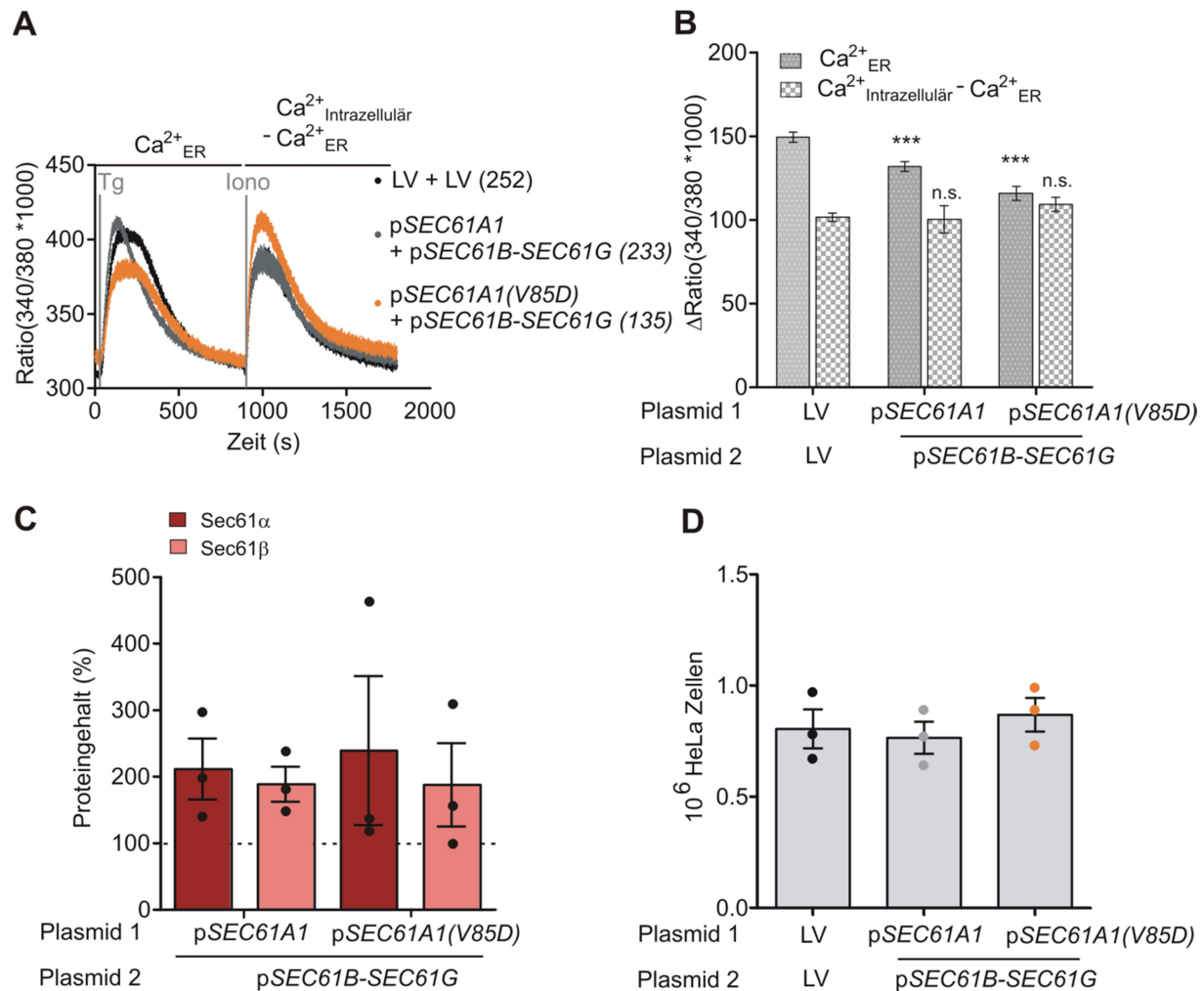


Abbildung 4.8: Effekt der heterologen Expression von *SEC61A1(V85D)* sowie *SEC61B-SEC61G* auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Pool-Verteilung. **A, B** Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und für 42 h inkubiert (3.2.1.4.2). Dann wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM (4 μM) beladen und anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in Ca^{2+} -freier Lösung (ES + EGTA) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Die Effektoren wurden nacheinander „online“ appliziert, nach 1 min Tg (EK 1 μM) zur Mobilisierung des Ca^{2+} -Pool des ERs ($\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$) und nach 15 min Iono (EK 5 μM) zur Freisetzung des restlichen intrazellulären Ca^{2+} -Pools kam ($\text{Ca}^{2+}_{\text{intrazellulär}} - \text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$). In A sind die beiden Betrachtungszeiträume markiert, deren Veränderungen in B einzeln aufgezeigt sind. In Klammern hinter der Legendenbeschriftung ist die Anzahl der analysierten Zellen für die jeweilige Behandlung angegeben (n = 4 biologische Replikate). **B** Statistische Auswertung der in A gezeigten kinetischen Messung. Gebildet wurden jeweils die Differenzen aus Startpunkt der Messung und Veränderung nach Applikation von entweder Tg oder Iono. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei galt:

nicht signifikant (n.s.) = p-Werte $\geq 0,05$, *** = p-Werte $\leq 0,001$. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation. **C** Proteingehalt von Sec61 α und Sec61 β im Verhältnis zur Kontrolle (LV+ LV; entspricht eingezeichneter Linie). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren Sec61 α und Sec61 β -Gehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladekontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 3 Replikaten. **D** Lebendzellzahlen der verschiedenen Zellpopulation nach 48 h Expression von LV + LV oder *SEC61A1* bzw. *SEC61A1(V85D)* + *SEC61B-SEC61G*. Die Zellen wurden geerntet und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Angegeben ist die Zellzahl (in 10^6) aus 2 Einzelexperimenten. (LV = Leervektor, Tg = Thapsigargin, Iono = Ionomycin, EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean", ES = engl. "External solution")

4.1.2.3. Einfluss von Sec61 α (V85D) auf den Proteintransport ins ER

In Anlehnung an den dominant-negativen Effekt der Sec61 α (V85D)-Mutation auf die Ca²⁺-Homöostase, stellte sich die Frage nach deren Auswirkung auf den Proteintransport. Für eine siRNA-vermittelte Sec61 α -Depletion mit *SEC61A1(V85D)*-Komplementation, wurde eine Beeinträchtigung des ER-Imports von Präprolaktin beobachtet (Schubert et al., 2017). Dies betraf spezifisch den Sec61 α -abhängigen Proteintransport, da eine korrekte Insertion von Sec61 β als „tail-anchor“-Protein unter Expression der Mutante erfolgte. Weiterhin zeigt dies, dass die präparierten semipermeabilisierten (SP)-Zellen dieser Zellpopulation eine zu Kontrollzellen vergleichbare ER-Integrität aufwiesen.

Um der heterozygoten Patientensituation näher zu kommen, wurde in der folgenden Versuchsreihe zum Proteintransport, eine heterologe Expression von *SEC61A1(V85D)* ohne Depletion des endogenen Sec61 α , analog zu den Ca²⁺-Messungen in 4.1.2.2, durchgeführt. Zur Untersuchung des co- (co, [Präprolaktin, Präproapelin, ERj3 und Kappa] Abbildung 4.9), wie auch posttranslationalen (post, [Präproapelin, Sec61 β] Abbildung 4.10) Proteintransports wurden entsprechende Modellsubstrate ausgewählt. Die *in vitro* Synthese der jeweiligen Vorläuferproteine wurde in Kaninchen-Retikulozytenlysat in An- (co) bzw. Abwesenheit (post) der SP-Zellen durchgeführt, um entsprechende Transportbedingungen zu simulieren. Im Falle der post-Bedingungen wurde nach Initiation der Polypeptidsynthese in Kaninchen-Retikulozytenlysat die Freisetzung der Polypeptidkette vom Ribosom durch Zugabe von Puromycin veranlasst um im zweiten Schritt, zeitlich getrennt davon, den Transport der Polypeptide in das ER der SP-Zellen zu ermöglichen. Als Kontrollpopulation dienten HeLa-Zellen, die mit den jeweiligen Leervektoren transfiziert waren. Der Transport in dieser Kontrollpopulation wurde als 100 % definiert (gestrichelte Linie) und die beiden Testpopulationen (p*SEC61A1* + p*SEC61B-SEC61G* und p*SEC61A1(V85D)* + p*SEC61B-SEC61G*) in Relation dazu betrachtet. Für das klassische co-Modellsubstrat Präprolaktin ließ sich für p*SEC61A1* + p*SEC61B-SEC61G* eine gesteigerte Transporteffizienz von 122 ± 16 %

beobachten, welche mit 139 ± 20 % unter der Expression von p*SEC61A1(V85D)*+ p*SEC61B-SEC61G* noch stärker ausgeprägt war (Abbildung 4.9, A). Ähnlich verhielt sich Präproapelin im Transport unter co-Bedingungen, welcher mit 127 ± 14 % (p*SEC61A1*+ p*SEC61B-SEC61G*) und 136 ± 23 % (p*SEC61A1(V85D)*+ p*SEC61B-SEC61G*) ebenfalls effizienter ablief (Abbildung 4.9, C). Auch für das Substrat Kappa wurde eine gesteigerte Transporteffizienz unter Expression beider Sec61 α -Varianten beobachtet (133 ± 26 % für Wt und 128 ± 21 % für V85D) (Abbildung 4.9, G). Lediglich der cotranslationale Transport von ERj3 verlief weitgehend unbeeinflusst nach Expression der beiden Sec61 α -Varianten (110 ± 16 % für den Wildtyp und 107 ± 7 % für die V85D-Mutante) (Abbildung 4.9, E). Zusammenfassend ließ sich nach Expression ungeachtet welcher *SEC61A1*-Variante ein erhöhter cotranslationaler Proteintransport beobachten.

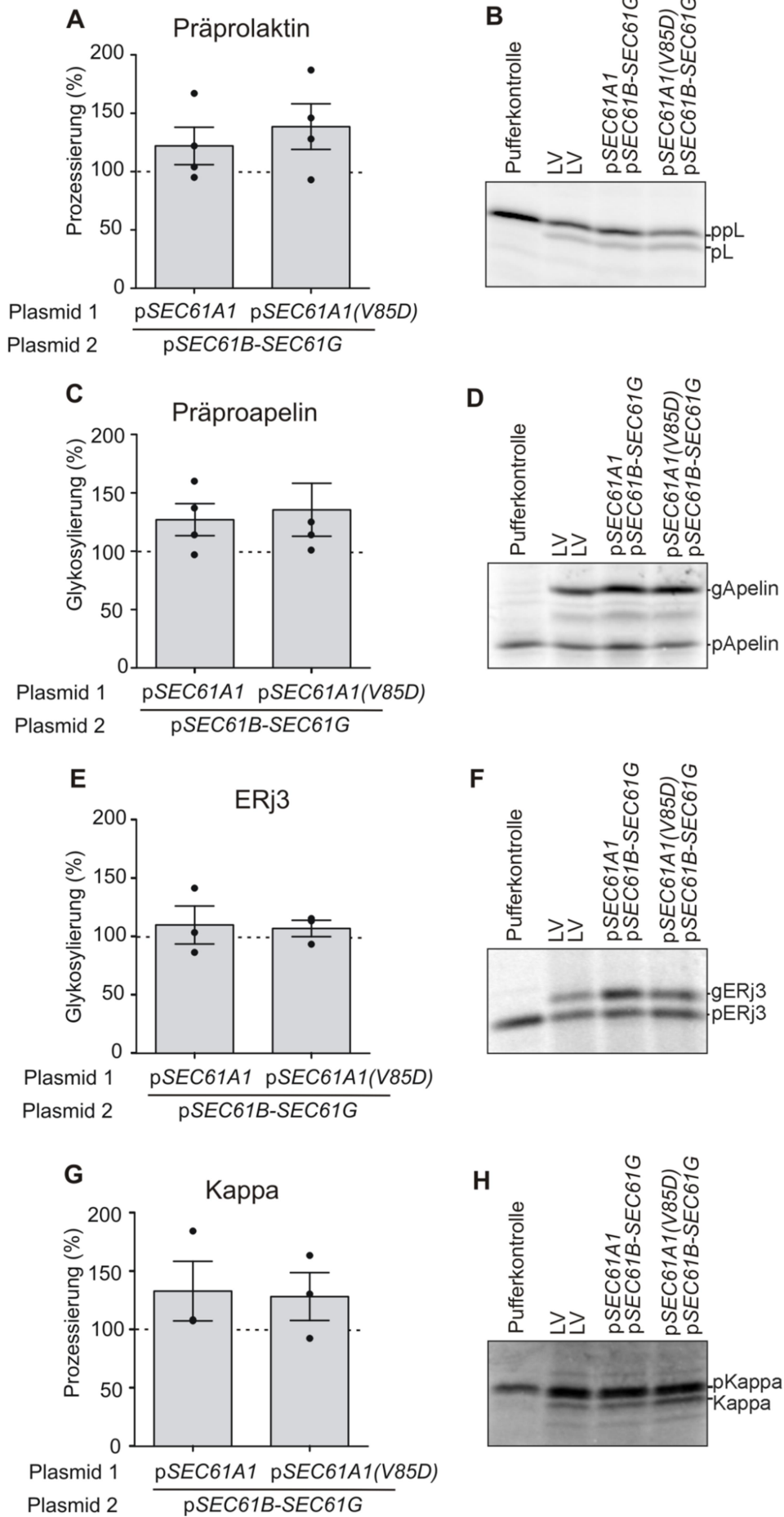


Abbildung 4.9: Effekt der heterologen Expression von *SEC61A1(V85D)*, sowie *SEC61B-SEC61G* auf den cotranslationalen *in vitro* Proteintransport in das ER von SP-Zellen. A-H Die ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und für 42 h inkubiert (3.2.1.4.2). Anschließend wurden die Zellen geerntet, automatisiert gezählt (3.2.1.3) und unter Verwendung von Digitonin semipermeabilisiert (3.2.1.6). Die *in vitro* Synthese und der Transport in das ER der SP-Zellen fand gleichzeitig für 60 min unter Verwendung unterschiedlicher SP-Zellkonzentrationen (Tabelle 3.11) in Retikulozytenlysats statt, was co-Transportbedingungen entsprach. Als Kontrolle diente jeweils KHM-Puffer. Untersucht wurde der Transport von Präprolaktin (A,B), Präproapelin (C, D), ERj3 (E, F) und Kappa (G, H). Anschließend wurden die Transportansätze mit 2 x Lämmli-Puffer versetzt, bei 56 °C erhitzt und einer SDS-PAGE unterzogen (3.2.3.1). Die Gele wurden anschließend fixiert, getrocknet und autoradiographisch analysiert (3.2.3.12). Die Balken in A, C, E und G entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. Die Punkte repräsentieren die Einzelwerte aus 2-4 Experimenten. Die gestrichelte Linie entspricht dem Referenzwert der Kontrollpopulation (LV + LV). Um die Transporteffizienz (Prozessierung oder Glykosylierung) zu bestimmen wurde der prozentuale Anteil der transportierten Form an dem gesamten Protein (Vorläufer und transportierte Form) ermittelt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Typhoon Trio und ImageQuant (3.2.3.13). B, D, F und H zeigen repräsentative Autoradiogramme der Autoradiographie. (LV = Leervektor, SEM = engl. "standard error of the mean", p = Vorläuferpolypeptid, g = glykosyliertes Polypeptid)

In Hinblick auf den posttranslationalen Proteintransport wurden weiterhin zwei der Substrate unter posttranslationalen Bedingungen untersucht. Zum einen Präproapelin, das als kleines sekretorisches Vorläuferprotein die Fähigkeit besitzt sowohl co- als auch post-Transportwege zu nutzen (Haßdenteufel et al., 2018). Zum anderen Sec61 β , das als „tail-anchor“-Protein unabhängig von Sec61 in die ER-Membran inseriert und somit als Kontrolle für vorhandene ER-Membranintegrität gelten kann. Während die Insertion von Sec61 β wie erwartet in allen betrachteten Populationen gleich effizient verlief (Abbildung 4.10, A), erfolgte der Transport von Präproapelin in den *SEC61A1*-exprimierenden Populationen um ~80 % effizienter im Vergleich zur Kontrollpopulation (181 % für den Wildtyp und 173 ± 38 % bei der V85D-Mutante) (Abbildung 4.10, C). Dieser post-Transport steht somit im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen zum Transport unter co-Bedingungen. Bei Betrachtung des Sec61 α -Gehaltes (Abbildung 4.10, E) fiel auf, dass in der Population p*SEC61A1* + p*SEC61B-SEC61G* 251 ± 29 % Sec61 α vorlagen und, wie bereits zuvor beobachtet dies mit 186 ± 16 % in der Population, in der die mutierte Variante von *SEC61A1* exprimiert wurde, geringer war. Gleiches galt für Sec61 β (Abbildung 4.10, F). Hier ergab die Auswertung einen Proteingehalt von 168 ± 23 % für den Wildtyp und 120 ± 20 % für die V85D-Mutante.

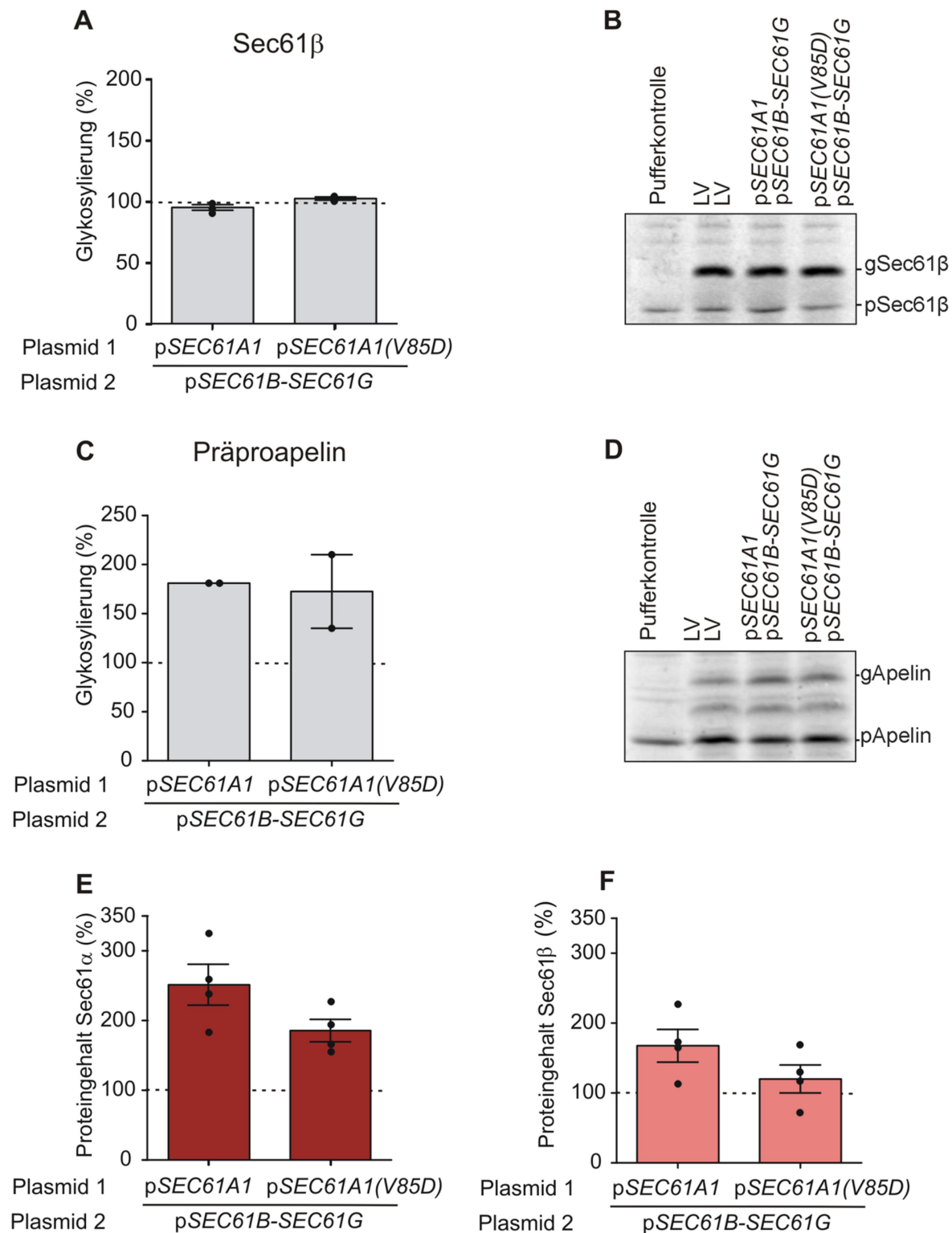


Abbildung 4.10: Effekt der heterologen Expression von *SEC61A1(V85D)*, sowie *SEC61B-SEC61G* auf den posttranslationalen *in vitro* Proteintransport in das ER von SP-Zellen. A-F Die ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und für 42 h inkubiert (3.2.1.4.2). Anschließend wurden die Zellen geerntet, automatisiert gezählt (3.2.1.3) und unter Verwendung von Digitonin semipermeabilisiert (3.2.1.6). Die *in vitro* Synthese der Substrate in Retikulozytenlysat wurde nach 15 min (Präproapelin) bzw. 30 min (Sec61β) durch Puromycin gestoppt. Anschließend wurden entweder 32 % (Präproapelin) oder 16 % (Sec61β) SP-Zellen hinzugegeben und der Transport in das ER für 20 min (Präproapelin) bzw. 30 min (Sec61β) erlaubt.

Als Kontrolle diente jeweils KHM-Puffer. Untersucht wurde der Transport von Sec61 β (A,B) und Präproapelin (C,D). Anschließend wurden die Transportansätze abzentrifugiert, das Pellet in 1 x Lämmli-Puffer aufgenommen, bei 56 °C erhitzt und einer HS-SDS-PAGE unterzogen (3.2.3.2). Die Gele wurden anschließend fixiert, getrocknet und autoradiographisch analysiert (3.2.3.12). Die Balken in A und C entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. Die Punkte repräsentieren die Einzelwerte aus 2-3 Experimenten. Die gestrichelte Linie entspricht dem Referenzwert der Kontrollpopulation (LV + LV). Um die Transporteffizienz (Glykosylierung) zu bestimmen wurde der prozentuale Anteil der transportierten Form an dem gesamten Protein (Vorläufer und transportierte Form) ermittelt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Typhoon Trio und ImageQuant. B und D zeigen repräsentative Autoradiogramme der Autoradiographie (3.2.3.12). E,F Proteingehalt von Sec61 α (E) und Sec61 β (F) im Verhältnis zur Kontrolle (LV + LV; entspricht gestrichelter Linie). Die Zellen wurden zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladeprotein mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant. Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 4 Replikaten. (LV = Leervektor, SEM = engl. "standard error of the mean", p = Vorläuferpolypeptid, g = glykosyliertes Polypeptid)

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sich trotz einer geringeren Synthese von Sec61 α und Sec61 β nach Expression der *SEC61A1(V85D)*-Mutante vor endogenem Hintergrund im Vergleich zum Wt, die dominant-negativen Effekte manifestieren und beobachtet werden können. Dies gilt zum einen für die veränderte Ca²⁺-Homöostase dahingehend, dass die Zellen bei Anwesenheit von Sec61 α (V85D) konstitutiv Ca²⁺ verlieren (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.6), wodurch sich eine an diese Situation angepasste neue Homöostase einpendelt, die einen niedrigeren Gradienten von intrazellulärem Hauptspeicher und Cytosol aufweist. Zum anderen ergeben sich Veränderungen im co-Proteintransport (Abbildung 4.9) und es stellt sich ein konstitutiver ER-Stresslevel ein, für welche die Erhöhung von BiP und Grp170 spricht (Abbildung 4.5).

4.2. Identifikation von SLC35B1 als ATP_{ER}-Carrier und Modell der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstroms für die Energieversorgung des ER

Innerhalb der SLC-Proteine (engl. „solute carrier“), die sich aus 52 Familien und 195 Proteinen zusammensetzen, befinden sich eine ganze Reihe bedeutender Carrierproteine wie beispielsweise die GLUT-Zuckertransporter (SLC2A) und die mitochondrialen Carrier (SLC25) (Hediger et al., 2013). Bereits seit langem wird von der Existenz eines ATP-Carriers in der ER-Membran von Säugern ausgegangen (Clairmont et al., 1992, Mayinger und Meyer, 1993), jedoch ist die Identität eines solchen Carriers bisweilen ungeklärt. Auf der molekularen Identitätssuche scheint die SLC-Familie, insbesondere nach der Entdeckung eines ATP/ADP-Carriers der Pflanze *A. thaliana*, ER-ANT1 (Leroch et al., 2008), der ein Mitglied der mitochondrialen Carrier-Familie (SLC25) ist, ein guter Anhaltspunkt zu sein. Eine weitere Rationale auf dem Weg zu einem humanen Kandidaten, der den ATP-Transport ins ER vermittelt, ist seine Lokalisierung im ER, sowie seine Coexpression mit dem hoch abundanten Protein des ER-Lumens, BiP, das für die Ausübung seiner zahlreichen Funktionen auf eine konstante ATP-Verfügbarkeit angewiesen ist (siehe Kapitel 2.2.2.1). Datenbankanalysen von *GenesLikeMe* (<https://genecards.weizmann.ac.il/v3/index.php?path=/GenesLikeMe>) mit diesen Kriterien führten zu einem Kandidatenprotein, das von dem Gen *SLC35B1* (UGTrell1) kodiert wird. Die Untersuchung dieses Proteins ist Gegenstand des zweiten Teils dieser Arbeit und gliedert sich in die Etablierung der siRNA-vermittelten Knockdown-Strategie für SLC35B1, sowie die funktionelle Charakterisierung in Hinblick auf den ATP-Transport. Ferner wird das Modell einer Regulationsroute entwickelt, die die intrazelluläre ATP- und Ca²⁺-Homöostase miteinander verbindet und Sec61 als mögliche Schaltstelle charakterisiert.

4.2.1. Isoformen und Genprodukte von SLC35B1

SLC35B1 (UniProtKB/Swiss-Prot: P78383.1) besitzt mehrere mRNA-Varianten, die zu verschiedenen Isoformen des Proteins führen. In Abbildung 3.11 A sind schematisch die verschiedenen Isoformen dargestellt. Dabei besitzt die Isoform 1 (SLC35B1) 322 Aminosäuren. Hiervon unterscheidet sich die Isoform 2 (SLC35B1-Iso2) nur durch eine N-terminale Verlängerung von 37 Aminosäuren (MRPLPPVGDVRLWTSPPPPLLPVPVVS GSPVGS SGR L). Die dritte Isoform (SLC35B1-

Iso3) hat im Vergleich zur Isoform 1 einen um 78 Aminosäuren verkürzten N-Terminus, der auch zwei TMD einschließt, bei gleichbleibendem C-Terminus. Sie besitzt 255 Aminosäuren. Alle Isoformen besitzen ein Di-Lysin-Motiv an der Stelle -4 und -5, das auf eine ER-Lokalisation hindeutet und für TypI-Transmembranproteine als ER-Retentionssignal dienen kann. Zusätzlich trägt die Isoform 2 zwei phosphorylierbare Serine an den Stellen 15 und 29. Abbildung 4.11, B zeigt den Nachweis von SLC35B1-Iso2 mittels Western Blot und immunologischer Detektion mit Hilfe eines SLC35B1-spezifischen Antikörpers in caninen RM-Extrakten, sowie den Nachweis der heterolog exprimierten humanen SLC35B1-Isoform 2 in *E. coli*-Membranpräparationen im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollzellen (gelb). Die Isoform 1 migriert möglicherweise auf derselben Höhe wie eine unspezifische Bande in den *E. coli*-Membranpräparationen (rot). Weiterhin wurde aus HeLa-Zellen präparierte RNA in cDNA umgeschrieben und als Template für eine PCR genutzt, für die Primer nach unten stehendem Schema zum Einsatz kamen (Abbildung 4.11, C). Da die DNA-Sequenzen mit Ausnahme des 5'-Bereichs der Isoform 2 für die Isoformen 1 und 2 gleich sind und die Primerkombinationen BI und BII im Falle der Anwesenheit der Isoformen 1 und 2 gleiche Resultate liefern, lässt sich mit Hilfe dieses Versuchs lediglich die Aussage treffen, dass in den HeLa-Zellen, die als Ausgangsmaterial benutzt wurden, die Isoform 2 von SLC35B1 enthalten war (Dr. Stefan Schorr, Med. Biochemie, UdS).

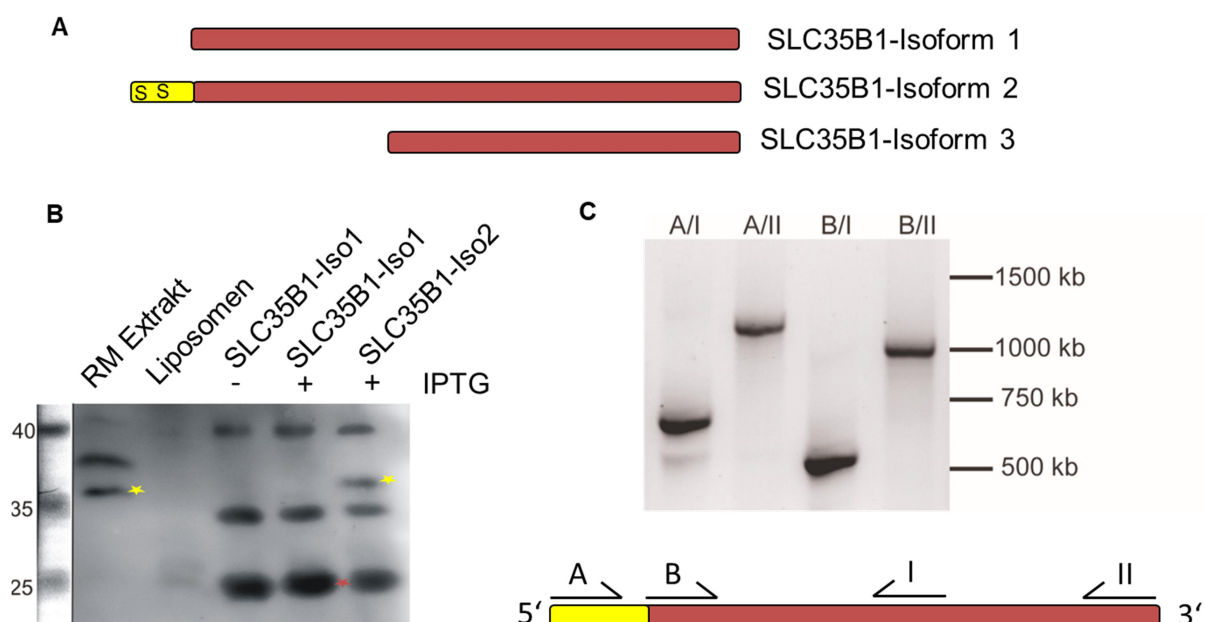


Abbildung 4.11: Nachweis der SLC35B1-Isoformen. **A** Schematische Darstellung der drei verschiedenen Isoformen entstehend aus mehreren mRNA-Varianten. Der N-Terminus von SLC35B1-Iso2 ist um 37 Aminosäuren verlängert (gelb) und enthält zwei phosphorylierbare Serine an den Stellen 15 und 29 (S). SLC35B1-Iso3 ist N-terminal um 78 Aminosäuren verkürzt. **B** Western Blot (3.2.3.5) und immunologische Detektion (3.2.3.6) mittels SLC35B1-spezifischem Antikörper von 4 %

Digitonin-Extrakten einer rER-Präparation (aus 6 mg mikrosomalen Proteinen) aus dem Hundepankreas (Präparation von Prof. Martin Jung, Med. Biochemie, UdS), sowie jeweils 25 µg *E. coli*-Membranen aus SLC35B1-Iso1- bzw. SLC35B1-Iso2-exprimierenden Zellen im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen. C Detektion von *SLC35B1* mRNA in HeLa-Zellen. Zum Nachweis der SLC35B1-Varianten wurde die cDNA mit den angezeigten Primerpaaren (Positionen auf der DNA unten schematisch dargestellt) amplifiziert, einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen und mit GelRed gefärbt (Dr. Stefan Schorr, Med. Biochemie, UdS). (IPTG = Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, kb = Kilobasen). (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch „Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)“, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.2. Einfluss der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 auf die HeLa-Zellphysiologie

4.2.2.1. Etablierung der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1

Zur Untersuchung der Funktion von SLC35B1 wurde die siRNA-vermittelte Genstilllegung benutzt, um dieses transient in HeLa-Zellen zu depletieren und hinsichtlich möglicher Phänotypen zu untersuchen (Kapitel 4.2.2). Die Etablierung dieser Methode für SLC35B1 beinhaltete die Verwendung mehrerer siRNAs, deren Effizienz mit zwei Methoden evaluiert werden sollte. Zum einen erfolgte eine qRT-PCR, bei der die Abundanz der mRNA detektiert wird, und zum anderen wurde ein Western Blot benutzt, um bei Verwendung eines spezifischen Antikörpers das synthetisierte Protein direkt erkennen zu können. Abbildung 3.12, A zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR, die in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr (Med. Biochemie, UdS) durchgeführt wurde und bei der genspezifische Taqman-Sonden für *SLC35B1* und die ER-Stress- bzw. Apoptose-assoziierten Gene *HSPA5* und *DDIT3* verwendet worden waren. Das Gen *HSPA5* kodiert für das ER-luminale Hsp70-Chaperon BiP und *DDIT3* für das ER-Stress-assoziierte Protein CHOP. Die zu analysierende cDNA wurde mittels reverser Transkriptase aus endogener RNA präpariert. Das Ausgangsmaterial waren HeLa-Zellen, die für 48 h, 96 h und 144 h mit den angegebenen siRNAs behandelt wurden. Die Fluoreszenzsignale der Taqman-Sonden wurden so transformiert, dass die zur Kontrolle relative Veränderung der Expression dargestellt werden konnte (Kapitel 3.2.4.7). Dabei wurden die Signale mit Hilfe der Signale des Haushaltsgens *ACTB* normalisiert. Die relative mRNA-Abundanz zwischen 50 und 150 wurde als Bereich definiert, dessen Veränderungen als nicht signifikant gelten. Veränderungen unter 50 und über 150 sind dementsprechend valide Expressionsunterschiede der verschiedenen Gene. Für alle Zeitpunkte ließ sich beobachten, dass die mRNA von *SLC35B1* durch die UTR#1-siRNA effizienter stillgelegt wurde als es für die #4-siRNA der Fall war. Beide siRNAs reduzierten die *SLC35B1*-mRNA bereits nach 48 h deutlich unter die Grenze 50. Eine wesentliche Verbesserung der mRNA-

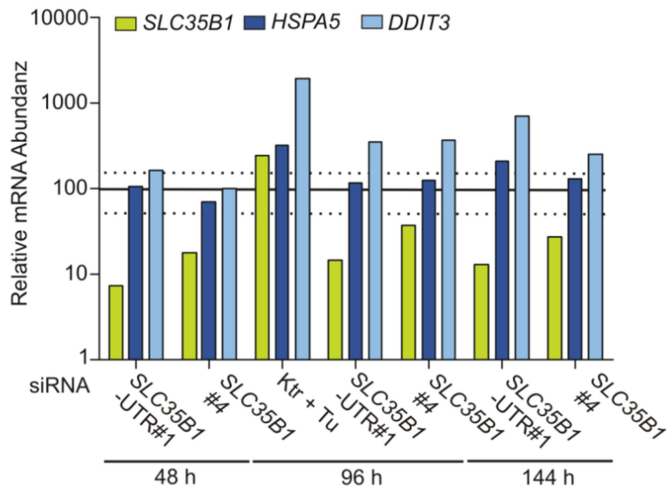
Depletion mit zunehmender Inkubationszeit zeichnete sich für keine der siRNAs ab. Die Population Ktr siRNA + Tunicamycin (Tu) wurde als Kontrolle für induzierten ER-Stress mitaufgenommen, da Tu die N-Glykosylierung von Polypeptiden inhibiert, wodurch sie ihre native Faltung nicht erreichen und es folglich zu ER-Stress kommt. Neben der erwarteten Hochregulation von *HSPA5* und *DDIT3* war in dieser Population auch *SLC35B1* deutlich hochreguliert, was ein erster Hinweis darauf war, dass *SLC35B1* als Folge von ER-Stress induziert wird. Bei Betrachtung der *SLC35B1*-depletierten Populationen fiel auf, dass die *DDIT3*-mRNA zu allen Zeitpunkten stark induziert war, was eine hohe Abundanz über 150 nach sich zog. Generell ließ sich feststellen, dass die Hochregulation von *DDIT3* stärker war, wenn die HeLa-Zellen mit der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA behandelt wurden. Auch *HSPA5* wies in *SLC35B1*-depletierten Zellen eine minimale Erhöhung auf, sie überschritt aber nur nach 144 h bei der UTR#1-siRNA die Signifikanzgrenze von 150 (Abbildung 4.12, A).

Nachdem die Funktionalität der siRNAs auf der Ebene der zellulären mRNA nachgewiesen war, sollte noch überprüft werden ob *SLC35B1*-spezifische Antikörper in der Lage sind, die Depletion des Proteins nachzuweisen. Zunächst wurde versucht nach siRNA-vermittelter *SLC35B1*-Depletion in HeLa-Zelllysaten die verschiedenen Isoformen des endogenen Proteins mit mehreren kommerziell erhältlichen Antikörpern für *SLC35B1* nachzuweisen. Allerdings war der direkte Nachweis des endogenen Proteins und seiner Depletion nach siRNA-Behandlung im Ganzzellysat mit keinem der getesteten Antikörper erfolgreich. Darum wurde im nächsten Schritt plasmidkodierte *SLC35B1* durch siRNA-vermittelte Genstilllegung depletiert, um durch die erhöhte Abundanz des Proteins die Antikörperdetektion zu erleichtern. Dazu wurden die HeLa-Zellen mit der siRNA, die gegen den kodierenden Bereich der cDNA gerichtet war, transfiziert und nach 30 h wurde das Plasmid *pSLC35B1-Iso1-GFP* transfiziert. Nach 48 h bzw. 96 h Expression wurden die HeLa-Zellen geerntet und deren Lysate sowohl mit einem Antikörper, der den GFP-Tag erkannte, als auch mit einem Antikörper, der spezifisch für *SLC35B1* war, detektiert. Die Resultate sind in Abbildung 4.12, B und C dargestellt. Es zeichnete sich für beide Erntezeitpunkte ein schwächeres Signal für *SLC35B1*-GFP ab, wenn die Zellen mit *SLC35B1* siRNA#4 transfiziert wurden als es bei der Transfektion von Ktr siRNA der Fall war. Die Proben, die nach 8 h geerntet worden waren, wurden auch mit dem Antikörper, der spezifisch für das endogene Protein ist, immunologisch detektiert. Auch hiermit ließ sich eine Reduktion des GFP-getaggen *SLC35B1* durch die *SLC35B1* siRNA#4 nachweisen. Abbildung 4.12, D zeigt beispielhafte Ausschnitte der verschiedenen Zellpopulationen in der Fluoreszenzmikroskopie mit einem GFP-Filter, bzw. der korrespondierenden Durchlichtaufnahme. Auch hier entsteht

der Eindruck, dass die Synthese von GFP in den Zellen, die mit *SLC35B1* siRNA#4 behandelt wurden, im Vergleich zur Transfektion mit Ktr siRNA deutlich verringert war. Darüber hinaus gelang es außerdem die Expression des Plasmids *pSLC35B1-Iso2-MYC-DDK* durch Transfektion mit *SLC35B1* siRNA#4 unter die Detektionsgrenze des DDK-spezifischen Antikörpers zu verringern (Abbildung 4.12, E). Als Kontrollpopulation wurden in diesem Experiment HeLa-Zellen benutzt, die mit der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA transfiziert wurden. Diese siRNA legt gezielt das endogene Gen still, wohingegen die plasmidgetriebene cDNA resistent gegen diese Behandlung ist. Demzufolge ist in dieser Population die Synthese des getaggenen SLC35B1 mit Hilfe des Antikörpers, der gegen den DDK-Tag gerichtet ist, detektierbar.

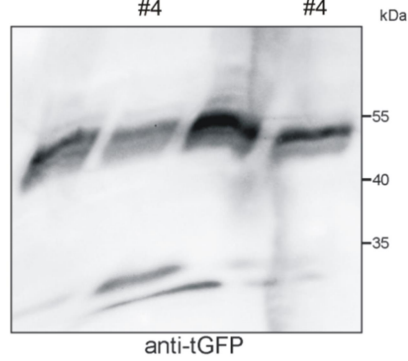
Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die siRNA-Behandlung die zelluläre mRNA von *SLC35B1* depletierte und die Depletion des transgen eingebrachten Proteins nachgewiesen werden konnte.

A



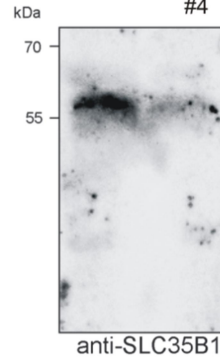
B

Expression 48 h 96 h
 Plasmid pSLC35B1-Iso1-GFP
 siRNA Ktr SLC35B1 #4 Ktr SLC35B1 #4

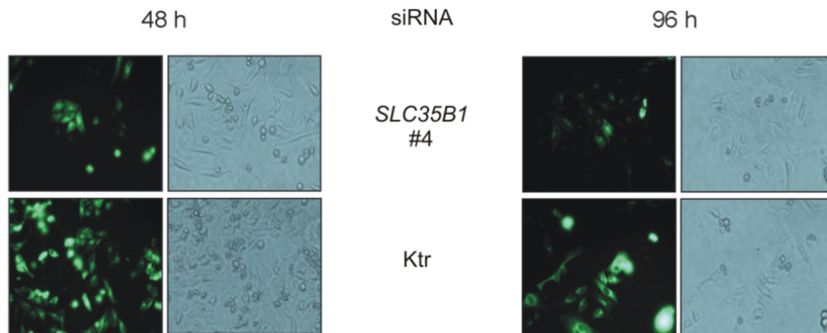


C

pSLC35B1-Iso1-GFP Plasmid
 Ktr SLC35B1 #4 siRNA



D



E

pSLC35B1-Iso2-MYC-DDK Plasmid
 Ktr SLC35B1 #4 UTR#1 siRNA

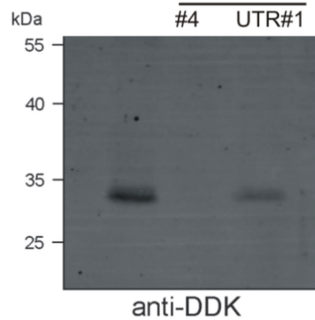


Abbildung 4.12: Evaluierung der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 (mittels qRT-PCR und Western Blot). **A** HeLa-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit den angegebenen siRNAs (20 nM) behandelt (3.2.1.4.1) und geerntet (3.2.1.5). Zur Kontrolle für induzierten ER-Stress wurden Ktr siRNA-behandelte Zellen für 2 h mit 2,5 µg/ml Tunicamycin behandelt. Im Anschluss wurde die mRNA isoliert (3.2.4.5) und in cDNA revers transkribiert (3.2.4.6). Gleiche Mengen cDNA der verschiedenen Zellpopulationen wurden einer qRT-PCR unterzogen, wobei genspezifische Taqman-Sonden für *SLC35B1*, und die stressinduzierten Gene *HSPA5* und *DDIT3* zum Einsatz kamen (3.2.4.7). Als Kontrolle diente das Haushaltsgen *ACTB*, auf dessen relative Expression normalisiert wurde. Die Auswertung erfolgte weiterhin nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zur Ermittlung der n-fachen Expression relativ zu Ktr siRNA (3.2.4.7). Die eingezeichneten Linien markieren die Werte 50 und 150, die als Signifikanzgrenzen definiert sind. Die qRT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr (Med. Biochemie, UdS) durchgeführt. **B, C** Die Zellen wurden hierfür 96 h mit Ktr oder *SLC35B1* siRNA und nach 30 h zusätzlich mit p*SLC35B1-Iso1-GFP* transfiziert. Nach 48 h bzw. 96 h wurden die Zellen geerntet, zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und $0,3 \times 10^6$ Zelläquivalente ($0,5 \times 10^6$ in C) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) mit spezifischen Antikörpern für tGFP (B) bzw. SLC35B1 (C) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin überprüft. Aufgetragen wurden in C die Proben des 48 h-Experiments aus B. **D** Qualitative tGFP-Fluoreszenzsignale der Zellen aus C. Gezeigt sind einmal Ausschnitte mit einem GFP-Filter (links) und die Durchlichtaufnahmen desselben Bildausschnitts (rechts). **E** Die Zellen wurden hierfür 96 h mit Ktr, *SLC35B1#4* siRNA oder *SLC35B1-UTR#1* siRNA und nach 30 h zusätzlich mit p*SLC35B1-Iso1-MYK-DDK* transfiziert. Nach 96 h wurden die Zellen geerntet, zu Lysaten aufgearbeitet und $0,5 \times 10^6$ Zelläquivalente wurden mit Hilfe von SDS-PAGE, Western Blot und immunologischer Detektion auf ihren DDK-Proteingehalt hin überprüft. (Tu = Tunicamycin, kDa = Kilodalton) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

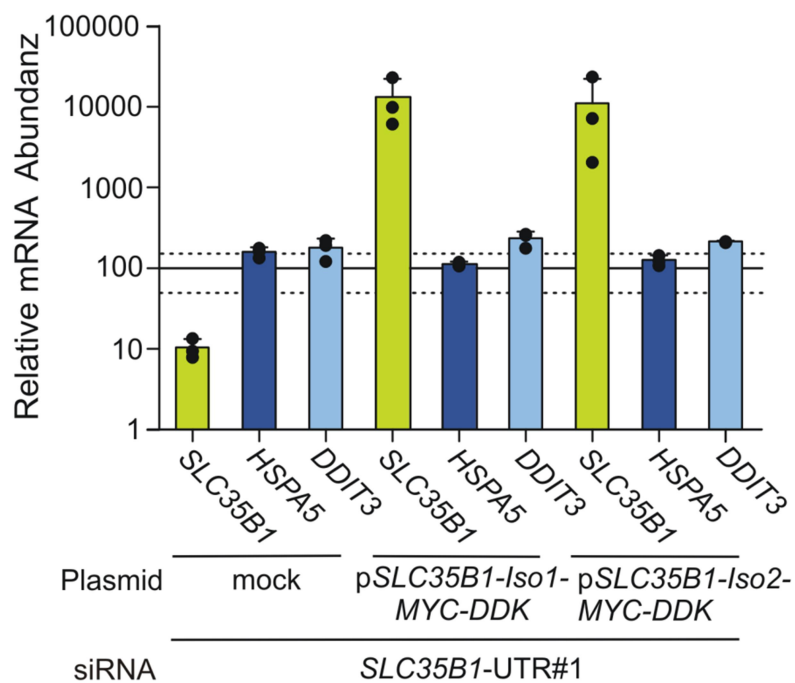
4.2.2.2. Etablierung einer transgenen Komplementation von SLC35B1

Nach erfolgreicher Etablierung der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 in HeLa-Zellen wurde als nächstes dessen Komplementation mit Hilfe plasmidgetriebener Expression von *SLC35B1* angestrebt. Hierfür wurden die Zellen 8 h nach der zweiten siRNA-Behandlung mit der *SLC35B1-UTR#1* siRNA jeweils mit einem Plasmid transfiziert, das kodierende Sequenzen der Myc-DDK-getaggten Isoform 1 bzw. 2 enthielt. Wie die qRT-PCR (in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr, Med. Biochemie, UdS) aus Abbildung 4.13, A zeigt, konnte die Depletion der *SLC35B1*-mRNA jeweils durch Expression einer der Isoformen erfolgreich komplementiert werden. Die Expression der Plasmide führte in beiden Fällen zu einer ca. 100-fach erhöhten mRNA-Abundanz verglichen mit der Kontrollpopulation (Ktr siRNA + mock). Die siRNA-vermittelte Genstilllegung von *SLC35B1* führte zu einer leichten ER-Stressantwort, was sich durch eine Induktion der mRNA (ca. 150 %) der beiden ER-Stress-assoziierten Gene *HSPA5* und *DDIT3* zeigte. Für *HSPA5*, nicht jedoch für *DDIT3*, war diese Induktion nach Komplementation mit den SLC35B1-Isoformen reversibel.

In Abbildung 4.13, B wurden Lysate in gleicher Weise komplementierter HeLa-Zellen elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und immunologisch mit einem spezifischen SLC35B1-Antikörper oder dem DDK-Antikörper detektiert. Zur Validierung wurde zusätzlich kommerziell erhältliches HEK-Lysat analysiert,

das die Isoform 1 von *SLC35B1* in Myc-DDK-getaggtter Form stark überexprimierte (Pos). Die immunologische Detektion zeigte für die Positivkontrolle ein starkes Proteinsignal mit einem Molekulargewicht von etwas weniger als 35 kDa, was der MYC-DDK-getaggtten Isoform 1 von *SLC35B1* entspricht. In der Spur, in der *SLC35B1* siRNA-vermittelt depletiert und durch p*SLC35B1-Iso2-MYC-DDK* komplementiert wurde, ist ein Signal mit einer leichten Verschiebung in den höheren Molekulargewichtsbereich mit beiden Antikörpern detektierbar. Die Komplementation durch p*SLC35B1-Iso1-MYC-DDK*, die die mRNA der siRNA-vermittelten Genstilllegung erfolgreich rettete, konnte weder mit dem spezifischen *SLC35B1*-Antikörper noch mit dem DDK-Antikörper auf Ebene des Proteins validiert werden.

A



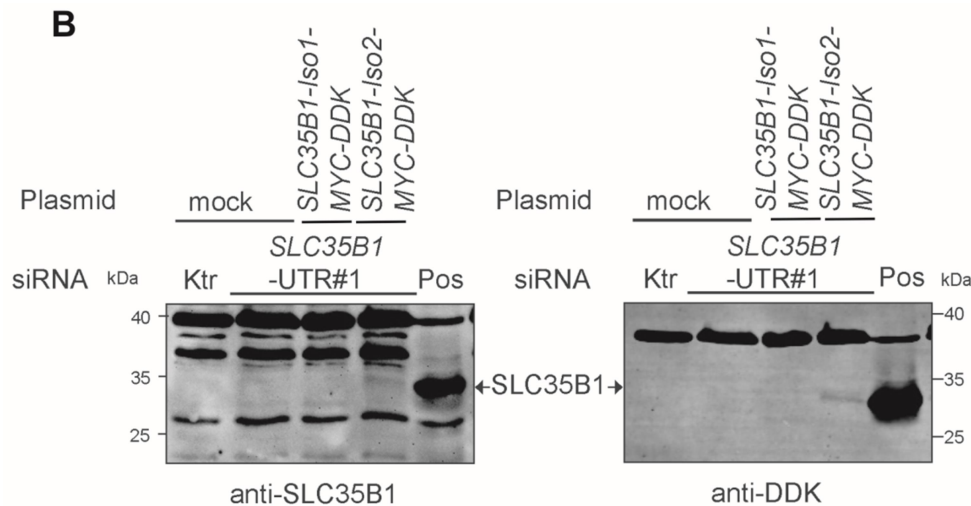


Abbildung 4.13: Evaluierung der Komplementation der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion. **A** HeLa-Zellen wurden für 96 h mit der angegebenen siRNA behandelt (20 nM) (3.2.1.4.1) und zusätzlich wurden nach 30 h Plasmide zur Komplementation transfiziert und für 66 h inkubiert (*pSLC35B1-Iso1-MYC-DDK* und *pSLC35B1-Iso2-MYC-DDK*) (3.2.1.4.2). Nach 96 h wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5) und automatisiert gezählt (3.2.1.3). Im Anschluss wurde die mRNA isoliert (3.2.4.5) und in cDNA revers transkribiert (3.2.4.6). Gleiche Mengen cDNA der verschiedenen Zellpopulationen wurden einer qRT-PCR unterzogen, wobei genspezifische Taqman-Sonden für *SLC35B1*, und die stressinduzierten Gene *HSPA5* und *DDIT3* zum Einsatz kamen. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen *ACTB*, auf dessen relative Expression normalisiert wurde. Die Auswertung erfolgte weiterhin nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode zur Ermittlung der n-fachen Expression relativ zu Ktr siRNA (3.2.4.7). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM, die Punkte repräsentieren die biologischen Replikate aus 3 Versuchen. Die qRT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr (Med. Biochemie, UdS) durchgeführt. **B** Das Lysat aus $0,5 \times 10^6$ HeLa-Zelläquivalenten wurde mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.3.1), im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (3.2.3.5) und immunologisch detektiert (3.2.3.6). Die beiden Ausschnitte repräsentieren denselben Western Blot nach Detektion mit anti-SLC35B1 (links) bzw. anti-DDK (rechts). Als Positivkontrolle diente 13,3 μg des kommerziell erhältlichen HEK-Lysats, das SLC35B1-Iso1-Myc-DDK überexprimierte (Pos). (SEM = engl. „standard error of the mean“) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Komplementation der siRNA-vermittelten mRNA-Depletion von SLC35B1 durch plasmidgetriebene Expression im Falle beider SLC35B1-Isoformen erfolgreich mittels qPCR nachgewiesen werden konnte. Die Proteinsynthese konnte für die Isoform 2 durch immunologische Detektion des Myc-DDK-Tags ebenfalls bestätigt werden, während die Synthese der Isoform 1 in HeLa-Zellen unter der Nachweisgrenze der verwendeten Antikörper blieb.

4.2.2.3. Einfluss der SLC35B1-Depletion auf die Viabilität und Proliferation von HeLa-Zellen

Nachdem in den vorangehenden Kapiteln eine erfolgreiche Depletion von SLC35B1 durch die Verwendung spezifischer siRNAs nachgewiesen werden konnte (4.2.2.1), war es nun die Aufgabe die Bedeutung des Verlusts von SLC35B1 für die HeLa-Zellen zu analysieren, um

Anzahl, der biologischen Replikate, betrug für Ktr siRNA n = 35, für *SLC35B1*-UTR#1 (20 nM) n = 14, für *SLC35B1*-UTR#1 (10 nM) n = 6 und für *SLC35B1* #4 (20 nM) n = 22. (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Hierfür wurden die HeLa-Zellen mit zwei verschiedenen siRNAs, die für das *SLC35B1*-Gen spezifisch waren, transfiziert und für 48 h inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet und zu jeweils 5000 in die Wells einer sogenannten E-Plate des xCELLigence®-Systems ausgesät. Diese E-Plates sind mit Goldplatinen besetzt, die die Impedanzveränderungen im Laufe der fortschreitenden Zellproliferation messen und als Wachstumsparameter (engl. „cell index“, CI) ausgegeben werden. Das xCELLigence®-System macht es möglich das Zellwachstum in Echtzeit zu verfolgen. Neben den verschiedenen *SLC35B1*-siRNAs gab es noch zwei Kontrollpopulationen. Zum einen die Ktr siRNA und zum anderen die *HSPA5*-UTR#1 siRNA. Letztere depletiert das Protein BiP, was von den Zellen aufgrund seiner zahlreichen Schlüsselfunktionen im ER nicht dauerhaft toleriert werden kann und deshalb als Kontrollpopulation für verminderte Zellproliferation mitgeführt wurde (Schäuble et al., 2012). Da die Messung erst 48 h nach Beginn der siRNA-Transfektion begann, reflektiert der Zeitraum um 50 h den üblichen 96 h-Versuchsaufbau. Ein nur leicht verringertes Wachstum verglichen zur Kontrollpopulation wiesen die Zellen auf, die mit *SLC35B1* siRNA#4 behandelt wurden (Abbildung 4.14, A). Dosisabhängig zeigten Zellen, die mit *SLC35B1*-UTR#1 siRNA transfiziert wurden ein verlangsamtes Wachstum bei Betrachtung des ganzen Zeitraumes. Erwartungsgemäß ist die Population, die mit *HSPA5*-UTR siRNA behandelt wurde, in ihrer Zellproliferation stark beeinträchtigt im Vergleich zu Zellen, die mit der Ktr siRNA transfiziert wurden. Der starke Anstieg der Proliferation in allen Zellpopulationen nach ca. 60 h ist mit der transienten Dauer der siRNA-Behandlung zu erklären. Weiterhin war eine Plateau-Phase vorhanden, die konfluentes Wachstum anzeigte, sowie gegen Ende des Betrachtungszeitraumes eine Phase negativen Wachstum, welche das Absterben der Zellen anzeigte (Abbildung 4.14, A).

Abbildung 4.14, A zeigt die Lebendzellzahlen aus der automatisierten Zellzählung zum Endzeitpunkt von 96 h nach Behandlung mit den angegeben siRNAs. Es zeigte sich ein ähnlicher Trend verglichen mit der Echtzeitproliferationsverfolgung aus Abbildung 4.14, A. Die Zahlen, der mit *SLC35B1* siRNA#4 transfizierten Zellen waren im Vergleich zur Ktr siRNA-behandelten Zellpopulation um ca. 30 % reduziert. Einen deutlich inhibitorischen Effekt auf die Lebendzellzahl besaß die Transfektion der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA, welche verglichen mit der Kontrollpopulation um 60 % erniedrigt war. Die Behandlung der Zellen mit einer um die Hälfte reduzierten Konzentration (10 nM) an siRNA wirkte sich

entsprechend eines dosisabhängigen Effekts schwächer auf die Zellzahl aus und resultierte in einer Reduktion um ~50 % im Vergleich zur Kontrolle.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass eine erfolgreiche siRNA-vermittelte Depletion von SLC35B1 in HeLa-Zellen zu verringerten Zellzahlen führte, wobei der stärkste negative Effekt auf die Proliferation in HeLa-Zellen mit *SLC35B1*-UTR siRNA#1 Behandlung zu beobachten war.

4.2.2.4. Einfluss der SLC35B1-Depletion auf die Zellmorphologie und ER-Architektur von HeLa-Zellen

Als nächstes erfolgte eine morphologische Analyse der SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jens Rettig der Physiologie der UdS, wurden zum einen elektronenmikroskopische (EM) sowie hochauflösende 3D-SIM-Aufnahmen SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen angefertigt. Da SLC35B1 als putativer ATP-Carrier der ER-Membran analysiert wurde, lag bei den bildgebenden Verfahren das Augenmerk, neben allgemeiner Zellmorphologie (EM), besonders auf der ER-Morphologie (3D-SIM).

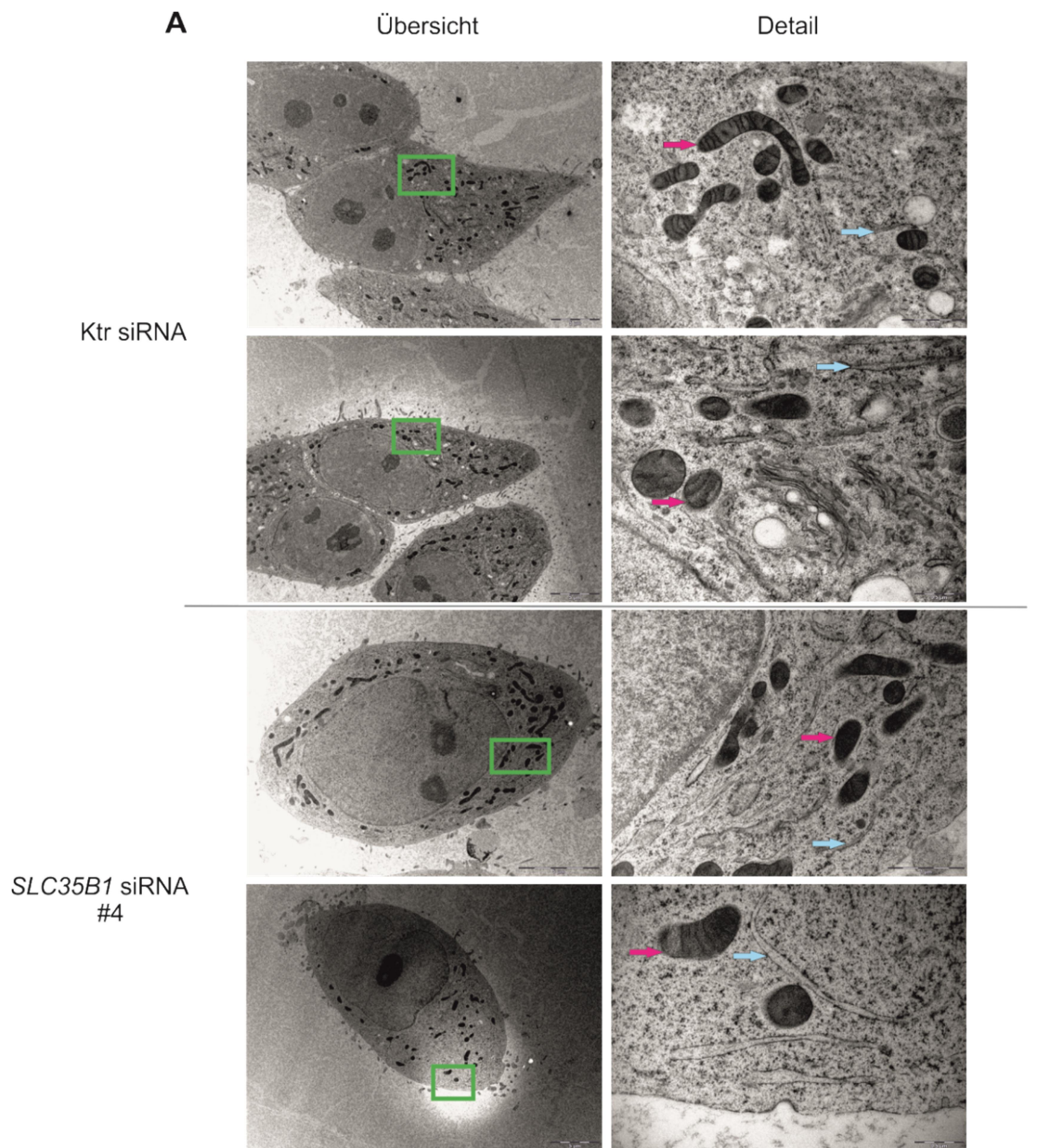
SLC35B1-depletierte HeLa-Zellen in der EM

Die Vorbereitung des Zellmaterials für die Elektronenmikroskopie sowie die EM-Aufnahmen wurden von Dr. Claudia Schirra (AG Rettig, Physiologie, UdS) durchgeführt. Abbildung 4.15, A zeigt Übersichts- (links) sowie Detailaufnahmen (rechts) von HeLa-Zellen nach 96 stündiger Behandlung mit *SLC35B1* #4 bzw. Ktr siRNA. Die Übersichtsbilder zeigen die kompletten Zellen in einer entsprechenden Vergrößerung (2900-4800x). In grün ist der Bereich der Zelle markiert, der für die Detailaufnahmen näher analysiert wurde (Vergrößerung 18500-30000x). Prominente Strukturen, die in den EM-Aufnahmen beider HeLa-Zellpopulationen erkennbar waren, wie die Mitochondrien (rot) oder einzelne raue ER-Lagen in deren Nähe (blau) sind beispielhaft mit farbigen Pfeilen markiert. Zwischen den Ktr und *SLC35B1* #4 siRNA-behandelten Zellen waren keine Unterschiede der allgemeinen Morphologie festzustellen.

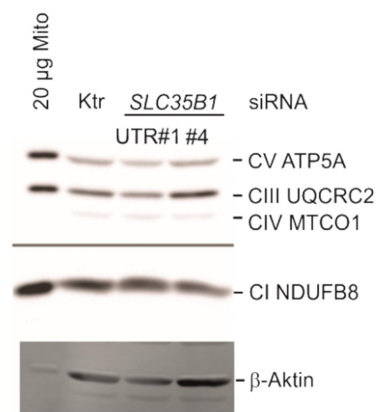
Zusätzlich zu den EM-Aufnahmen, die eine bildhafte Darstellung der tatsächlichen Organellorganisation innerhalb der manipulierten HeLa-Zellen ermöglichen, wurden Lysate der Zellen nach Western Blot immunologisch hinsichtlich der Verteilung von Schlüsselkomponenten der Organellen untersucht. Das Augenmerk lag hierbei zum einen auf der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), respektive auf Komponenten der Elektronentransportkette, womit zentrale Komponenten der ATP-Synthese und -Homöostase im Mitochondrium analysiert wurden (in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr

und Prof. Dr. Martin Van-der-Laan, UdS, Abbildung 4.15, B). Zum anderen wurden ribosomalen Proteine analysiert, die unbeeinflusst von Veränderungen der ATP-Homöostase bleiben sollten (Abbildung 4.15, C). Getestet wurden Lysate von HeLa-Zellen, die für 96 h entweder mit der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA oder der *SLC35B1*#4 siRNA behandelt wurden. Als Ladekontrolle für die aufgetragenen Zelläquivalente diente das Protein β -Aktin. In Hinblick auf die Integrität der verschiedenen Komplexe der Elektronentransportkette wurde stellvertretend jeweils eine Komponente untersucht (Komplex I: NDUFB8; Komplex III: UQCRC2; Komplex IV: MTCO1; Komplex V: ATP5A), deren Abundanz unbeeinflusst von der *SLC35B1*-Depletion blieb. Gleiches traf auf die ribosomalen Proteine der 60S (Rpl4 und Rpl23a) sowie der 40S (S3) Untereinheit zu.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in HeLa-Zellen keine morphologischen Unterschiede zwischen *SLC35B1*-depletierten Zellen und Kontrollzellen auftraten. Letzteres wurde auf Proteinebene für die gesamtzelluläre Konzentration an Proteinen der oxidativen Phosphorylierung, sowie von ribosomalen Proteinen bestätigt.



B



C

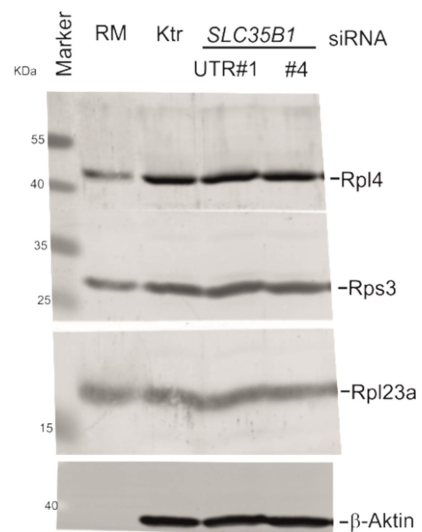


Abbildung 4.15: Effekt der siRNA-vermittelten Depletion von SLC35B1 auf die Morphologie von HeLa-Zellen. **A** EM-Aufnahmen. Dafür wurden die HeLa-Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Saphirscheiben ($\varnothing = 1,4$ mm) ausgesät und für 96 h mit den angegebenen siRNAs behandelt (20 nM) (3.2.1.4.1). Die Aufarbeitung des Zellmaterials, die Probenvorbereitung; sowie die praktische Durchführung der EM wurde von Dr. Claudia Schirra (AG Rettig, Physiologie, UdS) durchgeführt (3.2.2.2.3). Angefertigt wurden Übersichts- (links); sowie Detailaufnahmen (rechts, entsprechen den grünen Ausschnitten) unter Angabe des jeweiligen Größenstandards (weißer Balken). Eingezeichnet sind beispielhaft Mitochondrien (rot) oder einzelne raue ER-Lagen (blau) mit farbigen Pfeilen. **B, C** Proteingehalt nach Western Blot. Die Zellen wurden ausgesät, und für 96 h mit den angegebenen siRNAs behandelt (jeweils 20 nM). Anschließend wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5), zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und $0,3 \times 10^6$ HeLa-Zelläquivalente mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladekontrolle mitgeführt. **B** Proteingehalt verschiedener Untereinheiten der fünf OXPHOS-Komplexe, detektiert mit einem kommerziellen Antikörpermix (Dr. Stefan Schorr, Biochemie, UdS). **C** Proteingehalt ribosomaler Proteine der 60s-Untereinheit (Rpl4 und Rpl23a) und der 40s-Untereinheit (S3). (Mito = Mitochondrienextrakt, C = Komplex der Elektronentransportkette, kDa = Kilodalton, RM = raue Mikrosomen)

3D-SIM-Mikroskopie SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen

Während gröbere intrazelluläre Strukturen und Organellen mittels EM auflösbar sind, stellt die 3D-SIM-Mikroskopie die Methode der Wahl dar, um filigranere Strukturen einzelner Organellen darzustellen. Um die SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen in Hinblick auf die ER-Morphologie eingehender zu untersuchen, wurden hochauflösende 3D-SIM-Aufnahmen in freundlicher Zusammenarbeit mit PD Dr. Elmar Krause am Institut für Physiologie, UdS angefertigt (Abbildung 4.16). Dazu wurden die HeLa-Zellen für 96 h mit den verschiedenen siRNAs, die das Gen *SLC35B1* zum Ziel hatten bzw. mit Ktr siRNA behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz permeabilisiert. Zur Darstellung des ERs wurde das ER-Membranprotein Sec62 verwendet, welches als Bestandteil der Sec61-Proteintranslokase in ausreichender Abundanz vorliegt, um über einen sekundären Antikörper mit dem Fluorophor Alexa594 (orange) angefärbt zu werden. Zusätzlich erfolgte die Färbung der DNA innerhalb des Zellkerns mittels DAPI (blau). Die Aufnahmen zeigten die erwarteten punktförmigen Signale von Sec62 in der ER-Membran, die sich als typisches tubuläres ER-Netzwerk, vor allem in Richtung Zellperipherie, verbanden (siehe auch Abbildung 4.1, sowie Lang et al., 2012). Dieses Muster ließ sich nicht nur in der Kontrollpopulation (Ktr siRNA), sondern auch in den einzelnen mit *SLC35B1* siRNA-behandelten Populationen beobachten. Somit ließen sich keine Veränderungen der ER-Morphologie als Folge der Depletion von SLC35B1 feststellen.

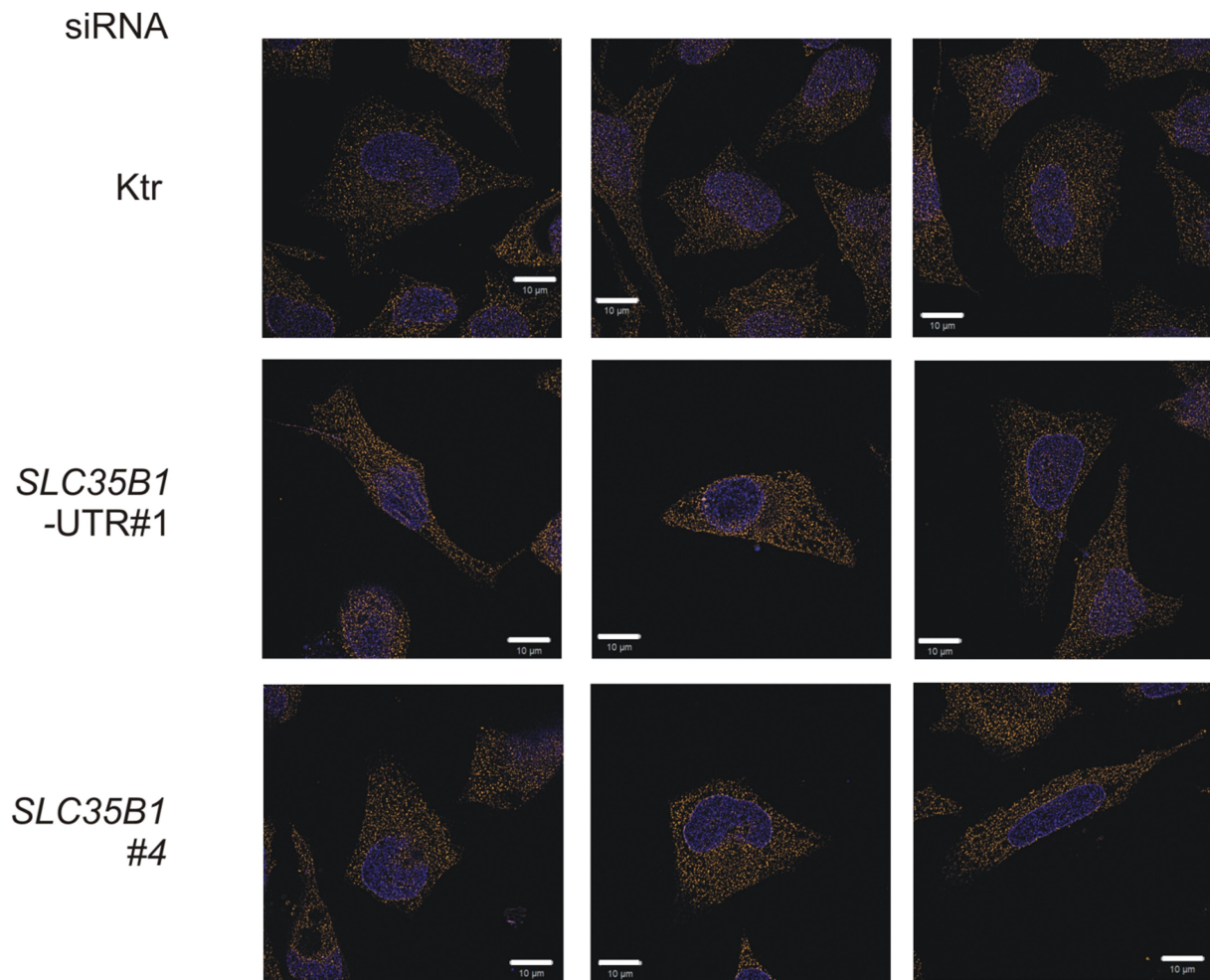


Abbildung 4.16: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf die ER-Morphologie von HeLa-Zellen. Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden für 96 h mit jeweils 20 nM der angegebenen siRNAs behandelt (3.2.1.4.1). Paraformaldehyd wurde zur Fixierung der Zellen genutzt bevor die ER-Struktur mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gerichtet gegen Sec62 abgebildet wurde (3.2.2.2.1). Die hochauflösenden Aufnahmen des an den sekundären Antikörper gekoppelten Alexa594-Fluorophors wurden mithilfe des Elyra-SIM-Mikroskop angefertigt (PD Dr. Elmar Krause, Physiologie, UdS) (3.2.2.2.2). Die blauen Strukturen stellen DAPI-Färbungen der Zellkerne dar. Größenstandard: 10 µm (weiße Linie). (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.2.5. Einfluss der SLC35B1-Depletion auf die zelluläre Apoptose

In vorangegangenen Versuchen (Kapitel 4.2.2.3) wurde bereits gezeigt, dass die siRNA-vermittelte Depletion von SLC35B1 Auswirkungen auf die Zellproliferation und die Lebendzellzahl besaß. In diesem Abschnitt sollte nun der Frage nachgegangen werden ob und wann HeLa-Zellen, die mit den beiden siRNAs (UTR#1 und #4) transfiziert wurden, im Laufe der 96 h-Experimente den apoptotischen Weg einschlagen. Dies ist vor dem Hintergrund relevant, da die Depletion von SLC35B1 als putativen ATP-Austauscher der ER-Membran, einen Eingriff in die zelluläre Energiehomöostase darstellen kann. Eine konstante Versorgung des ER mit ATP ist aber besonders für die Funktionsweise von BiP als zentrales

Steuerungsprotein der UPR von Bedeutung. Letztere kann bei nicht lösbarem ER-Stress in die Apoptose münden (vgl. Kapitel 2.3.5.2). Es wurde ein Kit der Firma Promega benutzt, womit lumineszenz- bzw. fluoreszenzbasiert eine gleichzeitige Detektion von Apoptose und Nekrose möglich ist. Zur Validierung des Assays und gezielter Induktion der Apoptose in Kontrollzellen (Abbildung 3.4, A, rote Linie) wurde Staurosporin (Stauro) verwendet, das im Gegensatz zu anderen Apoptose-induzierenden Agenzien nicht gleichzeitig auch zu Nekrose führt (Falcieri et al., 1993).

Ziel war es den Apoptose/Nekrosestatus der 96 h siRNA-Behandlung mit *SLC35B1* siRNAs geeignet abzubilden. Dazu wurden zwei verschiedene Versuchsaufbauten gewählt. Zum einen galt es zu analysieren wie sich der Status zum Erntezeitpunkt von 96 h nach der ersten siRNA-Behandlung darstellte, was dem Standardversuchsaufbau für die meisten der folgenden funktionellen Analysen entsprach. Hierzu wurden in Abbildung 4.17, A und B die Zellen engmaschig zwischen 90 h und 100 h analysiert.

Zum anderen wurde der Apoptose/Nekrosestatus über einen längeren Zeitraum, zwischen 48 h und 120 h, kinetisch aufgezeichnet (Abbildung 4.17, C und D), um zu testen, ob und wann es während der 96 h zu einem Übergang der *SLC35B1*-depletierten Zellen in die Apoptose kommen sollte. Neben der Ktr siRNA und den beiden *SLC35B1*-siRNA behandelten HeLa-Zellpopulationen wurden *HSPA5* siRNA-behandelte Zellen mitgeführt. Diese zeigten in der xCELLigence-Echtzeitproliferationsanalyse eine verringerte Zellproliferation (Abbildung 4.14). Die Kontrollpopulationen, bestehend aus entweder DMSO- oder Staurobehandlung, wurden ebenfalls mitaufgenommen. Alle Populationen wurden auf die Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzsignale der Ktr siRNA normiert (gestrichelte Linie) und als prozentualer Anteil dieser Population dargestellt.

Bei dem Versuchsaufbau aus Abbildung 4.17, A und B wurde deutlich, dass alle Populationen, die mit *SLC35B1* siRNAs behandelt worden waren beim Zeitpunkt 92 h mit einer 2 bis 2,5-fach erhöhten Lumineszenz, verglichen mit der Ktr siRNA ± DMSO starteten. Gleiches galt für die Zellen, die mit *HSPA5* siRNA behandelt wurden. Die Stauro-Kontrolle begann nach zwei Stunden massiv anzusteigen.

In der kinetischen Analyse der Apoptose von 48 h - 120 h (Abbildung 4.17, C) kam es zu einem homogenen Anstieg aller betrachteten Zellpopulationen über die Zeit. Die Zellpopulationen, die als auffallend hervortraten, waren zum einen wiederum die Stauro-behandelte Zellpopulation (rot), die nach 2 h begann stark apoptotisch zu werden, mit einem Höhepunkt nach ca. 7 h. Zum anderen zeigten auch die *SLC35B1*-UTR#1 siRNA-behandelten Zellen (20 nM) einen sehr frühen Anstieg des Lumineszenz-Signals, das das apoptotische

Zellsterben anzeigte. Dieser Effekt der UTR#1 siRNA war dosisabhängig, da die Zellen, die mit 10 nM UTR#1 siRNA behandelt wurden, nicht auffallend apoptotisch waren und denselben Verlauf des Lumineszenzsignals wie die Ktr siRNA-behandelten HeLa-Zellen aufwiesen. Zum Zeitpunkt 72 h bis ca. 80 h nach Beginn der ersten siRNA-Behandlung trat bei allen Populationen eine Plateauphase auf bzw. ein leichtes Abnehmen des Lumineszenzsignals. Die einzige Ausnahme bildeten hier die mit *SLC35B1* #4 siRNA-behandelten Zellen, die bei 77 h ihren Maximalwert erreichten. Weiterhin wurden in diesen Versuch Zellen eingeschlossen, die mit dem Glykosylierungsantagonisten Tunicamycin behandelt wurden. Letztere besaßen ebenfalls bei 72 h den Maximalwert ihres Lumineszenzsignals und fielen danach langsam ab. Im weiteren Verlauf der Kinetik mit den Messpunkten 96 h und 120 h nach Beginn der siRNA-Transfektion erfolgte eine Abnahme des Lumineszenzsignals.

Bei Betrachtung des mit der Nekrose korrespondierenden Fluoreszenzsignals starteten beim 96 h Versuch (Abbildung 4.17, B) einige Populationen mit höheren Werten. In Analogie zu den Apoptosemessungen (Abbildung 4.17, A) handelte es sich hierbei um alle *SLC35B1*-siRNA-behandelten Zellen sowie solche, die mit der *HSPA5* siRNA behandelt worden waren. Im weiteren Zeitverlauf nach 120 h und 144 h stieg das Fluoreszenzsignal in allen betrachteten Populationen linear an. Bei den kinetischen Messungen des Fluoreszenzsignals (Abbildung 4.17, D) von 48 h bis 120 h verhielt es sich sehr ähnlich wie in Abbildung 4.17, B. Die Zellpopulation, die nach 96 h das höchste Signal aufwies waren die mit Ktr siRNA transfizierten und mit Tunicamycin behandelten HeLa-Zellen.

Der kombinierte Apoptose/Nekrose-Test zeigte eine vermehrte Induktion der Apoptose nach Depletion von *SLC35B1*, wobei der Effekt dosisabhängig (*SLC35B1*-UTR#1) war und mit beiden siRNAs beobachtet wurde. Nach ca. 10-20 h nach Applikation des Reagenzes, stellte sich jeweils eine Plateauphase für die Lumineszenzdetektion ein, wohingegen die Fluoreszenz linear über die Zeit anstieg.

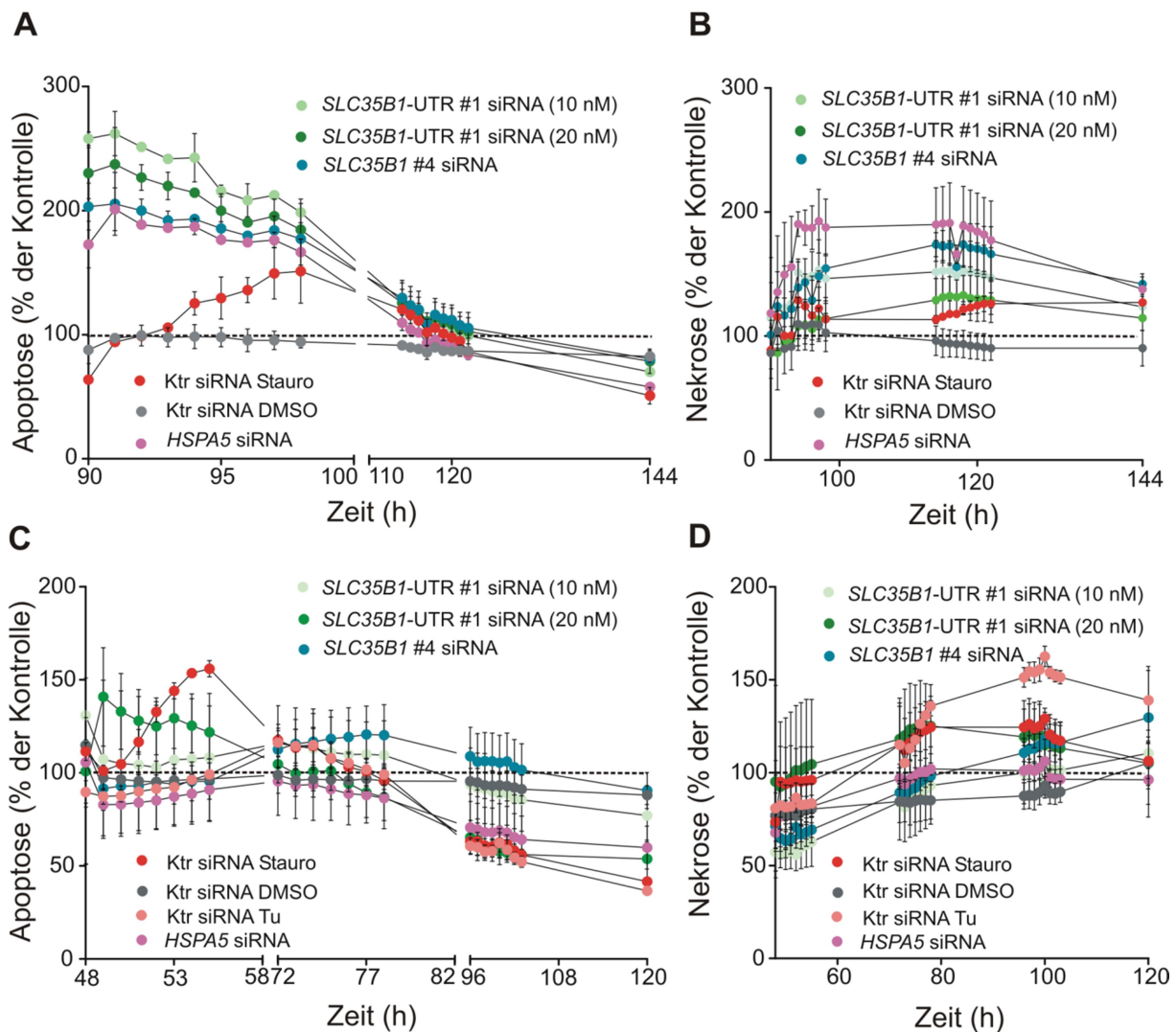


Abbildung 4.17: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf die Apoptose bzw. Nekrose in HeLa-Zellen. A-D Die HeLa-Zellen wurden ausgesät und mit den angegebenen siRNAs behandelt (3.2.1.4.1). 72 h (A, B) bzw. 8 h (C, D) nach der zweiten siRNA-Behandlung wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5), automatisiert gezählt (3.2.1.3) und zu 10000 in die Wells einer Mikrotiterplatte (96 Wells) ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen über Nacht wurde das Apoptose/Nekrose-Reagenz sowie DMSO, Tunicamycin (EK 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und zur Induktion der Apoptose Stauro (EK 500 nM) appliziert. Die Lumineszenz und Fluoreszenz wurde alle 60 min mit Hilfe des Tecan infinite M200 ausgelesen (3.2.2.5). Normiert wurden alle Messergebnisse auf die Werte der Kontrollpopulation (Ktr siRNA, gestrichelte Linie). Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen SEM. Gemittelt wurden im Versuchsaufbau A und B zwei und für C und D die Werte aus drei biologischen Replikaten (EK = Endkonzentration, Stauro = Staurosporin, Tu = Tunicamycin, SEM = engl. „standard error of the mean“)

4.2.2.6. Einfluss der SLC35B1-Depletion auf ER-Stress und UPR

Die Hypothese, dass SLC35B1 als ATP-Carrier der ER-Membran fungieren könnte, veranlasste die Vermutung, dass ein Fehlen von SLC35B1 aufgrund seiner siRNA-vermittelten Genstilllegung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde (Kapitel 4.2.2.1), Auswirkungen auf diverse intrazelluläre ATP-abhängige Funktionen hat. Das Hsp70-Chaperon BiP, das innerhalb des ER-Lumens äußerst abundant ist, übernimmt zahlreiche

Funktionen in den Signalwegen von ER-Stress, UPR, Induktion der Apoptose, Proteintransport etc. (Haas und Wabl, 1983, Hendershot, 2004, Dudek et al., 2009, Lang et al., 2017). In seiner Funktion als Chaperon ist BiP auf den ATPase-Zyklus und Hsp40-Co-Chaperone angewiesen und somit auch auf einen ausreichenden ATP-Pool (Otero et al., 2010). Da letzterer durch die Depletion von SLC35B1 als ATP-Carrier der ER-Membran beeinträchtigt sein könnte, lag die Frage nahe, ob unter diesen Bedingungen BiP-abhängige Prozesse ebenfalls gestört sind. Der Aspekt, der in diesem Kapitel deshalb genauer betrachtet wurde, ist der BiP-assozierte ER-Stress.

Hierfür wurden sowohl die mRNA-Level, als auch die Proteinlevel von stressinduzierten Genen bzw. Proteinen nach 96 h siRNA-vermittelter Depletion von SLC35B1 betrachtet. Die qRT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr (Med. Biochemie, UdS) durchgeführt. Wie in Abbildung 4.18, A dargestellt gelang die gezielte Induktion von ER-Stress-assozierten Proteinen durch Tu, das in die Glykoproteinsynthese eingreift. Die mRNA des Gens *HSPA5* (Protein = BiP), war unter diesen Umständen um ca. das 5-fache erhöht und die mRNA von *DDIT3* (Protein = CHOP), noch um ein Vielfaches mehr (2844 %). Die Depletion von SLC35B1 führte dazu, dass *DDIT3* induziert wurde und auch für *HSPA5* ließ sich dieser Effekt beobachten, jedoch weniger ausgeprägt. Der Wert schwankte hier jeweils um die Signifikanzgrenze, die für hochregulierte Gene auf 150 gesetzt wurde (vgl. Abbildung 4.12). Diese Effekte korrelierten mit der Effizienz der SLC35B1-Depletion, da die UTR#1 siRNA, die zu einer geringeren Rest-mRNA führte, auch die stärkeren Effekte in Bezug auf *HSPA5* und *DDIT3* aufwies als die *SLC35B1* siRNA#4.

Die Ergebnisse der verschiedenen mRNA-Abundanzen aus der qRT-PCR-Analyse wurden als nächstes mit der Synthese der ER-Stress-induzierten Proteine verglichen (Abbildung 4.18, B und C). Es wurden außerdem Zelllysate der Tu-behandelten Zellen zur Kontrolle für induzierten ER-Stress analysiert (schwarze Balken). Es erfolgte unter diesen Bedingungen eine deutliche Hochregulation von Grp94 und BiP und weniger stark von Grp170. Das Protein PDI war in seiner Synthese durch die Tu-Behandlung nicht verändert. Als nächstes wurden die stressassoziierten Proteine nach SLC35B1-Depletion betrachtet: für Grp170 und Grp94 ergaben sich keine Unterschiede der SLC35B1-depletierten Zellen (beide siRNAs) im Proteingehalt im Vergleich zur Kontrollpopulation (Ktr siRNA). In Kongruenz mit den leicht erhöhten mRNA-Leveln von *HSPA5* nach der SLC35B1-Depletion durch jede der beiden siRNAs war auch der Proteingehalt von BiP leicht erhöht auf im Mittel 134 % (UTR#1) bzw. 120 % (#4). Für PDI und ERj6 waren die Ergebnisse der Western Blots für die beiden verwendeten *SLC35B1* siRNAs heterogen, schwankten jedoch nur leicht um den Wert der

Kontrollpopulation, weshalb hier von keinem bedeutenden Unterschied auszugehen war. Das Hsp40-Co-Chaperon ERj3 zeigte im Mittel für beide *SLC35B1*-siRNA-behandelten Zellpopulationen eine Erhöhung, die bei Verwendung der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA nur leicht (115 %), aber bei Verwendung der *SLC35B1*#4 siRNA im Mittel deutlich ausfiel (169 %). Die Ergebnisse der immunologischen Detektion von S11 ergaben kein klares Bild für *SLC35B1*-depletierte Zellen, da die Tendenzen in Richtung Hochregulation bzw. Herunterregulation bei den beiden siRNAs entgegengesetzt ausfielen.

Die Untersuchungen zur *SLC35B1*-assoziierten ER-Stress-Induktion ergaben, dass die mRNA von *SLC35B1* bei der Induktion von ER-Stress hochreguliert wird. Fehlte *SLC35B1* kam es zur Hochregulation der *HSPA5*-mRNA, sowie BiP auf Proteinebene. Neben BiP kam es außerdem zur verstärkten Synthese von ERj3. Alle weiteren untersuchten Stress-assoziierten Proteine blieben von der 96-stündigen siRNA-vermittelten *SLC35B1*-Depletion unverändert. Der prominenteste Effekt ist die starke Induktion der *DDIT3*-mRNA nach siRNA-vermittelter *SLC35B1*-Depletion.

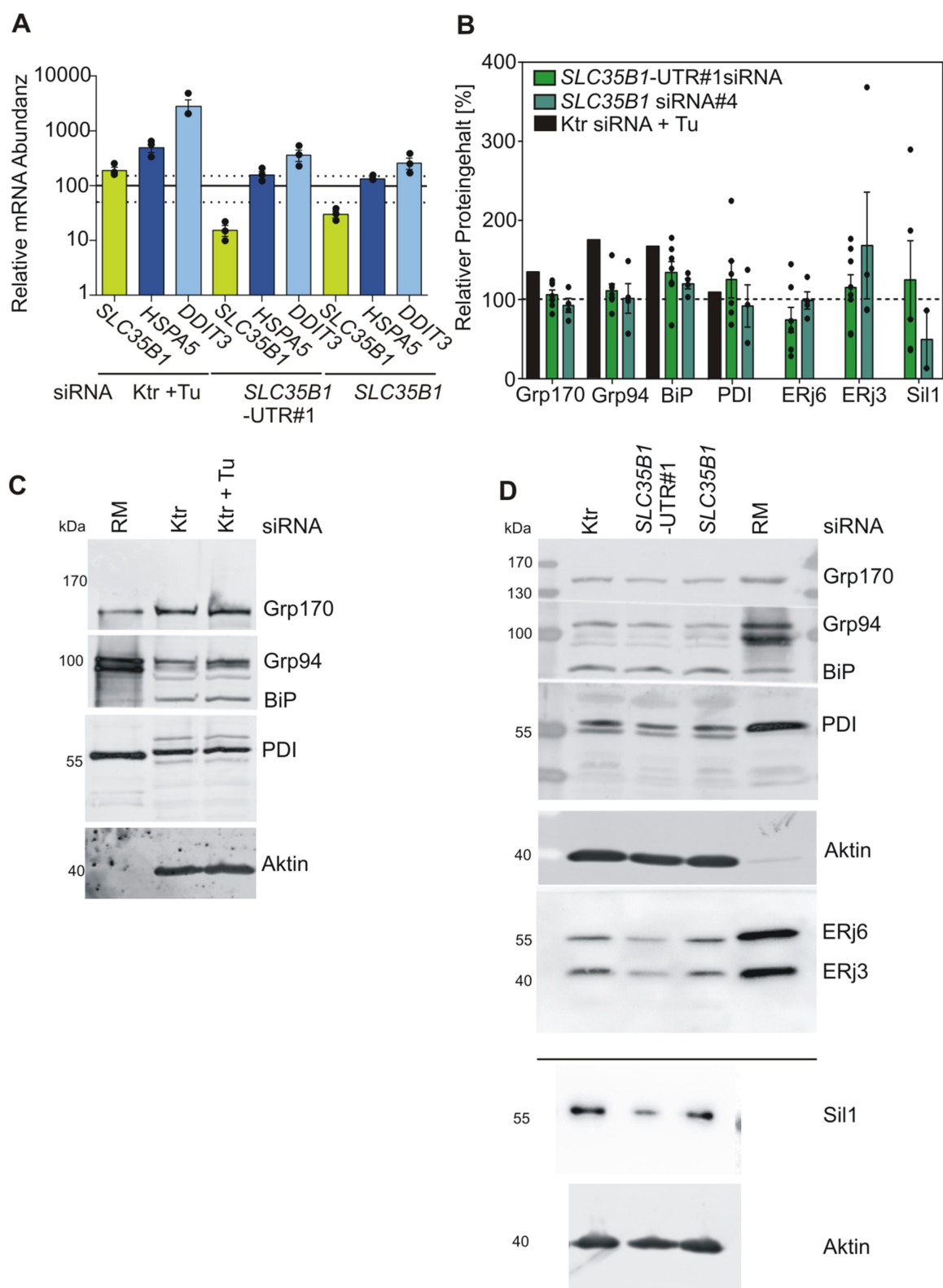


Abbildung 4.18: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf den ER-Stress in HeLa-Zellen. **A, B** Die HeLa-Zellen wurden ausgesät und für 96 h mit den angegebenen siRNAs behandelt (20 nM) (3.2.1.4.1). Außerdem wurde eine Population mitgeführt, die für 2 h mit 2,5 µg/ml Tunicamycin behandelt wurde, was die UPR induzierte. Nach 96 h wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5) und automatisiert gezählt (3.2.1.3). **A** qRT-PCR. Hierzu wurde die mRNA isoliert (3.2.4.5) und revers in cDNA transkribiert (3.2.4.6). Gleiche Mengen cDNA der verschiedenen Zellpopulationen wurden einer qRT-PCR unterzogen, wobei genspezifische Taqman-Sonden für

SLC35B1 und die stressinduzierten Gene *HSPA5* und *DDIT3* zum Einsatz kamen. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen *ACTB*, auf dessen relative Expression normalisiert wurde. Die Auswertung erfolgte weiterhin nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode zur Ermittlung der n-fachen Expression relativ zu Ktr siRNA (3.2.4.7). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM, die Punkte den Einzelwerten aus drei biologischen Replikaten. Die qRT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Stefan Schorr (Med. Biochemie, UdS) durchgeführt. **B** Western Blot und immunologische Detektion. Die für 96 h mit den *SLC35B1*-siRNAs behandelten Zellen wurden geerntet, zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin überprüft. Zellen, die für 2 h mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladekontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). Die relativen Werte beziehen sich auf die Ktr siRNA (gestrichelte Linie). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 3-8 Replikaten. **C** Repräsentative Western Blots von $0,3 * 10^6$ Zelläquivalenten der zu analysierenden Zellpopulationen. Die Abbildungshälften ober- und unterhalb der eingezeichneten Linie entsprechen jeweils einem Western Blot. (Tu = Tunicamycin, kDa = Kilodalton, RM = raue Mikrosomen, SEM = engl. „standard error of the mean“) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.3. Funktionelle Charakterisierung von SLC35B1

Das vorangehende Kapitel 4.2.2 beschäftigte sich mit der Erhebung der Daten rund um die Zellphysiologie SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen. Die etablierten Protokolle der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion (Kapitel 4.2.2.1) fanden in diesem Kapitel in funktionellen Assays Anwendung, um die Rolle des Proteins SLC35B1 in der ATP-Homöostase näher zu charakterisieren. Der FRET-Sensor ERAT4.01, mit dessen Hilfe die inverse Korrelation zwischen $\text{Ca}^{2+}_{\text{ER}}$ und ATP_{ER} aufgedeckt wurde (Vishnu et al., 2014), wurde in dieser Arbeit für ATP-Messungen im ER-Lumen von HeLa-Zellen genutzt. Neben den zellulären Assays in der HeLa-Zelllinie erfolgten weiterhin Messungen zum *in vitro* ATP-Transport in *E. coli*.

4.2.3.1. Lokalisation von SLC35B1 in HeLa-Zellen

Ein wichtiger Aspekt bei der funktionellen Untersuchung, vor allem neu zu charakterisierender Proteine besteht darin sie intrazellulär zu lokalisieren, was Hinweise auf ihre biologische Funktion liefert. Im Falle von SLC35B1, das in seiner Polypeptid-Sequenz ein ER-Retentionssignal enthält (Vincent et al., 1998), sollte validiert werden, dass es sich um ein ER-Protein handelte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden mehrere Methoden herangezogen. Zum einen erfolgte eine 3D-SIM-Mikroskopie zur visuellen Lokalisierung von exprimiertem SLC35B1-GFP. Zum anderen wurde sich der Frage biochemisch über eine Immunpräzipitation zur Analyse des Interaktoms von SLC35B1 genähert.

Nachweis von SLC35B1-GFP mittels 3D-SIM-Mikroskopie

Hierzu wurden, in freundlicher Zusammenarbeit mit PD Dr. Elmar Krause am Institut für Physiologie, UdS, hochauflösende 3D-SIM-Aufnahmen *SLC35B1-Iso1-GFP*-exprimierender

HeLa-Zellen angefertigt und die Lokalisation des GFP-Signals mit Signalen einer indirekten Immunfluoreszenz des ER-Membranproteins Sec62, das ein Bestandteil der Proteintranslokase ist, verglichen. Dazu wurden die Kanäle von GFP und Alexa594, das gekoppelt an den sekundären Antikörper gerichtet gegen Sec62 war, zunächst getrennt voneinander betrachtet. Hierbei fällt das punktförmige Sec62-Muster entlang der retikulären Tubuli auf, das zuvor bereits beobachtet wurde (Abbildung 4.19, A, vgl. auch Abbildung 4.16). Auch im GFP-Kanal ließen sich diese tubuläre Strukturen erkennen, die in der Überlagerung beider Kanäle eine sehr großflächige Kolokalisation mit Sec62 zeigten. Die Synthese des GFP-getaggen SLC35B1 wurde immunologisch mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 4.19, B).

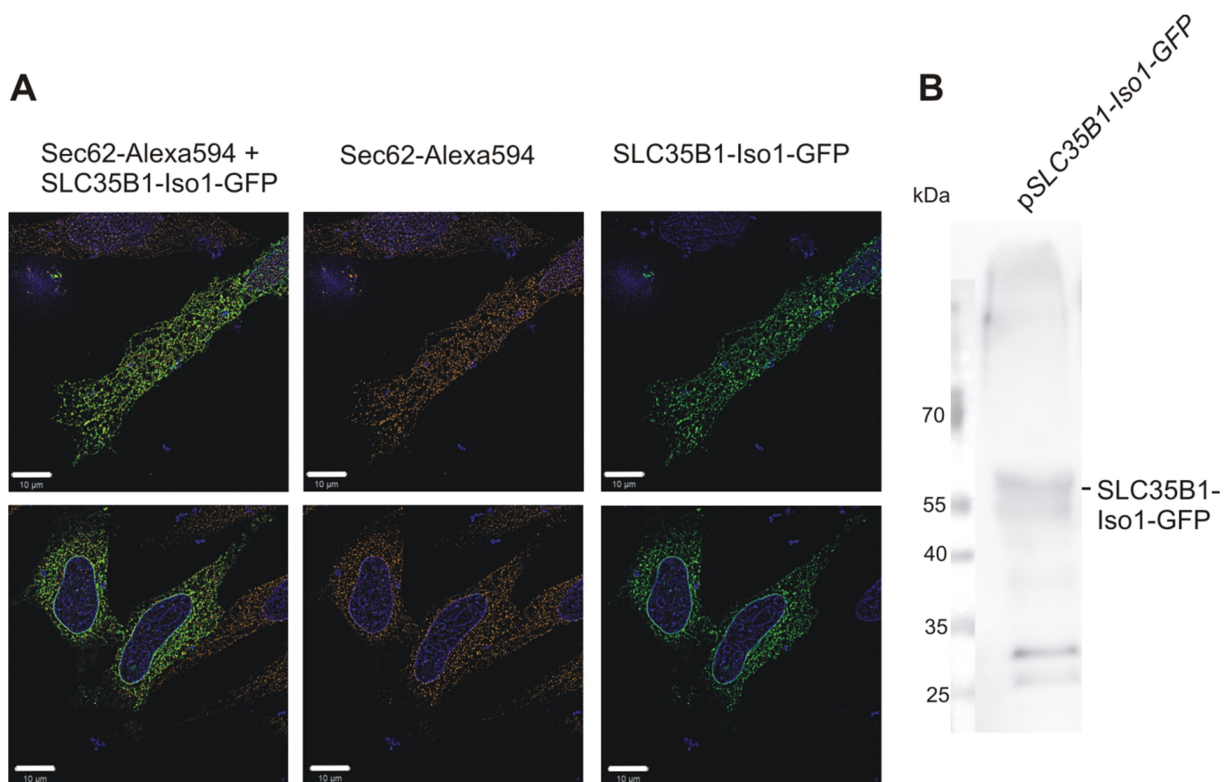


Abbildung 4.19: Lokalisation von SLC35B1 mittels 3D-SIM-Mikroskopie in HeLa-Zellen. A Die HeLa-Zellen wurden mit *pSLC35B1-Iso1-GFP* transfiziert und für 8 h inkubiert (3.2.1.4.2). Paraformaldehyd wurde zur Fixierung der Zellen genutzt bevor die ER-Struktur mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gerichtet gegen Sec62 abgebildet wurde (3.2.2.2.1). Das GFP-Signal des für 8 h exprimierten *SLC35B1-GFP* ist getrennt von dem Sec62-Signal und als übereinander gelegtes Bild dargestellt. Die hochauflösenden Aufnahmen des an den sekundären Antikörper gekoppelten Alexa594-Fluorophors wurden mithilfe des Elyra-SIM-Mikroskop angefertigt (PD Dr. Elmar Krause, Physiologie, UdS) (3.2.2.2.2). Die blauen Strukturen stellen DAPI-Färbungen der Zellkerne dar. Größenstandard: 10 μm (weiße Linie). B Western Blot von $0,3 \times 10^6$ Zelläquivalenten der 8 h mit *pSLC35B1-Iso1-GFP* transfizierten HeLa-Zellen. Die immunologische Detektion (3.2.3.6) erfolgte mit einem Antikörper, der gegen den tGFP-Tag gerichtet war. (kDa = Kilodalton) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Nachweis von SLC35B1 mittels Immunpräzipitation (IP) und Massenspektrometrie (MS)

Im vorherigen Abschnitt konnte die Kolo-kalisation des heterolog exprimierten SLC35B1-GFP mit dem ER-Membranprotein Sec62 gezeigt werden, was für die Vorstellung von SLC35B1 als ER-membranständiges Protein spricht. Um diese Aussage zu verifizieren wurde eine Immunpräzipitation (IP) beider Myc-DDK-getaggten Isoformen des SLC35B1 durchgeführt, um durch die Identifikation der Interaktionspartner Rückschlüsse auf dessen Lokalisation zu treffen. Hierfür wurden in HeLa-Zellen die Myc-DDK-getaggten Isoformen des SLC35B1 für 48 h exprimiert und mit diesen Lysaten IP durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem Detergens-haltigem (CHAPS) Puffer, was die Solubilisierung der Membranproteine sicherstellen sollte. Dann wurden die Zelltrümmer in einer Ultrazentrifugation pelletiert, um den Überstand, der einen Großteil der solubilisierten Proteine enthalten sollte, in die IP einzusetzen. Als Affinitätsmatrix diente eine mit einem Flag-Antikörper kovalent gekoppelte Agarose-Matrix, über die die Flag-getaggten SLC35B1-Isoformen (DDK = Flag) samt ihrer putativer Interaktionspartner präzipitiert werden konnten. Die Elution erfolgte kompetitiv mit einem synthetisierten Flag-Peptid. Als Kontrollpopulation dienten HeLa-Zellen, die mit Transfektionsreagenz ohne Plasmid behandelt wurden (Mock). Zur Evaluation wurden bei jedem Schritt Proben gesammelt und gelelektrophoretisch analysiert. Im Anschluss erfolgte eine Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue (Abbildung. 4.20, A) sowie parallel eine immunologische Detektion nach Western Blot (Abbildung 4.20, B und C). Die Coomassie-Färbung ließ zum einen auf die erfolgreiche Solubilisierung von SLC35B1 schließen, erkennbar an der Signalzunahme von Pellet zu Überstand (Ü-IP) und zum anderen auf die Präzipitation zahlreicher Proteine, neben der leichten (25 kDa) und schweren (55 kDa) Antikörperkette.

Die Präzipitation beider Isoformen von SLC35B1 konnte im Western Blot, wie in Abbildung 4.20, B (rechts) abgebildet, unter Verwendung eines Antikörpers gegen den Fusionstag DDK (=Flag), nachgewiesen werden. Der Größenunterschied der beiden Isoformen ist ebenfalls durch eine leichte Verschiebung des Molekulargewichtsbereichs erkennbar. Die IP der Proben unter Mock-Transfektionsbedingungen hingegen lieferte, wie erwartet, kein entsprechendes Signal. Zur Identifikation möglicher Interaktionspartner von SLC35B1 wurden die Proben weiterhin auf ER-assoziierte Proteine der Proteintranslokationsmaschinerie und ER-Stressantwort untersucht. Die α - und β -Untereinheiten des Sec61-Komplexes konnten spezifisch im Eluat der SLC35B1-exprimierenden Proben nachgewiesen werden, da die Proben nach der Mock-Transfektion keine vergleichbaren Signale lieferten (Abbildung 4.20,

C). Weitere Proteine in räumlicher Nähe zum Sec61-Komplex, wie Sec63, BiP, Sec62 oder Grp170 präzipitierten hingegen nicht mit einer der SLC35B1-Isoformen.

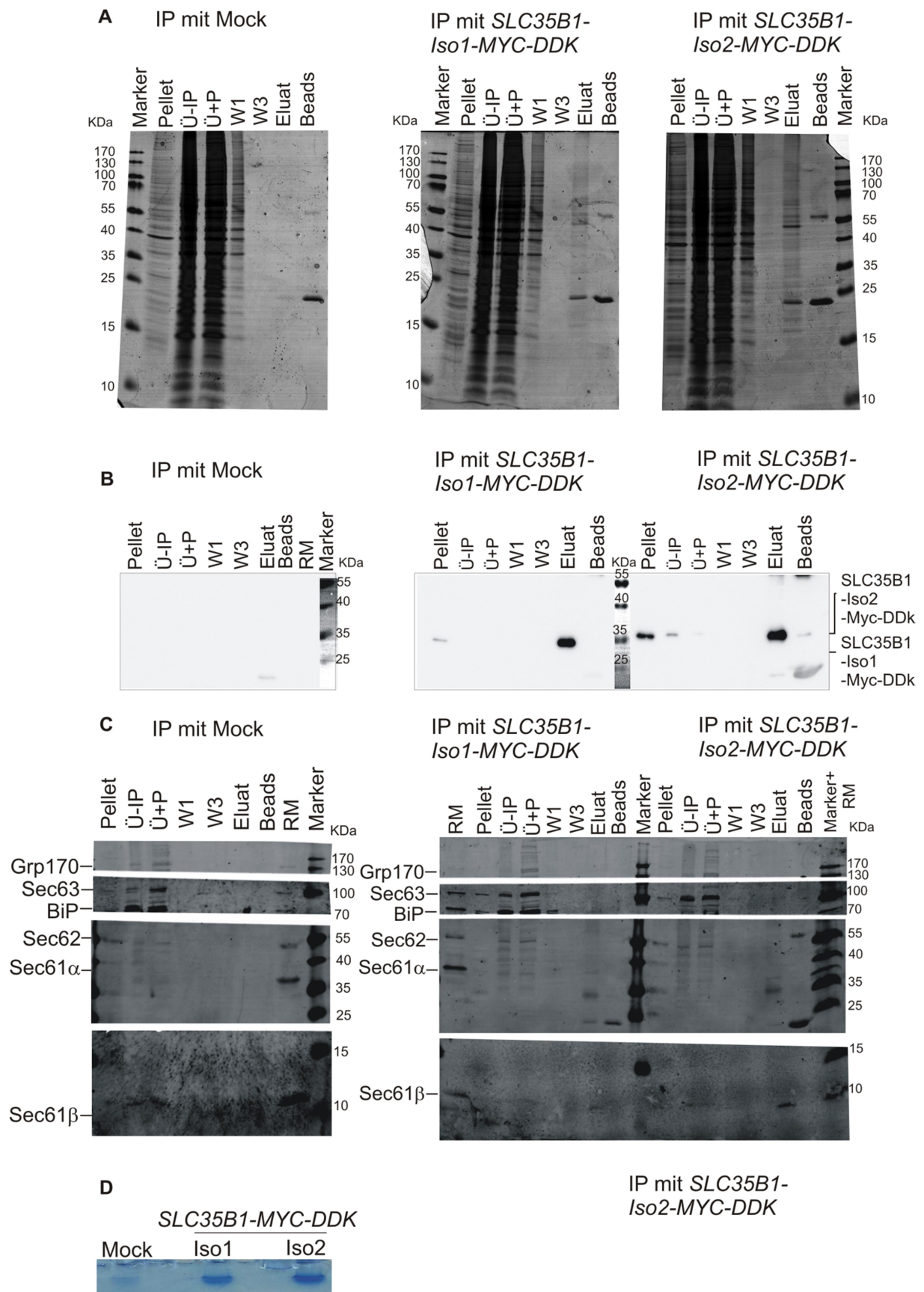


Abbildung 4.20: Lokalisation von SLC35B1-MYC-DDK mittels Immunpräzipitation (IP) in HeLa-Zellen. Die beiden Pasmide *pSLC35B1-Iso1-MYC-DDK* und *pSLC35B1-Iso2-MYC-DDK* wurden 48 h in HeLa-Zellen exprimiert (3.2.1.4.2). Anschließend wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5),

lysiert und ultrazentrifugiert (3.2.3.7). Die solubilisierten Proteine wurden mit der M2-FLAG-Affinitätsmatrix inkubiert und potentielle Interaktionspartner kompetitiv mit FLAG-Peptid eluiert. An den indizierten Schritten wurden jeweils $0,2 \times 10^6$ Zelläquivalente in Lämmli-Puffer aufgenommen und bei 56°C denaturiert. Eine Ausnahme bildeten die Eluate. Sie wurden vereinigt und die Proteine in einer TCA-Fällung konzentriert (3.2.3.7). Für die SDS-PAGE wurden $1,5 \times 10^6$ (*SLC35B1-Iso1* bzw. *Iso2-MYC-DDK*) bzw. $1,8 \times 10^6$ (Mock) Zelläquivalente verwendet. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (3.2.3.3) (**A**) oder alternativ mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (3.2.3.5) und immunologisch mit anti-DDK-Antikörper (**B**) oder mit verschiedenen Translokon-assoziierten Komponenten detektiert (3.2.3.6-9) (**C**). **D** $1,5 \times 10^6$ (*SLC35B1-Iso1* bzw. *Iso2-MYC-DDK*) bzw. $1,8 \times 10^6$ (Mock) Zelläquivalente wurden kurz mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt (3.2.3.8.1). Anschließend wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt (Dr. Claudia Fecher-Trost, Pharmakologie, UdS). (IP = Immunopräzipitation, Ü = Überstand, W = Waschschrift, RM = raue Mikrosomen, kDa = Kilodalton, Beads = engl. "M2-anti-Flag affinity gel")

Um die erhobenen immunologischen Daten und vermutete Interaktion von SLC35B1 mit Sec61 α und Sec61 β zu verifizieren, sollte als nächstes eine massenspektrometrische Analyse (MS) der Proben erfolgen. Dazu wurden diese nach kurzer Auftrennung in einer SDS-PAGE mit kolloidalem Coomassie gefärbt (Abbildung 4.20, D), aus dem Gel ausgeschnitten und zur MS gegeben. Letztere erfolgte in der Abteilung Pharmakologie (UdS) und wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Fecher-Trost durchgeführt. Die Ergebnisse der MS sind in Tabelle 4.1 nach absteigender Peptidtreffer dargestellt. Hierfür wurden die ersten 50 Treffer für beide Isoformen addiert, wobei die Treffer der Mock-Kontrolle als Hintergrund angesehen und subtrahiert wurden. Unter den 50 Proteinen, deren Peptide am häufigsten gefunden wurden, waren 26 ER- oder ER-assoziierte Proteine, 10 Plasmamembranproteine, sieben mitochondriale Proteine, drei Proteine die dem Golgi-Apparat zugeschrieben werden, zwei endosomale Proteine und jeweils ein Protein der inneren Kernmembran und des Ribosoms. Abbildung 4.21, A stellt die intrazelluläre Verteilung des SLC35B1-Interaktom graphisch dar. In Abbildung 4.21, B ist zusätzlich der Anteil der MAM-assoziierten Proteine, die selbst mehreren Kompartimenten angehören (Poston et al., 2013), an dem Gesamtinteraktom dargestellt. Diese Verteilung der immunpräzipitierten SLC35B1-Interaktionspartner unterstützt die Vermutung einer ER-membranständigen Lokalisation von SLC35B1.

Tabelle 4.1: Interaktom von SLC35B1 in HeLa-Zellen nach massenspektrometrischer Analyse immunpräzipitierter Proteine. Angegeben ist die Anzahl der Peptide potentieller SLC35B1-Interaktionspartner, die mittels MS gefunden wurden. Die Visualisierung und Validierung der MS-Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Scaffold (Einstellungen: Protein threshold 95 %, Peptide threshold 94 %, Min#Peptides = 1). (*=MAM-lokalisiert in murinem Gehirngewebe aus Poston et al., 2012, MW = Molekulargewicht, kDa = Kilodalton, P1 = Präzipitation mit SLC35B1-Iso1-Myk-DDK, P2 = Präzipitation mit SLC35B1-Iso2-Myk-DDK, BG = engl. „background“, Präzipitation mit Mock, Kontrolle) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Ergebnisse

	Protein	Accession #	MW	P1	P2	BG	P1+P 2-BG	Lokalisation
1	ATP synthase subunit beta	ATPB_HUMAN	57 kDa	148	213	6	355	Mito, MAM*
2	ATP synthase subunit alpha	ATPA_HUMAN	60 kDa	109	136	12	233	Mito, MAM*
3	4F2 cell-surface antigen heavy chain	4F2_HUMAN	68 kDa	103	85	2	186	PM, MAM*
4	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	AT2A2_HUMAN	115 kDa	76	63	0	139	ER, MAM*
5	B-cell receptor-associated protein 31	BAP31_HUMAN	28 kDa	48	64	1	111	ER
6	Cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4_HUMAN	66 kDa	46	54	0	100	ER, MAM*
7	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1_HUMAN	69 kDa	49	45	0	94	ER, MAM*
8	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	AT1A1_HUMAN	113 kDa	51	41	0	92	PM, MAM*
9	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMEDA_HUMAN	25 kDa	37	43	0	80	ER, MAM*
10	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_HUMAN	72 kDa	43	26	6	63	ER, MAM
11	Protein ERGIC-53	LMAN1_HUMAN	58 kDa	26	34	0	60	ER
12	Transferrin receptor protein 1	TFR1_HUMAN	85 kDa	29	28	0	57	PM
13	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	OST48_HUMAN	51 kDa	27	29	0	56	ER, MAM*
14	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	GALT2_HUMAN	65 kDa	32	24	0	56	Golgi
15	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	AT5F1_HUMAN	29 kDa	21	35	0	56	Mito
16	Calnexin	CALX_HUMAN	68 kDa	31	23	0	54	ER, MAM
17	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATPO_HUMAN	23 kDa	21	32	0	53	Mito, MAM*
18	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	TMED9_HUMAN	27 kDa	20	31	0	51	ER
19	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	ATPG_HUMAN	33 kDa	21	28	2	47	Mito
20	ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H_HUMAN	18 kDa	13	34	0	47	Mito, MAM*
21	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA_HUMAN	28 kDa	17	29	0	46	ER, MAM*
22	Basigin	BASI_HUMAN	42 kDa	21	25	1	45	PM, MAM*
23	Surfeit locus protein 4	SURF4_HUMAN	30 kDa	20	22	0	42	ER
24	Vesicle-trafficking protein SEC22b	SC22B_HUMAN	25 kDa	15	26	0	41	ER
25	Transmembrane 9 superfamily member 2	TM9S2_HUMAN	76 kDa	25	16	0	41	Endosom

26	Neutral amino acid transporter B(0)	AAAT_HUMAN	57 kDa	19	21	0	40	PM
27	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	RPN2_HUMAN	69 kDa	23	16	0	39	ER
28	Transmembrane protein 43	TMM43_HUMAN	45 kDa	19	20	0	39	INM
29	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR_HUMAN	36 kDa	20	18	0	38	ER
30	Minor histocompatibility antigen H13	HM13_HUMAN	41 kDa	20	18	0	38	ER
31	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	LAT1_HUMAN	55 kDa	18	20	0	38	PM
32	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	RL40_HUMAN	15 kDa	15	23	1	37	Ribosom
33	CD44 antigen	CD44_HUMAN	82 kDa	19	18	1	36	PM
34	Monocarboxylate transporter 4	MOT4_HUMAN	49 kDa	15	21	0	36	PM
35	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ITPR3_HUMAN	304 kDa	14	21	0	35	ER
36	Integrin beta-1	ITB1_HUMAN	88 kDa	20	15	0	35	Endosom, MAM*
37	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	TMED2_HUMAN	23 kDa	13	19	0	32	ER
38	Solute carrier family 35 member B1	S35B1_HUMAN	36 kDa	16	15	0	31	?
39	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type	ITPR1_HUMAN	314 kDa	8	22	0	30	ER, MAM*
40	Translocon-associated protein subunit delta	SSRD_HUMAN	19 kDa	14	16	0	30	ER
41	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	GALT1_HUMAN	64 kDa	18	11	0	29	Golgi
42	7-dehydrocholesterol reductase	DHCR7_HUMAN	54 kDa	12	16	0	28	ER
43	Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	TMED7_HUMAN	25 kDa	11	17	0	28	ER
44	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_HUMAN	89 kDa	18	9	1	26	ER, MAM*
45	Podocalyxin	PODXL_HUMAN	59 kDa	13	13	0	26	PM
46	ER membrane protein complex subunit 1	EMC1_HUMAN	112 kDa	15	11	0	26	ER
47	Transmembrane 9 superfamily member 3	TM9S3_HUMAN	68 kDa	19	6	0	25	PM
48	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB_HUMAN	27 kDa	9	11	0	25	ER
49	Golgi integral membrane protein 4	GOLI4_HUMAN	82 kDa	18	6	0	24	Golgi
50	Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1	S61A1_HUMAN	52 kDa	10	11	0	21	ER
51	Phosphate carrier protein, mitochondrial	MPCP_HUMAN	40 kDa	9	11	0	20	Mito, MAM*

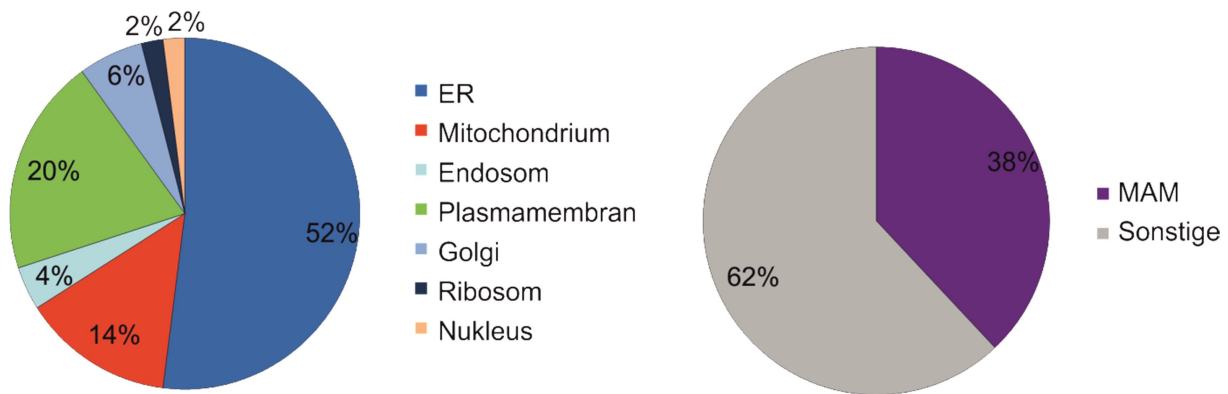


Abbildung 4.21: Intrazelluläre Lokalisation der mit SLC35B1 präzipitierten Proteine. A Verteilung der mit SLC35B1 präzipitierten Proteine auf deren intrazelluläre Kompartimente. **B** Anteil der MAM-lokalisierten Proteine an dem SLC35B1-Interaktom.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel die ER-ständige Lokalisation von SLC35B1 mittels unterschiedlicher Methoden nachgewiesen. Es wurde zum einen eine fluoreszenzbasierte, hochauflösende Mikroskopie von SLC35B1-GFP durchgeführt, die seine räumliche Nähe zu dem ER-Protein Sec62 zeigte. Zum anderen sprach auch das Spektrum der Interaktionspartner von SLC35B1-Myc-DDK nach Immunpräzipitation für eine Lokalisation von SLC35B1 in der ER-Membran.

4.2.3.2. ER-luminales „Live Cell ATP Imaging“ in SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen

Nachdem heterolog exprimiertes SLC35B1 mit GFP-Fusionstag in der ER-Membran lokalisiert werden konnte (Abbildung 4.19), sollte dessen Rolle im ATP-Transport vom Cytosol ins Lumen des ERs untersucht werden. Dazu wurde ein FRET-basiertes „Live Cell ATP Imaging“ im ER durchgeführt. Hierfür wurde der ER-lumemale ATP-FRET-Sensor ERAT 4.01 (Vishnu et al., 2014) in HeLa-Zellen exprimiert, in denen zuvor siRNA-vermittelt *SLC35B1* stillgelegt wurde. Die „Live Cell ATP Imaging“ Versuche wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Katharina Zimmermann und Prof. Dr. Ivan Bogeski (Institut für Biophysik, UdS) durchgeführt. Wie in Abbildung 4.22, A dargestellt, führte die Applikation von Tg, welche die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER-Lumen ins Cytosol nach sich zieht, erwartungsgemäß zu einem Anstieg von ATP im ER-Lumen (Vishnu et al., 2014). Das im weiteren Verlauf der Messung applizierte 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) ist ein potenter Inhibitor der Glykolyse, die in den anaerob verstoffwechselnden HeLa-Zellen die Hauptquelle für ATP darstellt (Lu et al., 2002, Mathupala et al., 2010). Die Inhibition der Glykolyse führt

zu einem Absinken des ATP-Levels im ER (ATP_{ER}). Beim Vergleich der beiden SLC35B1-depletierten Zellpopulationen mit der Kontrollpopulation (Ktr siRNA) waren zwei Charakteristika auffallend: zum einen das signifikant niedrigere ATP_{ER} der SLC35B1-depletierten Zellen (Abbildung 4.22, B) und zum anderen der niedrigere Tg-induzierte ATP_{ER} -Anstieg (Abbildung 4.22, C). Dabei waren die Effekte beider verwendeten SLC35B1 siRNAs vergleichbar. Als nächstes wurde die Spezifität dieser beobachteten Effekte der SLC35B1-Depletion auf die ATP-Homöostase mit Hilfe eines Komplementationsansatzes überprüft (Abbildung 4.22, D-F). Hierzu wurden zusätzlich zur siRNA gegen *SLC35B1-UTR#1*, Plasmide, die für die beiden *SLC35B1*-Isoformen kodieren, transfiziert. Im „Live Cell ATP Imaging“ konnte nach SLC35B1-Depletion durch die Expression beider SLC35B1-Isoformen nicht nur das niedrigere basale ATP_{ER} (Abbildung 4.22, E) sondern auch der Tg-induzierte ATP_{ER} -Anstieg auf das Level der Kontrollpopulation (Ktr siRNA + mock) gerettet werden (Abbildung 4.22, F).

Zusammengefasst zeigte sich die Verwendung des FRET-Sensors ERAT4.01 als potentes Mittel die ATP_{ER} -Veränderungen nach Depletion von SLC35B1 zu verfolgen. Es konnten ein basal verringerter ATP-Gehalt, sowie ein niedrigerer Tg-induzierter ATP_{ER} -Anstiegs als Folge der SLC35B1-Depletion nachgewiesen werden. Die Spezifität der beschriebenen Effekte konnte durch deren Umkehr nach der Komplementation mit SLC35B1-Isoform 1 bzw. -Isoform 2 verifiziert werden.

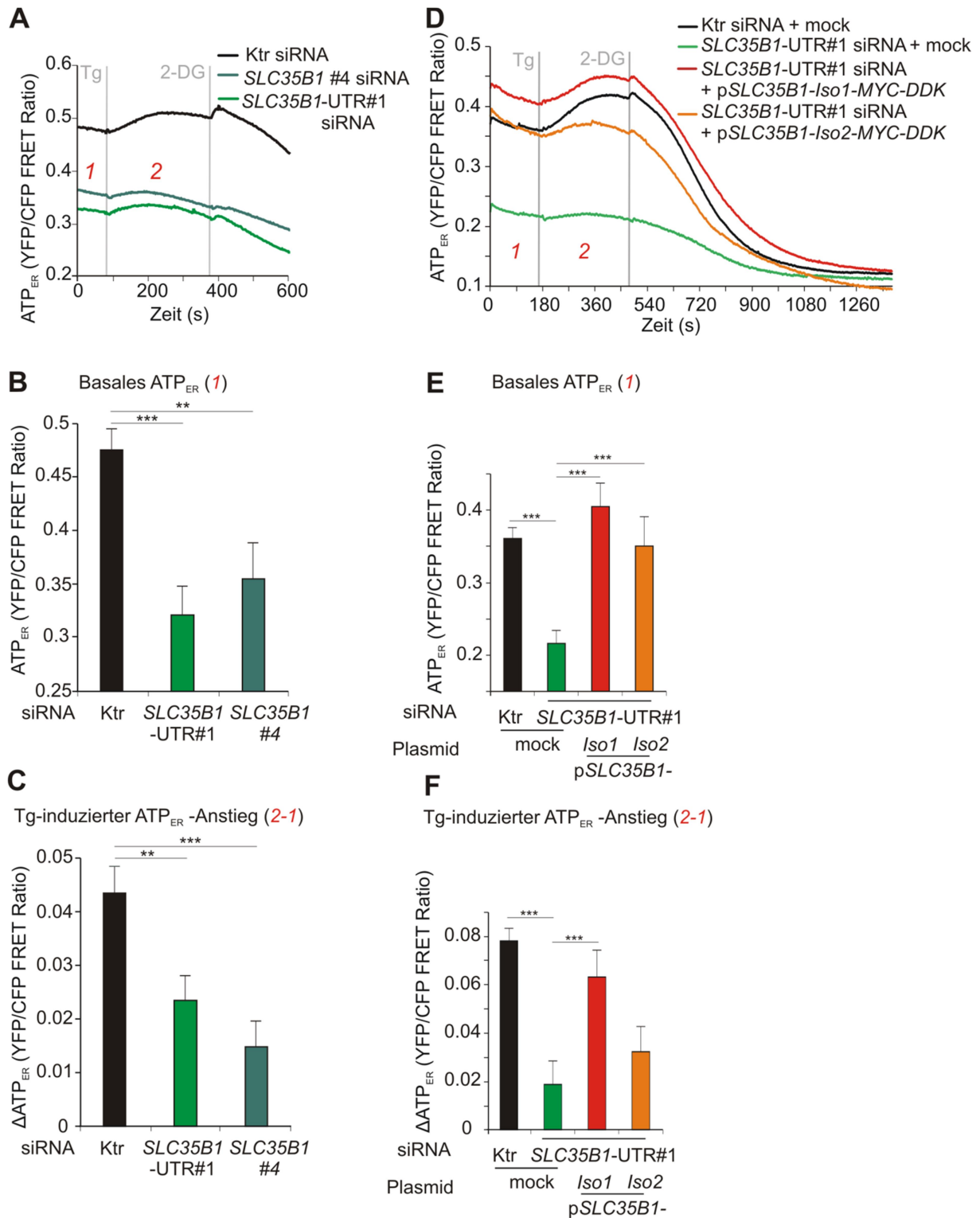


Abbildung 4.22: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den ATP_{ER}-Gehalt in HeLa-Zellen. A-F Die HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs für 96 h behandelt (20 nM) (3.2.1.4.1) und zusätzlich mit pSLC35B1-Iso1-MYC-DDK oder pSLC35B1-Iso2-MYC-DDK bzw. mock transfiziert (3.2.1.4.2) (D-F). 24 h vor dem „Live Cell ATP Imaging“ wurde der ERAT4.01-Sensor transfiziert. Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die FRET-Ratio F₅₃₅/F₄₈₀ wurde in Echtzeit aufgenommen (3.2.2.4.2). Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Katharina Zimmermann und Prof. Dr. Ivan Bogeski (Biophysik, UdS) durchgeführt. A, D Kinetische Aufnahmen der ER-luminalen ATP-Level (ATP_{ER}) und Detektion der Veränderungen nach Applikation von Tg (EK 1 μM) und 2-DG (EK 10 mM). Die einzelnen Kurven entsprechen den Mittelwerten aus Ktr siRNA n = 33 Zellen, SLC35B1-UTR#1 siRNA n = 20 Zellen und SLC35B1 #4 siRNA n = 21 Zellen in A

bzw. den Mittelwerten aus Ktr siNA + mock n = 71 Zellen, *SLC35B1*-UTR#1 siRNA + mock n = 39 Zellen, *SLC35B1*-UTR#1 siRNA + Iso1 n = 18 Zellen und *SLC35B1*-UTR#1 siRNA + Iso2 n = 13 Zellen D. **B, E** Quantifizierung der basalen ATP_{ER}-Konzentration aus A bzw. D. **C, F** Quantifizierung der Tg-induzierten ATP_{ER} aus A bzw. D. Die Werte jeder einzelnen Zelle vor Tg-Applikation (1) wurden von den Maximalwerten (2) subtrahiert. Die Balken aus B, C, E, F repräsentieren den Mittelwert + SEM aus 3 biologischen Replikaten. Die jeweils angedeuteten Populationen wurden mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Dabei galt * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (Tg = Thapsigargin, 2-DG = 2-Deoxy-D-Glukose, SEM = engl. "standard error of the mean", EK = Endkonzentration) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.3.3. Cytosolisches „Live Cell ATP-Imaging“ in *SLC35B1*-depletierten HeLa-Zellen

In Kapitel 4.2.3.2 wurde gezeigt, dass die siRNA-vermittelte Depletion von *SLC35B1* zu einer signifikanten Erniedrigung des ATP_{ER} führte. Diese Entdeckung ist insbesondere interessant, da *SLC35B1* als putativer ATP-Carrier der ER-Membran untersucht werden sollte. Als nächstes sollte analysiert werden ob und wie sich der cytosolische ATP-Gehalt (ATP_{Cyto}) der HeLa-Zellen in Folge der Depletion von *SLC35B1* änderte. Hierzu wurde ebenfalls ein FRET-basierter fluoreszenzmikroskopischer Ansatz gewählt, der den ATP_{Cyto} nach Applikation von Tg und 2-DG zeitlich auflösen sollte. Diese Messungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Katharina Zimmermann und Prof. Dr. Ivan Bogeski (Institut für Biophysik, UdS) realisiert. Die HeLa-Zellen wurden mit den beiden *SLC35B1*-siRNAs behandelt und 24 h vor der Messung mit dem FRET-Sensor ATeams transfiziert (Imamura et al., 2009). Die Abbildung 4.23 zeigt die kinetische Auflösung der Messung der drei betrachteten HeLa-Zellpopulationen (Abbildung 4.23, A) sowie den basalen ATP-Gehalt (Abbildung 4.23, B). Dabei wurden keine Unterschiede zwischen der Kontrollpopulation und den beiden *SLC35B1*-depletierten Populationen festgestellt.

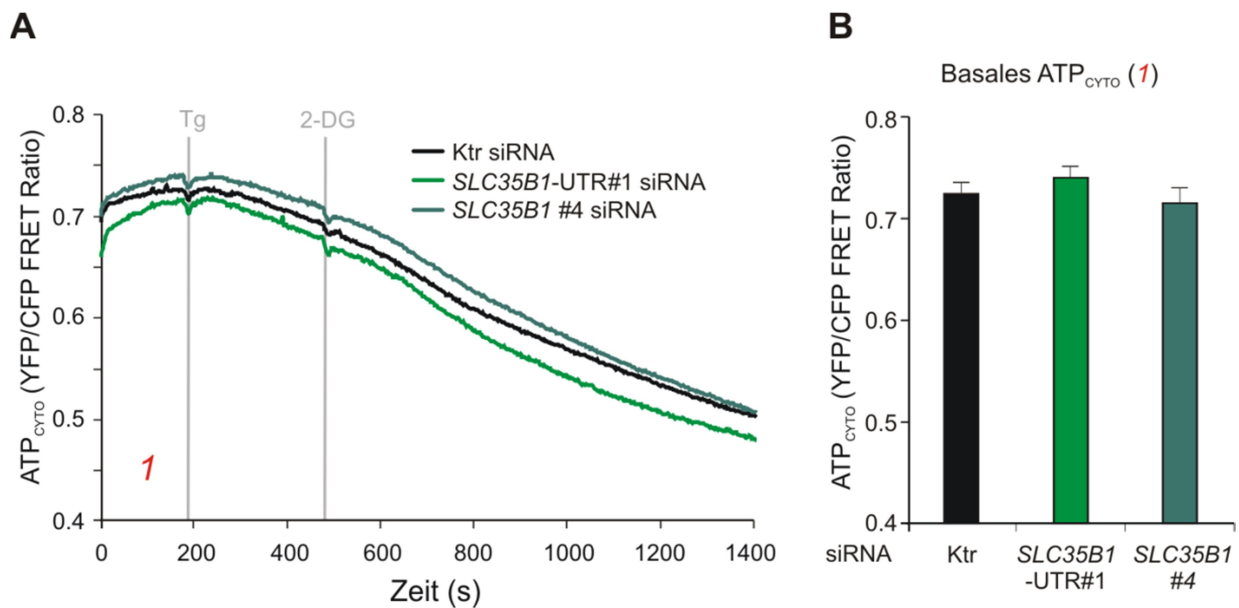


Abbildung 4.23: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den Gehalt von ATP_{Cyto} in HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs für 96 h behandelt (20 nM) (3.2.1.4.1). 24 h vor dem „Live Cell ATP Imaging“ wurde der ATeam-Sensor transfiziert. Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die FRET-Ratio als Indikator der cytosolischen ATP-Konzentration wurde in Echtzeit aufgenommen (3.2.1.4.2). Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Katharina Zimmermann und Prof. Dr. Ivan Bogeski (Biophysik, UdS) durchgeführt. **A** Kinetische Aufnahmen der cytosolischen ATP-Level (ATP_{Cyto}). Während der Messung wurden Tg (EK 1 μM) und 2-DG (EK 10 mM) appliziert. Die einzelnen Kurven entsprechen den Mittelwerten aus Ktr siRNA n = 116, SLC35B1-UTR#1 siRNA n = 95 und SLC35B1 #4 siRNA n = 57 aus 3 biologischen Replikaten. **B** Quantifizierung von ATP_{Cyto} aus A + SEM. (Tg = Thapsigargin, 2-DG = 2-Deoxy-D-Glukose, EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean") (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.3.4. Heterologe ATP/ADP-Importstudien von SLC35B1 in *E. coli*

Die FRET-basierten ATP_{ER}-Messungen mit dem ERAT 4.01-Sensor legten offen, dass es nach endogener Depletion von SLC35B1 zu einem erniedrigten ATP_{ER} kam (Abbildung 4.22). Dies sprach für einen Einfluss von SLC35B1 auf die ER-Energiehomöostase. Um die Funktion des Proteins in Bezug auf ATP-Transport genauer zu untersuchen, wurden die verschiedenen Isoformen von SLC35B1 in *E. coli*-Zellen exprimiert und *in vitro* ATP-Assays durchgeführt. Letztere wurden von Dr. Ilka Haferkamp (Pflanzenphysiologie, TU KL) durchgeführt. In Abbildung 4.24 ist die Aufnahme von radioaktivem ATP und ADP in die Zellen dargestellt. Es kam bei Expression der Isoformen 1 und 2, sowie der GFP-getaggen Isoform 1 zu einer sehr effizienten Aufnahme von ADP und ATP in die Zellen, wohingegen diese Aufnahme nach Expression der verkürzten Isoform 3 deutlich verringert war (Abbildung 4.24, G und H). Als Kontrolle dienen nicht induzierte *E. coli*-Zellen, die keine ADP und ATP-Aufnahme zeigten (hellgraue Datenpunkte).

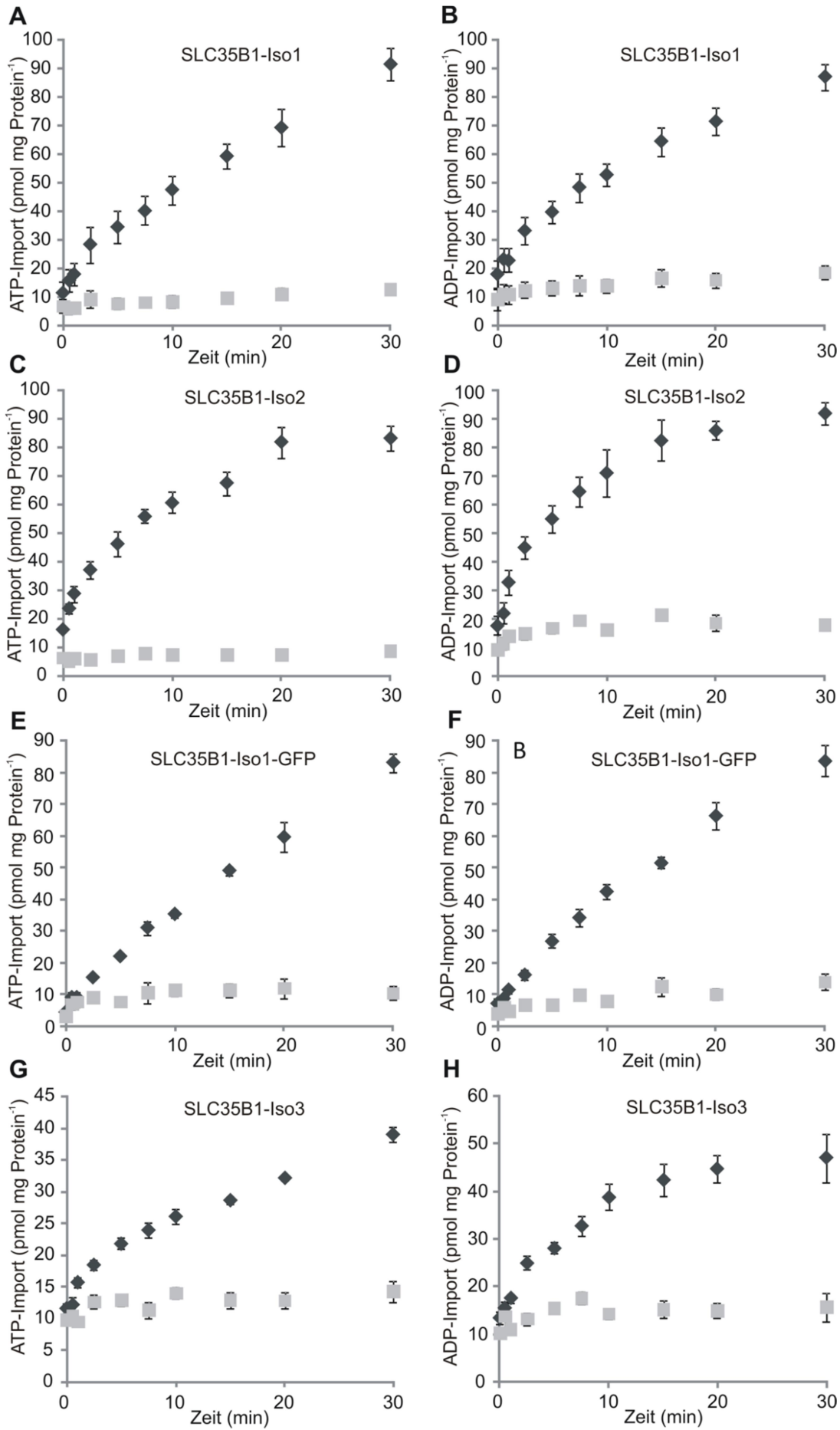


Abbildung 4.24: Effekt heterolog exprimierter SLC35B1-Isoformen auf den ATP und ADP-Import in *E. coli*. Die verschiedenen SLC35B1-Isoformen (Isoform 1 in A und B, Isoform 2 in C und D, Isoform 1-GFP in E und F und Isoform 3 in G und H) wurden in *E.coli* exprimiert und die Aufnahme von 50 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP (A, C, E, G) oder [$\alpha^{32}\text{P}$]ADP (B, D, F, H) in die Zellen wurde gemessen (Dr. Ilka Haferkamp, Pflanzenphysiologie, TU KL) (3.2.2.4.3). Als Kontrolle dienen jeweils nicht-induzierte *E. coli*-Zellen. Angegeben ist der Mittelwert aus mindestens 3 Experimenten \pm SEM (SEM = engl. "standard error of the mean") (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Weiterhin wurden Kompletionsassays mit den nicht radioaktiven Substraten/Effektoren aus Tabelle 4.2 durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen ließ sich zusammenfassend folgern, dass lediglich ATP und ADP zu einer Kompetition des radioaktiven [$\alpha^{32}\text{P}$]ATPs in der Lage waren und somit die Substrate von SLC35B1 darstellen.

Tabelle 4.2: Effekte verschiedener nicht-radioaktiver Substrate und Effektoren auf den SLC35B1-vermittelten ATP-Transport. Die zelluläre Aufnahme von 50 μM [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP erfolgte für 5 min (100%) in SLC35B1-Iso1 oder Iso2 exprimierenden *E. coli*-Zellen. Der entsprechende Transport in Anwesenheit der u.g. nicht-radioaktiven Substrate (500 μM) oder Effektoren wurde entsprechend ermittelt (Dr. Ilka Haferkamp, Pflanzenphysiologie, TU KL) (3.2.2.4.3). Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Normalisierung mit ATP-Importen von nicht-induzierten *E.coli*-Zellen). Die fett gedruckten Werte entsprechen signifikant reduziertem Transport ($< 60\%$ der Kontrolle). (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Effector	SLC35B1		SLC35B1-Isoform 2	
	Transport (%)	\pm SEM (%)	Transport (%)	\pm SEM (%)
ATP	37.1	4.5	31.2	3.0
ADP	48.6	3.1	43.5	3.7
AMP	85.1	7.4	88.0	4.3
UTP	114.0	12.6	106.4	12.9
GTP	124.2	16.5	100.1	11.9
CTP	122.6	10.2	109.2	7.7
UDP Glukose	129.5	13.5	105.9	8.4
UDP Galaktose	107.3	5.6	93.9	1.5
UMP	105.4	14.6	98.1	3.9
UDP	126.8	19.5	92.7	2.9
UDP-Nac-Glc- AmN	120.5	13.9	106.5	12.3
GDP Mannose	110.4	3.7	99.5	7.9
Mg ²⁺ 500 μM	113.4	9.6	106.5	5.2
Ca ²⁺ 10 μM	105.5	7.6	106.7	12.5
Ca ²⁺ 50 μM	119.8	19.0	109.6	7.0

EDTA 200 μ M	146.8	10.8	114.0	10.8
EGTA 20 μ M	114.6	4.9	103.6	6.2
EGTA 200 μ M	120.8	9.2	105.3	8.6

Darüber hinaus wurde der Modus des Transports untersucht und als Antiport-Modus charakterisiert, da radioaktives [α ³²P]ATP durch einen Überschuss an nicht radioaktivem ATP verdünnt werden konnte (Abbildung 4.25, A und B). Darüber hinaus wurden zur Validierung dieser Ergebnisse Proteoliposomen, die solubilisierte Membranproteine der heterolog SLC35B1- oder SLC35B1-Iso2-exprimierenden *E. coli*-Zellen enthielten, zunächst mit ATP und ADP vorgeladen. Anschließend wurde der Import von radioaktivem ATP oder ADP in die Proteoliposomen verfolgt und mit Proteoliposomen verglichen, die nicht vorgeladen waren. Daraus ließ sich für beide SLC35B1-Isoformen ein Import von ATP sowie ADP ableiten, der den Antiportmodus aus A und B unterstützt (Abbildung 4.25, C-F).

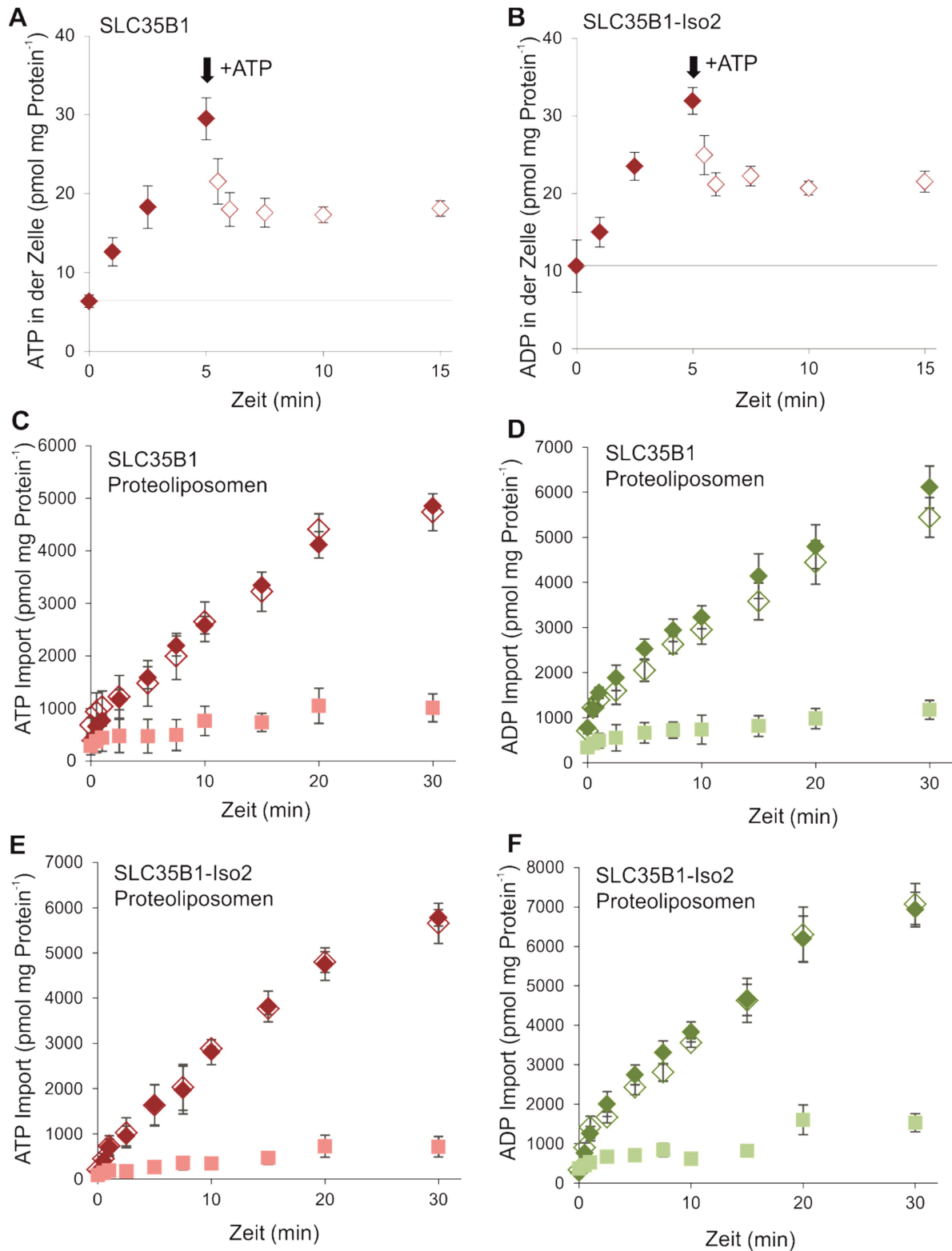


Abbildung 4.25: Bestimmung des ATP/ADP-Antiport-Modus von SLC35B1. Import von 20 μM [α^{32} P]ATP (ausgefüllte Symbole) in *E. coli*-Zellen, die mit SLC35B1-Iso1 (A) oder SLC35B1-Iso2 (B) transfiziert wurden. Nach 5 min wurde der Efflux des [α^{32} P]ATP durch einen Überschuss an nicht-radioaktivem ATP (200 μM) induziert (nicht ausgefüllte Symbole) (Dr. Ilka Haferkamp, Pflanzenphysiologie, TU KL) (3.2.2.4.3). C-F Proteoliposomen mit integrierten Membranproteinen aus *E. coli*-Zellen, die mit SLC35B1-Iso1 (C,D) oder SLC35B1-Iso2 (E,F) transfiziert wurden. Gezeigt ist die Akkumulation von 50 μM [α^{32} P]ATP (C, E) oder [α^{32} P]ADP (D, F) in unbeladenen (Quadrate) oder mit 10 mM ATP (ausgefüllte Rauten) oder ADP (nicht ausgefüllte Rauten) vorgeladenen Proteoliposomen. Die Aufnahme wurde nach 2 min gestoppt.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus mindestens 3 verschiedenen Experimenten. (SEM = engl. "standard error of the mean") (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Zum Nachweis, dass der beobachtete ADP und ATP-Transport durch heterolog exprimiertes *SLC35B1* vermittelt wurde und es zu einer Membranintegration des synthetisierten Proteins in die *E. coli*-Zellen kam, wurde ein Western Blot der Membranfraktion transformierter *E. coli*-Stämme angefertigt. Die Lysate aus Zellen, deren heterologe Expression mit Isopropyl- β -thiogalacto-pyranosid (IPTG) induziert wurde, wurden mit solchen verglichen, die nicht induziert wurden und daher als Kontrolle dienten. In Abbildung 4.26, A wurde die Synthese der verschiedenen Isoformen mit einem SLC35B1-spezifischen Antikörper nachgewiesen und mit einem Pfeil bei dem jeweiligen Molekulargewicht markiert. Abbildung 4.26, B zeigt den Western Blot aus Abbildung 4.26, A, auf dem die Proteine nachträglich mit Coomassie angefärbt wurden. Er diente als Ladekontrolle und zeigte, dass vergleichbare Mengen an Protein in die SDS-PAGE eingesetzt wurden. Da die SLC35B1-Isoformen, die zur Expression in *E. coli* benutzt wurden einen His-Tag enthielten, konnten die entsprechenden Isoformen ebenso mittels anti-His-Antikörper identifiziert werden und sind wiederum mit Pfeilen markiert (Abbildung 4.26, C).

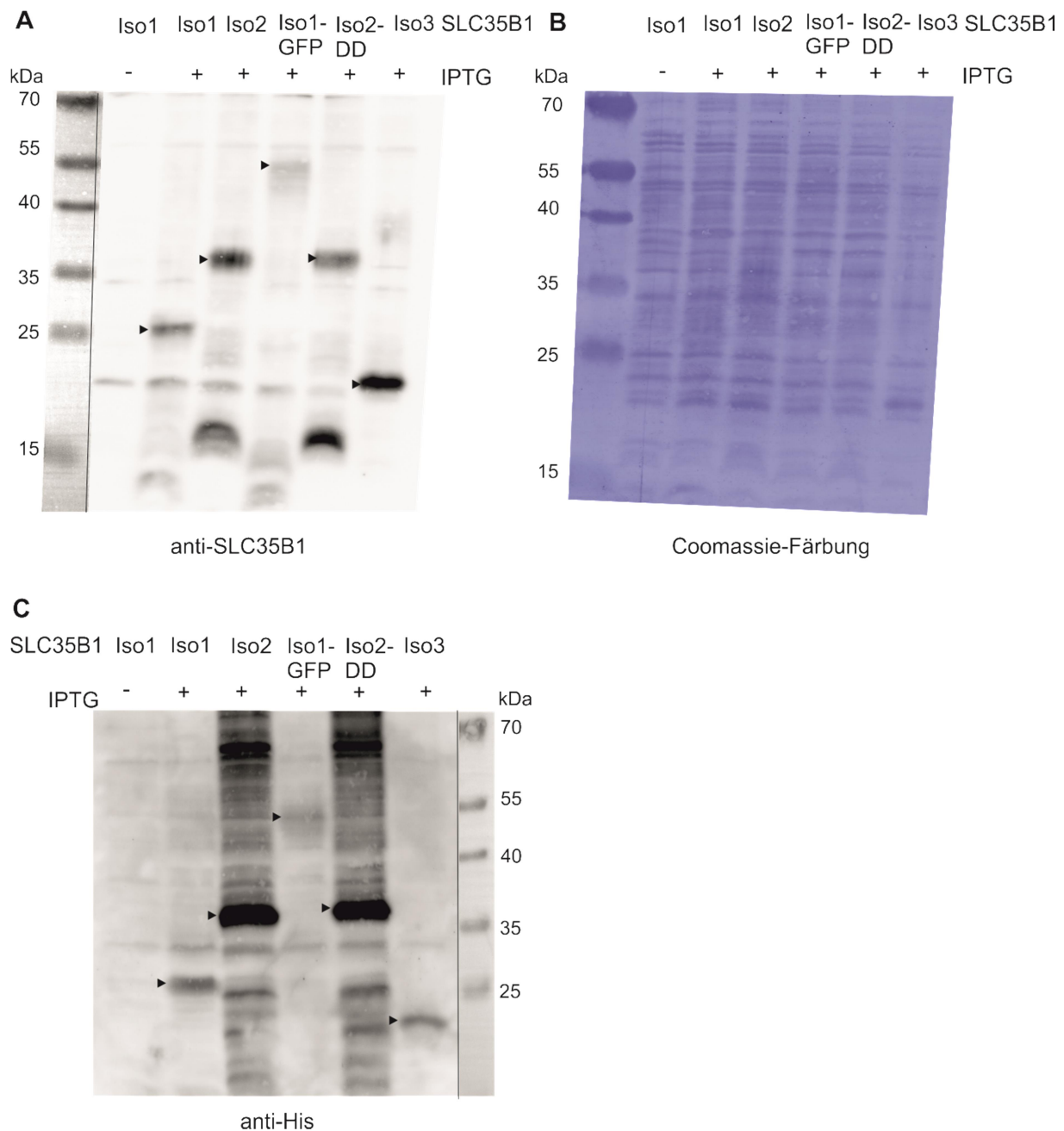


Abbildung 4.26: Heterologe Expression der verschiedenen Isoformen von SLC35B1 in *E. coli*-Zellen. Die cDNAs der verschiedenen *SLC35B1*-Isoformen wurden in den Expressionsvektor pET300 inseriert und transformiert (Dr. Patrick Klemens, Pflanzenphysiologie, TU KL). Die Synthese der rekombinanten Proteine wurde mit IPTG für 1 h induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und so aufgearbeitet, dass Membranproteine angereichert wurden (3.2.3.9). **A-C** 25 µg der Proteinlösung wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.3.1), mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (3.2.3.5) und mit anti-SLC35B1 (**A**) bzw. anti-His (**C**) immunologisch detektiert (3.2.3.6). **B** Der Western Blot aus **A** wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und diente als Ladekontrolle. (kDa = Kilodalton, IPTG = Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, DD = phosphomimetische Mutante der SLC35B1-Isoform 2) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.3.5. ADP/ATP-Messungen in HeLa-Zellysaten nach SLC35B1-Depletion

Das Kit „ApoSensor“ der Firma Biovision wurde entwickelt, um den zellulären Status der Apoptose bzw. Nekrose zu detektieren. Dazu wurde Luziferase-basiert die Menge von ADP und ATP intrazellulär durch die Biolumineszenz-emittierende Umsetzung von Luciferin und ATP gemessen. Die beiden Nukleotide ADP und ATP sind von großem Interesse im Rahmen der Fragestellung der intrazellulären Energiehomöostase nach Depletion von SLC35B1, weshalb mit Hilfe des „ApoSensor“-Assays in SLC35B1-depletierten HeLa-Zellpopulationen die Menge an ADP bzw. ATP bestimmt wurde. Es fiel auf, dass die gemessene Lumineszenz für ATP und ADP keine großen Unterschiede zwischen SLC35B1-depletierten und Kontrollpopulationen (Ktr siRNA) aufwies (Abbildung 4.27, A und B). Lediglich die Population, die mit *SLC35B1*-UTR#1 siRNA behandelt worden war, wies einen leicht verminderten ATP- bei gleichzeitig erhöhtem ADP-Gehalt auf, was für eine beginnende Apoptose sprechen kann. Als nächstes schloss sich die Frage nach der Verteilung der ATP-Pools innerhalb der Zellen an und welchem Kompartiment (Fraktion) der gemessene ATP-Gehalt entspricht. Dazu wurden die HeLa-Zellen nach ihrer Behandlung mit entweder Ktr siRNA oder *SLC35B1*-UTR#1 siRNA mit Digitonin behandelt, wodurch selektiv die Plasmamembran ruptiert wird, aber die ER-Membran intakt bleibt (Wilson et al., 1995). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und die Lumineszenz des Überstands als cytosolische Fraktion („Cytosol“) und des Pellets als Organellenfraktion („Organellen“) bestimmt (Abbildung 4.27, E). Bei der Verteilung von ATP wurde deutlich, dass beinahe der vollständige Pool in der Cytosolfraktion vorhanden war. Auch ADP war in der Cytosolfraktion im Vergleich zu den Organellen überrepräsentiert, etwa die doppelte Menge verglichen mit dem Gehalt der Organellen.

Damit wurde gezeigt, dass sich der Gesamt-ATP-Gehalt, der mit diesem Assay detektierbar war, zwischen Ktr siRNA- und *SLC35B1* siRNA-behandelten HeLa-Zellen nicht wesentlich unterschied. Zum anderen wurde aufgedeckt, dass der größte Pool an ATP, der detektiert wurde, aus der Cytosolfraktion stammte, wenn die HeLa-Zellen zuvor digitonisiert wurden.

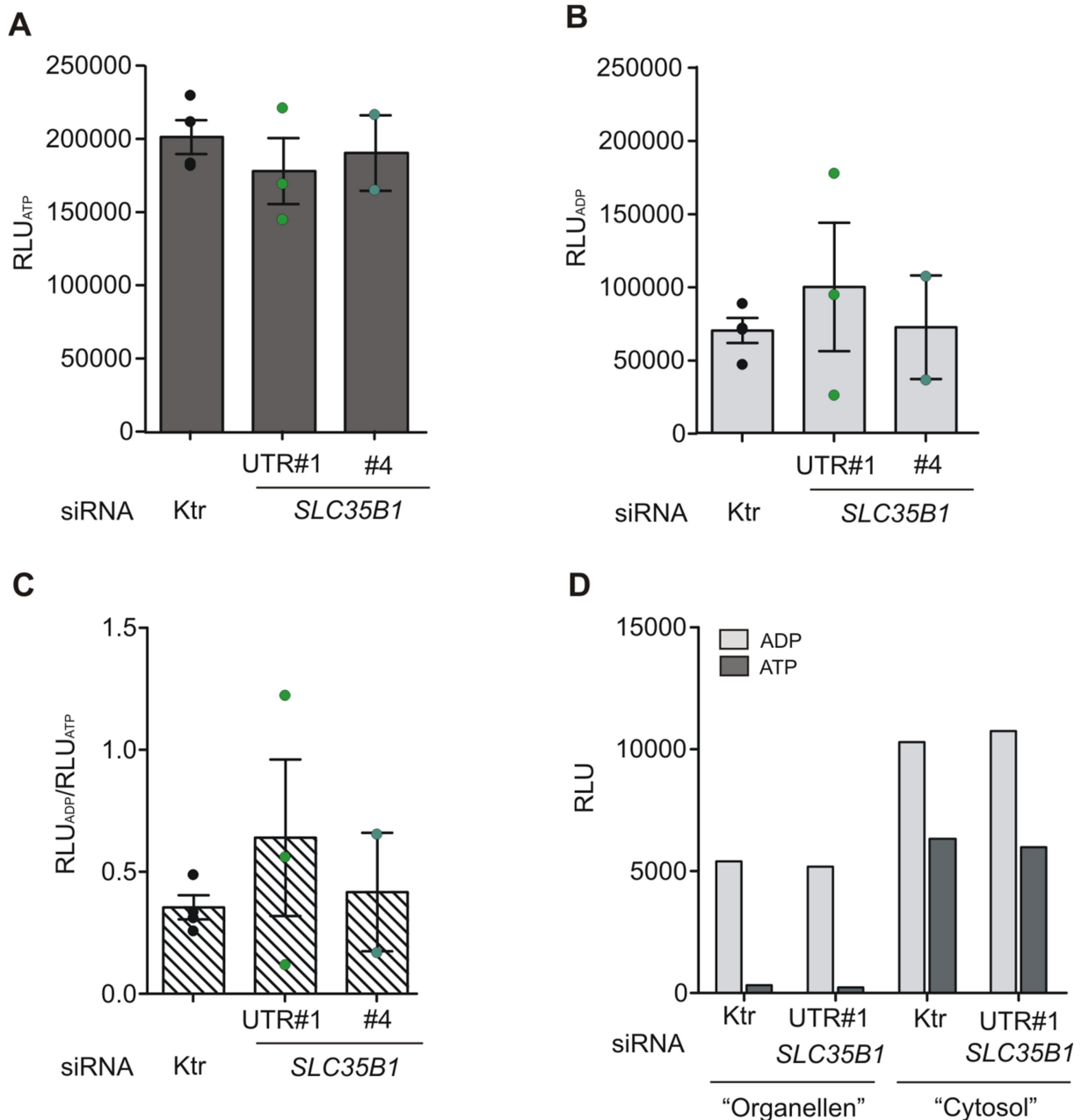


Abbildung 4.27: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den intrazellulären ADP- und ATP-Gehalt in HeLa-Zelllysaten. A-D Die Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs für 96 h behandelt (20 nM) (3.2.1.4.1). Zur Luciferase-basierten ATP- (A) bzw. ADP- (B) Messung wurden die Zellen, geerntet (3.2.1.5), automatisiert gezählt (3.2.1.3) und nach Herstellerangaben eingesetzt (3.2.2.4.1). C Gebildet wurde die Ratio aus den RLU der ADP- und der ATP-Bestimmungen. Angegeben sind die Mittelwerte (Balken) \pm SEM aus den in Punkten dargestellten 2-4 Einzelversuchen. D Bestimmungen zur intrazellulären ADP- und ATP-Verteilung. Die HeLa-Zellen wurden 96 h mit den angegebenen siRNAs behandelt, geerntet, automatisiert gezählt und danach digitonisiert (3.2.2.4.1). Der Überstand wurde als cytosolische Fraktion („Cytosol“) weiterverarbeitet und die semipermeabilisierten Zellen stellten die Organellenfraktion („Organellen“) dar. (RLU = engl. "relative luminescence units", SEM = engl. "standard error of the mean") (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

4.2.4. Untersuchungen zum funktionellen Netzwerk in Zusammenhang mit SLC35B1 und der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten passiven Ca²⁺-Leckstroms aus dem ER/und der regulatorischen Route

In Kapitel 4.2.3.1 wurde mittels 3D-SIM-Mikroskopie eines GFP-getaggten SLC35B1 sowie über IP und anschließender MS seines Interaktoms gezeigt, dass SLC35B1 ein ER-membranständiges Protein darstellt. Dies in Verbindung mit funktionellen ATP und ADP-Transportstudien in SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen (Kapitel 4.2.3.4), sowie Versuchen mit einem ER-gerichteten ATP-Sensor, der für SLC35B1-depletierte HeLa-Zellen einen geringeren ATP-Gehalt detektierte (Kapitel 4.2.3.2), legen die Funktionalität von SLC35B1 als ER-ATP-Austauscher nahe. Letzteres ist für die Zellphysiologie von großer Bedeutung. Dennoch bleibt die Frage wie die Zelle auf Energiemangelzustände reagiert und wie die Organellen miteinander in Verbindung stehen um die Energiehomöostase aufrecht zu erhalten. Das folgende Kapitel spinnt sich, um diese Frage nach den regulatorischen Netzwerken für den ATP-Import ins ER. Eine interessante Entdeckung wurde 2014 von Vishnu et al. mit der inversen Regulation von Ca²⁺ und ATP im ER gemacht (Vishnu et al., 2014). Da an der Ca²⁺-Homöostase des ER viele Translokon-assoziierte Proteine beteiligt sind, wurde die Frage aufgeworfen, ob die Energie- und Translokon-assoziierte Ca²⁺-Homöostase miteinander in Verbindung stehen.

4.2.4.1. Funktioneller Zusammenhang zwischen SLC35B1 und dem Hsp70-Chaperon BiP

Das Hsp70-Chaperon BiP spielt eine bedeutende Rolle in der Faltung von Proteinen und ist in seiner Aktivität auf einen ATPase-Zyklus angewiesen (siehe Kapitel 2.2.2.1). Das Ziel des folgenden Abschnittes ist es, das verringerte Vorkommen von ATP aufgrund der Depletion von SLC35B1 und somit kompromittierter ATP-Importfunktion in das ER-Lumen in eingeschränkten BiP-Funktionen widerzuspiegeln. Zunächst wurde dazu der *in vitro* Transport von Präproapelin untersucht, das eine Abhängigkeit seines Transportverhaltens von BiP zeigt (Hassdenteufel et al., 2018). Der ER-Import von Präproapelin in SP-Zellen SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen wurde unter co- und post-Transportbedingungen untersucht, ebenso wie der des BiP-unabhängigen Vorläuferproteins Präprolaktin (Schäuble et al., 2012) und mit dem Transport von SP-Zellen der Kontrollpopulation (Ktr siRNA) verglichen. Als Kontrollsubstrat wurde außerdem das „tail-anchor“-Membranprotein Sec61 β untersucht, das unabhängig von Sec61 α und BiP in die ER-Membran inseriert (Hassdenteufel

et al., 2018). Zur Identifikation untransportierter Vorläuferformen der eingesetzten Substrate wurde für jedes Substrat ein Ansatz ohne semipermeabilisierte Zellen mitgeführt (Puffer). Um die Transporteffizienz (Glykosylierung oder Prozessierung) zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil der transportierten Form an dem gesamten Protein (Vorläufer und transportierte Form) ermittelt. Der Transport von Präproopelin unter co-Bedingungen war für die beiden SLC35B1-depletierten Populationen unterschiedlich beeinflusst (Abbildung 4.28, A und B). Nach Depletion mit der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA war der Transport von Präproopelin im Mittel mit 114 % leicht erhöht, wohingegen die HeLa-Zellen, die mit der *SLC35B1* #4 siRNA behandelt wurden einen Translokationsdefekt aufwiesen mit im Mittel 76 % im Vergleich zur Kontrollpopulation (Abbildung 4.28, A und B). Der Transport von Präprolaktin war für die SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen um das 1,5- bis 2-fache verbessert im Vergleich zur Kontrollpopulation (Abbildung 4.28, C und D).

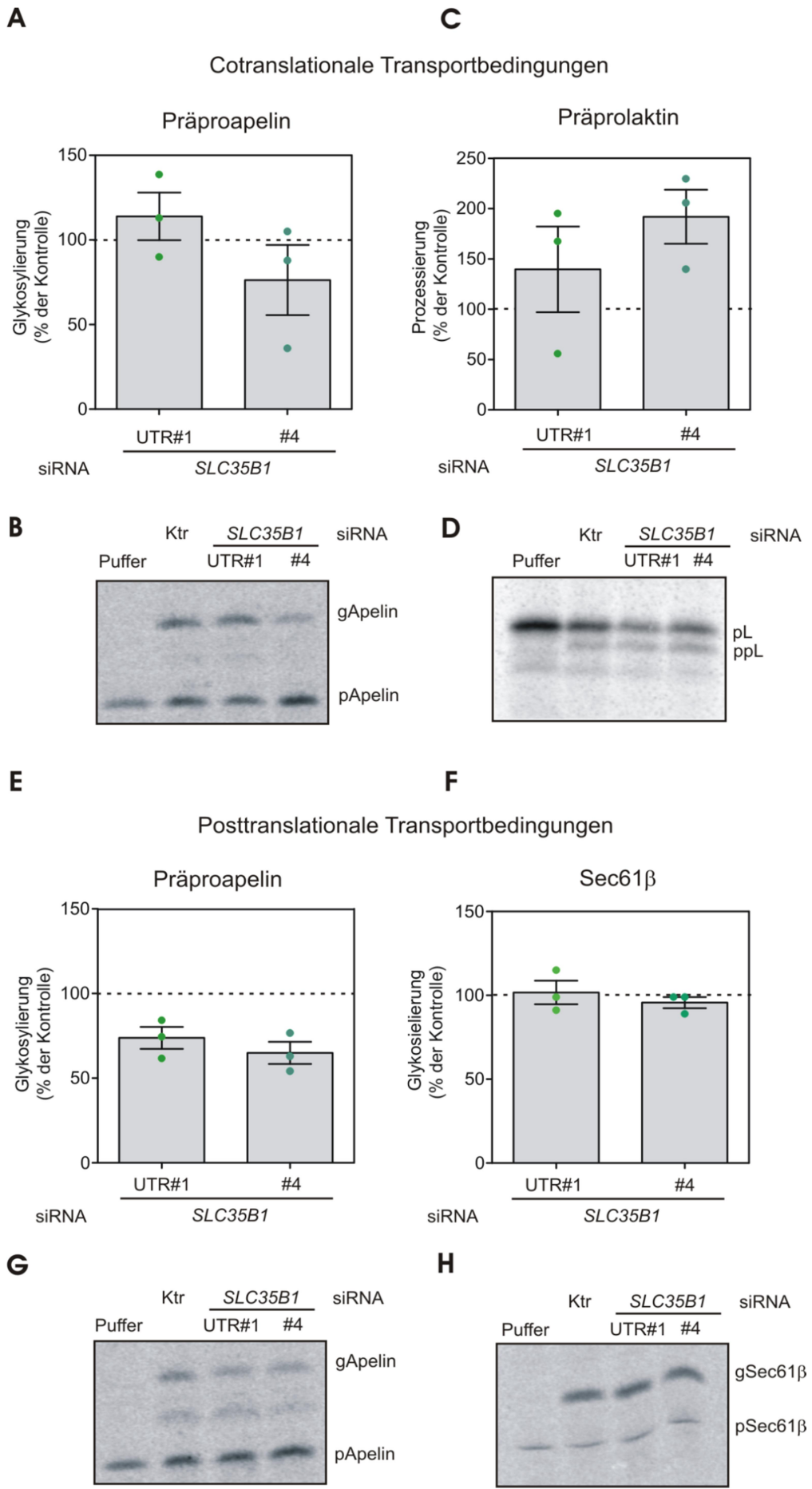


Abbildung 4.28: Effekt der SLC35B-Depletion auf den *in vitro* Proteintransport unter co- und post-Transportbedingungen in SP-Zellen. A-H Die ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und für 96 h inkubiert (3.2.1.4.1). Anschließend wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5), automatisiert gezählt (3.2.1.3) und unter Verwendung von Digitonin semipermeabilisiert (3.2.1.6). **A-D** Die *in vitro* Synthese und der Transport in das ER der SP-Zellen fand gleichzeitig für 60 min unter Verwendung von 6 % SP-Zellen (Präproapelin) oder 32 % SP-Zellen (Präprolaktin) statt, was co-Transportbedingungen entsprach (3.2.3.11.3). **E-H** Die *in vitro* Synthese der Substrate wurde nach 15 min (Präproapelin) bzw. 30 min (Sec61 β) durch Puromycin gestoppt. Anschließend wurden entweder 32 % (Präproapelin) oder 16 % (Sec61 β) SP-Zellen hinzugegeben und der Transport in das ER für 20 min (Präproapelin) bzw. 30 min (Sec61 β) erlaubt. Als Kontrolle diente jeweils KHM-Puffer. Anschließend wurden die Transportansätze vorher abzentrifugiert (Präproapelin, Sec61 β), oder direkt in Lämmli-Puffer aufgenommen (Präprolaktin), bei 56 °C erhitzt und einer SDS-PAGE unterzogen (3.2.3.1). Die Gele wurden anschließend fixiert, getrocknet und autoradiographisch analysiert (3.2.3.12). Die Balken in A, C, E, F entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. Die Punkte repräsentieren die Einzelwerte aus 3 biologischen Replikaten. Die gestrichelte Linie entspricht dem Referenzwert der Kontrollpopulation (Ktr siRNA). Um die Transporteffizienz (Glykosylierung oder Prozessierung) zu bestimmen wurde der prozentuale Anteil der transportierten Form an dem gesamten Protein (Vorläufer und transportierte Form) ermittelt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Typhoon Trio und ImageQuant (3.2.3.13.) B, D, G und H zeigen repräsentative Autoradiogramme des Phosphorimaging. (SEM = engl. "standard error of the mean"; p = Vorläuferpolypeptid, g = glykosyliertes Polypeptid) (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Einen deutlichen Transportdefekt wies Präproapelin unter post-Transportbedingungen auf. Hier war der Transport SLC35B1-depletierter Zellen um ein Viertel (#1-UTR) bzw. um ein Drittel (#4) reduziert, verglichen mit der Kontrollpopulation (Abbildung 4.28, E und G). Im Gegensatz dazu führte die Depletion von SLC35B1 erwartungsgemäß zu keiner Veränderung der Insertion des „tail-anchor“ Proteins Sec61 β (Abbildung 4.28, F und H).

Der *in vitro* Transport des BiP-abhängigen Substrats Präproapelin in SLC35B1-depletierten Zellen war unter post-Transportbedingungen beeinträchtigt, ähnlich dem BiP-Depletionsphänotyp (Schäuble et al., 2012, Haßdenteufel et al., 2018). Die Integrität der ER-Membranen aus SLC35B1-depletierten Zellen war unbeeinflusst, wie die Integration des „tail-anchor“-Proteins Sec61 β belegte.

4.2.4.2. Funktioneller Zusammenhang zwischen SLC35B1 und Sec61

Der heterotrimere Sec61-Komplex vermittelt nicht nur den ER-Transport von Proteinen, die den sekretorischen Weg einschlagen, sondern übt auch einen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase aus. Letzterer besteht darin, dass die porenbildende Untereinheit des Sec61-Komplexes, Sec61 α , einen passiven Ca²⁺-Ausstrom vom ER in das Cytosol ermöglicht (Lomax et al., 2002, Van Coppenolle et al., 2004, Flourakis et al., 2006, Ong et al., 2007, Lang et al., 2011a). Um dies unter physiologischen Umständen zu verhindern, sind bereits einige Kontrollmechanismen aufgeklärt, die dem Ca²⁺-Leckstrom entgegen des enormen Ca²⁺-Gradienten zwischen ER-Lumen und Cytosol entgegenwirken. Diese bestehen z.B. auf

cytosolischer Seite aus Ca^{2+} -CaM (Erdmann et al., 2011) und im Lumen des ER aus dem Hsp70-Chaperon BiP (Schauble et al., 2012) (Kapitel 2.3.4.1.1). Versagt ein Kontrollmechanismus, etwa weil unter ER-Stress-Bedingungen BiP zur vermehrten Faltung akkumulierender Proteine benötigt wird (Helenius et al., 1992, Ellgaard et al., 1999), erfolgt eine Zunahme des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms (Schauble et al., 2012). Die Frage, die sich seit der Entdeckung des Ca^{2+} -Leck-Phänomens durch Sec61 α stellt, ist die nach seiner physiologischen Bedeutung. Interessant ist die Verbindung von Ca^{2+} - und ATP-Homöostase auf Ebene des ER (Vishnu et al., 2014), die im Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf die Beteiligung des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms untersucht wird. Unter diesen Umständen könnte der Sec61-Komplex die Schaltstelle und Ca^{2+} das Signal für den ATP-Import, vermittelt durch SLC35B1, in das ER-Lumen darstellen.

4.2.4.2.1. Charakterisierung des Ca^{2+} -Status SLC35B1-depletierter Zellen

Effekte der SLC35B1-Depletion auf die Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER und den zellulären Ca^{2+} -Gehalt

Um sich der einleitenden Hypothese experimentell zu nähern wurde SLC35B1 siRNA-vermittelt depletiert und der cytosolische Ca^{2+} -Status dieser Zellen überprüft. Hierfür wurden die Zellen mit dem Ca^{2+} -Indikator Fura-2 beladen und die Veränderungen des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes nach Applikation von Tg zur Inhibition der SERCA bzw. des Ionophors Iono in Echtzeit mittels „Live Cell Calcium Imaging“ verfolgt (3.2.2.3.2.). Abbildung 4.29 zeigt die Veränderungen der Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER und den intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt, der sich 96 h nach Transfektion der HeLa-Zellen mit *SLC35B1*-UTR#1 bzw. *SLC35B1*#4 siRNA ergab. Die mit der *SLC35B1*-UTR#1 siRNA behandelten Zellen wiesen einen um 33 % erniedrigten ER-Pool an Ca^{2+} nach Applikation von Tg auf, sowie eine um 36 % verringerte Gesamtkonzentration an Ca^{2+} , jeweils verglichen mit der Kontrollpopulation (Abbildung 4.29, B und D). Zellen, die für 96 h mit *SLC35B1* siRNA #4 behandelt wurden, wiesen eine sehr ähnliche Antwort auf die beiden Effektoren Tg und Iono auf. Die Zellen wiesen sowohl nach Tg-Applikation (35 %), als auch nach Applikation von Ionomycin (26 %), einen signifikant geringeren Ca^{2+} -Gehalt auf, jeweils bezogen auf die Kontrollzellen (Abbildung 4.29, F und H).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse zum einen, dass eine Depletion von SLC35B1 zu einer verringerten Tg-Antwort führt, was vermuten lässt, dass diese Zellen konstitutiv Ca^{2+} aus dem ER verlieren. Zum anderen wurde gleichzeitig ein reduzierter Ca^{2+} -Gehalt in diesen Zellen detektiert, was die erste Aussage untermauert.

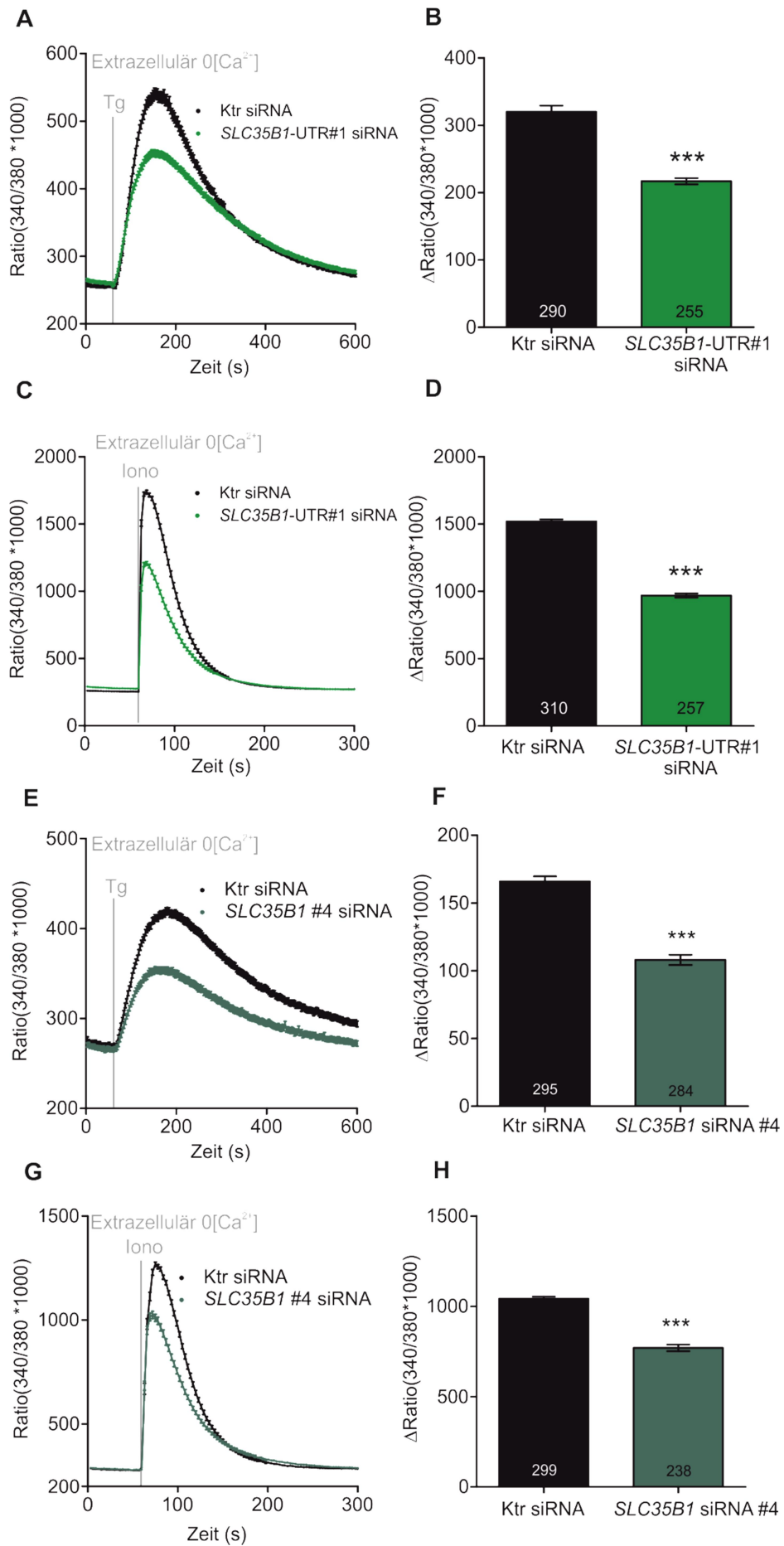


Abbildung 4.29: Effekt der siRNA-vermittelten SLC35B1-Depletion auf die Ca²⁺-Mobilisierung und den zellulären Ca²⁺-Gehalt in HeLa-Zellen. Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden für 96 h entweder mit *SLC35B1*-UTR#1 (10 nM, **A-D**) oder *SLC35B1*#4 siRNA (20 nM, **E-H**) behandelt (3.2.1.4.1). Dann wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM (4 µM) beladen und anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in Ca²⁺-freier Lösung (ES + EGTA) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Die Effektoren wurden nach 1 min „online“ appliziert und die Fura-2-Fluoreszenz für 9 min (Tg, EK 1 µM, (**A,E**)) bzw. für 4 min (Iono, EK 5 µM, (**C,G**)) in Echtzeit verfolgt. **B, D, F, H** Statistische Auswertung der in A, C, E und G aufgezeichneten cytosolischen Ca²⁺-Veränderungen durch den Ca²⁺-Indikator Fura-2. Die Balkendiagramme entsprechen den Differenzen aus basaler und maximaler Ca²⁺-Konzentration ± SEM nach Applikation des jeweiligen Effektors. Am Fuße der Balken ist die Anzahl der für die Berechnung herangezogenen Einzelzellen angegeben. Für die verschiedenen Populationen gab es folgende Anzahl biologischer Replikate: Tg + Iono (10 nM UTR#1 siRNA) n = 3; Tg + Iono (20 nM #4 siRNA) n = 2. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei galt * = p-Werte > 0 und *** = p-Werte ≤ 0,001. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation (Ktr siRNA). (Tg = Thapsigargin; Iono = Ionomycin; EK = Endkonzentration; SEM = engl. "standard error of the mean", ES = engl. „External solution“)

Effekte der SLC35B1-Depletion auf den SOCE

Im vorherigen Abschnitt wurde beobachtet, dass HeLa-Zellen, die siRNA-vermittelt eine endogene Depletion von SLC35B1 aufwiesen, intrazellulär weniger Ca²⁺ besaßen, was mit einer geringeren Ca²⁺-Konzentration im ER einherging (Abbildung 4.29). Da eine Erniedrigung der ER-luminalen Ca²⁺-Konzentration den SOCE aktiviert (siehe Kapitel 2.3.2), sollte untersucht werden, ob ein solcher Verlust von Ca²⁺ im ER eine Prä-Aktivierung des SOCE in SLC35B1-depletierten Zellen nach sich zieht. Hierfür wurden die HeLa-Zellen für 96 h entweder mit Ktr siRNA oder jeweils mit einer der beiden SLC35B1 siRNAs behandelt. Das mehrstufige Messprotokoll wurde in einer physiologischen Ca²⁺-Konzentration von 1 mM gestartet und nach 5 min wurde 1,5 mM EGTA hinzugegeben, um ein einheitlich niedriges Ca²⁺-Niveau zu erreichen. Anschließend wurden Ca²⁺-haltige ES appliziert (EK 6,5 mM), um eine mögliche Prä-Aktivierung des SOCE direkt messen zu können (Abbildung 4.30). Gebildet wurde für die Ermittlung des basalen cytosolischen Ca²⁺-Gehalt der Mittelwert aller Zellen von Beginn der Messung bis zwei Zeiteinheiten vor der Applikation von EGTA (Markierung 1 in Abbildung 4.30, A und D). Für die Bestimmung des prä aktivierten SOCE wurde die Differenz des Fura-2-Signals vor und nach Applikation der hohen Ca²⁺-Konzentration gebildet (Markierung 2 in Abbildung 4.30, A und D). Für die SLC35B1-depletierten Zellen ergaben sich leicht erhöhte cytosolische Ca²⁺-Konzentration verglichen mit den Kontrollzellen (Abbildung 4.30, B und E), wobei ein erhöhter Ca²⁺-Einstrom ins Cytosol nach Applikation von 6,5 mM Ca²⁺ nur bei der Verwendung der *SLC35B1* #4 siRNA für prä aktivierte SOCE-Mechanismen sprach (Abbildung 4.30, F).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine Depletion von SLC35B1 eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und eine Prä-Aktivierung des SOCE (SLC35B1 #4 siRNA) nach sich zieht, was gleichzeitig mit dem Ca^{2+} -Verlust aus dem ER (Abbildung 4.29) korreliert.

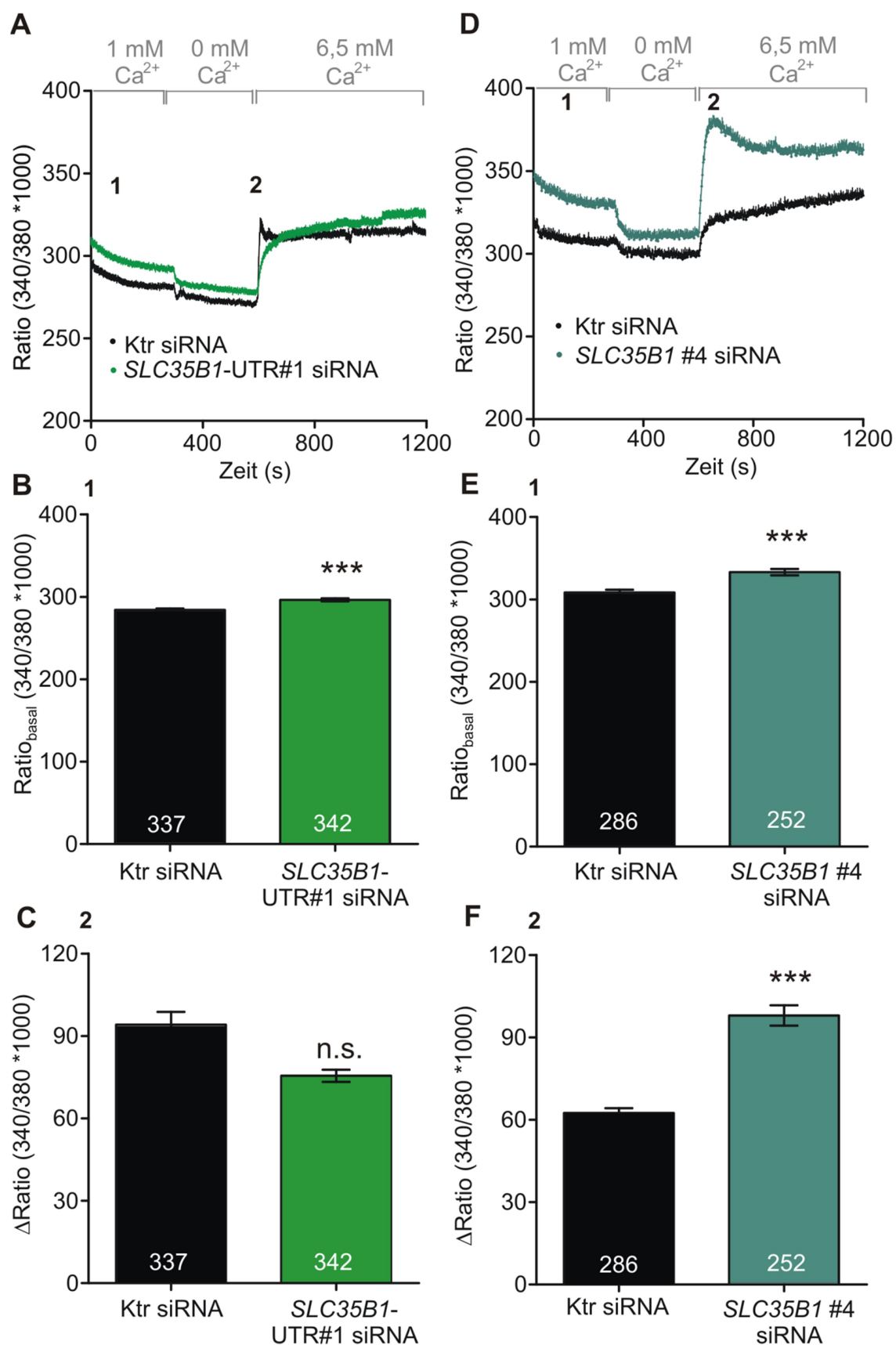


Abbildung 4.30: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den SOCE in HeLa-Zellen. Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs (*SLC35B1*-UTR#1 10 nM, *SLC35B1* #4 siRNA 20 nM) behandelt und für 96 h inkubiert (3.2.1.4.1). Dann wurden die Zellen mit dem ratiometrischen Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM (4 μM) beladen und anschließend zum „Live Cell

Calcium Imaging“ in ES + CaCl₂ (EK 1 mM) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Nach 5 min wurden durch die Zugabe von ES + EGTA (EK 0,5 mM) alle Ca²⁺-Ionen chelatiert und eine Ca²⁺-freie Messlösung generiert. Nach weiteren 5 min wurde ES + CaCl₂ appliziert (EK 6,5 mM). **A, D** Kinetische Aufnahmen der cytosolischen Ca²⁺-Level. Gezeigt sind die Mittelwerte aller Zellen ± SEM. Statistisch ausgewertet wurden sowohl die basale Ca²⁺-Konzentration (1) als auch die Veränderung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration vor und nach Applikation von Ca²⁺ (2), was in **B, E** und **C, F** dargestellt ist. Die Fehlerbalken entsprechen dem SEM. Am Fuße der Balken ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Einzelzellen für die jeweilige Behandlung angegeben. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei galt: *** = p-Werte ≤ 0,001, n.s. = p-Werte ≥ 0,05. Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation. Der Versuch wurde in 4 (UTR#1 siRNA) bzw. 2 biologischen Replikaten (#4 siRNA) durchgeführt. (EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean", ES = engl. „External solution“, n.s. = nicht signifikant)

Effekt der pharmakologischen Sec61 α -Inhibition auf den verringerten Ca²⁺-Gehalt in SLC35B1-depletierten Zellen

Im Rahmen der experimentellen Untersuchung der Funktionen von SLC35B1 und seinen regulatorischen Netzwerken konnten bislang folgende Beobachtungen gemacht werden: zum einen besaßen SLC35B1-depletierte HeLa-Zellen weniger ATP im ER (Kapitel 4.2.3.2), was für die Beteiligung des Proteins an der Energiehomöostase spricht. Zum anderen führte die endogene Depletion von SLC35B1 in HeLa-Zellen aber auch zu einer geringeren Ca²⁺-Konzentration, sowohl intrazellulär als auch spezifisch im ER (Abbildung 4.29). Im Eingang dieses Kapitels wurde die Hypothese aufgestellt, dass die beiden Fäden Energie- und Ca²⁺-Homöostase im Funktionsapparat des Sec61-Komplexes zusammenlaufen könnten. Im präzisen Fall könnte der Ca²⁺-Verlust, der durch Sec61 vermittelt wird, ein Signal darstellen. Am Anfang dieser Kaskade könnte eine durch die gestörte ATP-Homöostase beeinträchtigte BiP-Funktion stehen, sodass der Sec61-Kanal schlechter gegen den Verlust an Ca²⁺ geschützt werden kann, wofür Transportversuche mit einem BiP-abhängigen Substrat nach SLC35B1-Depletion sprechen (Abbildung 4.28).

Um sich experimentell dieser Hypothese direkt zu nähern, wurden abermals „Live Cell Calcium Imaging“-Versuche mit Zellen durchgeführt, die eine 96-stündige siRNA-vermittelte Depletion von SLC35B1 aufwiesen. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit Emetin (EM) vorbehandelt. EM inhibiert die Proteinbiosynthese und führt zu einer Arretierung des naszierenden Polypeptids (Pestka, 1971). Dadurch kommt es zu einer verringerten Durchlässigkeit von Sec61 α für Ca²⁺ (Ong et al., 2007, Amer et al., 2009). Der potentielle Ca²⁺-Verlust aus dem ER durch Sec61 α in SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen könnte durch eine Prä-Inkubation mit EM verhindert werden.

Hierfür wurden die Zellen 2 h vor Beginn des „Live Cell Calcium Imagings“ mit EM (EK 10 μ M) oder DMSO (0,0001 %) behandelt. Als Effektoren wurden Tg zur Inhibition der SERCA

und somit Freisetzung des ER- Ca^{2+} -Pools und Iono als Kontrolle für den zellulären Ca^{2+} -Gehalt appliziert. Die Messungen sind dargestellt als kinetischer Mittelwert aller Zellen und als Differenz der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen vor und nach Applikation des jeweiligen Effektors. Die Wirkung von EM auf den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER konnte dadurch verifiziert werden, dass nach der EM-Behandlung und Tg-Applikation ein signifikant verringerter Ca^{2+} -Ausstrom im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vorlag (Abbildung 4.31, B und F). Der in Abbildung 4.29 beobachtete Effekt des geringeren ER (Tg)-, sowie Gesamtzell- Ca^{2+} -Gehaltes (Iono) SLC35B1-depletierter Zellen konnte in den mit DMSO behandelten Zellpopulationen verifiziert werden (Abbildung 4.31, B, D, F, H). Interessant war nun der Einfluss des Sec61-Inhibitors EM auf diese Effekte der SLC35B1-depletierter Zellen, da sie Aufschluss über eine mögliche Verbindung mit dem Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom liefern können. Dabei zeigte sich, dass die EM-Behandlung SLC35B1-depletierter Zellen keinen Einfluss auf den Tg-evozierten Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER besaß (Abbildung 4.31, B und F), wohingegen die intrazelluläre Gesamtmenge an Ca^{2+} wieder deutlich anstieg (Abbildung 4.31, D und H).

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sprechen dafür, dass die geringere Ca^{2+} -Konzentration der SLC35B1-depletierter Zellen einen Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstrom als Ursache besitzt. Dafür spricht die auf den intrazellulären Ca^{2+} -Verlust komplementierend wirkende EM-Gabe bei gleichzeitig unbeeinflusstem Tg-vermittelten ER- Ca^{2+} -Leckstrom.

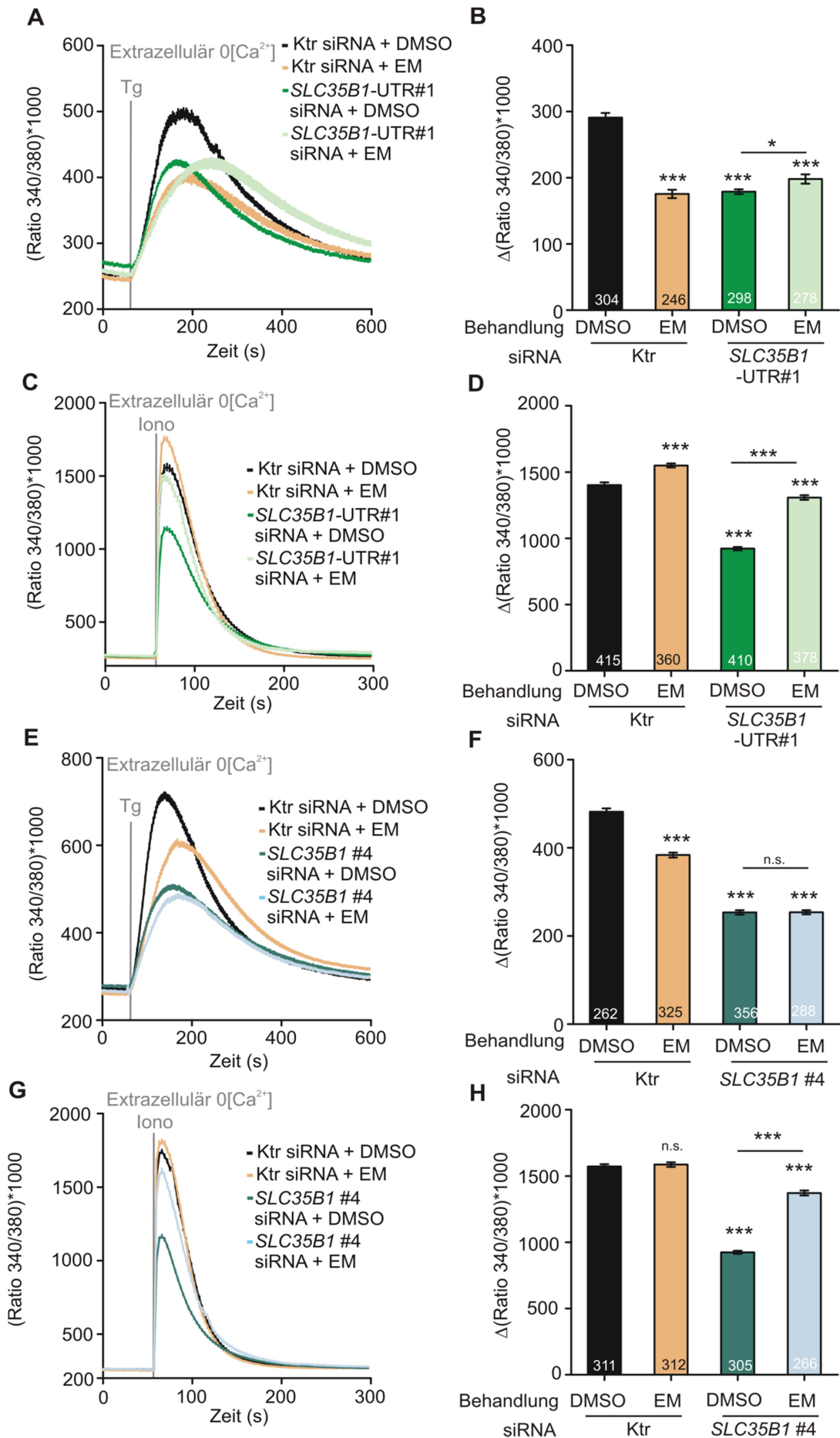


Abbildung 4.31: Einfluss der EM-vermittelten Sec61-Inhibition auf den erhöhten Ca^{2+} -Verlust nach SLC35B1-Depletion in HeLa-Zellen. A-H Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs (*SLC35B1*-UTR#1 10 nM, *SLC35B1* #4 siRNA 20 nM) behandelt und für 96 h inkubiert (3.2.1.4.1). Dann wurden die Zellen für 2 h mit EM (EK 10 μM) oder 0,0001 % DMSO inkubiert. Nach 1,5 h wurde zusätzlich der ratiometrische Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM (EK 4 μM) hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert, bevor die Zellen zum „Live Cell Calcium Imaging“ in Ca^{2+} -freier Lösung (ES + EGTA) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt wurden (3.2.2.3.2). Die Effektoren wurden nach 1 min „online“ appliziert und die Fura-2-Fluoreszenz für 9 min (Tg, EK 1 μM , (A, E)) bzw. für 4 min (Iono, EK 5 μM , (C, G)) in Echtzeit verfolgt. Gezeigt sind die Mittelwerte aller Zellen \pm SEM. B, D, F, H Statistische Auswertung der in A, C, E und G aufgezeichneten cytosolischen Ca^{2+} -Veränderungen durch den Ca^{2+} Indikator Fura-2. Die Balkendiagramme entsprechen den Differenzen aus basaler und maximaler Ca^{2+} Konzentration nach Applikation des jeweiligen Effektors \pm SEM. Am Fuße der Balken ist die Anzahl der zur Berechnung herangezogenen Einzelzellen angegeben. Die Versuche wurden in mindestens 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei galt: $p \leq 0,001 = ***$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,05 = *$ und $p > 0,05 = \text{n.s.}$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation (Ktr siRNA + DMSO) oder wie gekennzeichnet. (EM = Emetin; Tg = Thapsigargin; Iono = Ionomycin; EK = Endkonzentration; SEM = engl. "standard error of the mean") (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Als nächstes wurde untersucht, ob die Inhibition von Sec61 α durch EM den durch SLC35B1-Depletion verursachten leicht erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Gehalt (Abbildung 4.30) kompensieren kann. Dazu wurden jene Versuche unter dem Einfluss der 2-stündigen Vorinkubation von EM oder DMSO (Kontrolle) wiederholt. Der Effekt des erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes nach Depletion von SLC35B1 konnte mit beiden siRNAs (*SLC35B1*-UTR#1 und #4) reproduziert werden (Abbildung 4.32, B und E, DMSO). In beiden SLC35B1-Depletionspopulationen führte die Inkubation der Zellen mit EM dazu, dass sich der erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Gehalt wieder an den von Kontrollzellen angleichen konnte. Der SOCE war in dieser Versuchsreihe durch die Depletion von SLC35B1 nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Dennoch konnte der zu beobachtende leichte Anstieg nach Applikation von 6,5 mM Ca^{2+} in den SLC35B1-depletierten Zellpopulationen mit EM abgeschwächt werden (Abbildung 4.32, C und F).

Auch diese Versuchsreihe sprach dafür, dass die Depletion von SLC35B1 zu einem Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Ausstrom führte. Der leicht erhöhte basale cytosolische Ca^{2+} -Gehalt nach SLC35B1-Depletion ließ sich durch die Applikation von Emetin auf mit Kontrollzellen vergleichbare cytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen komplementieren.

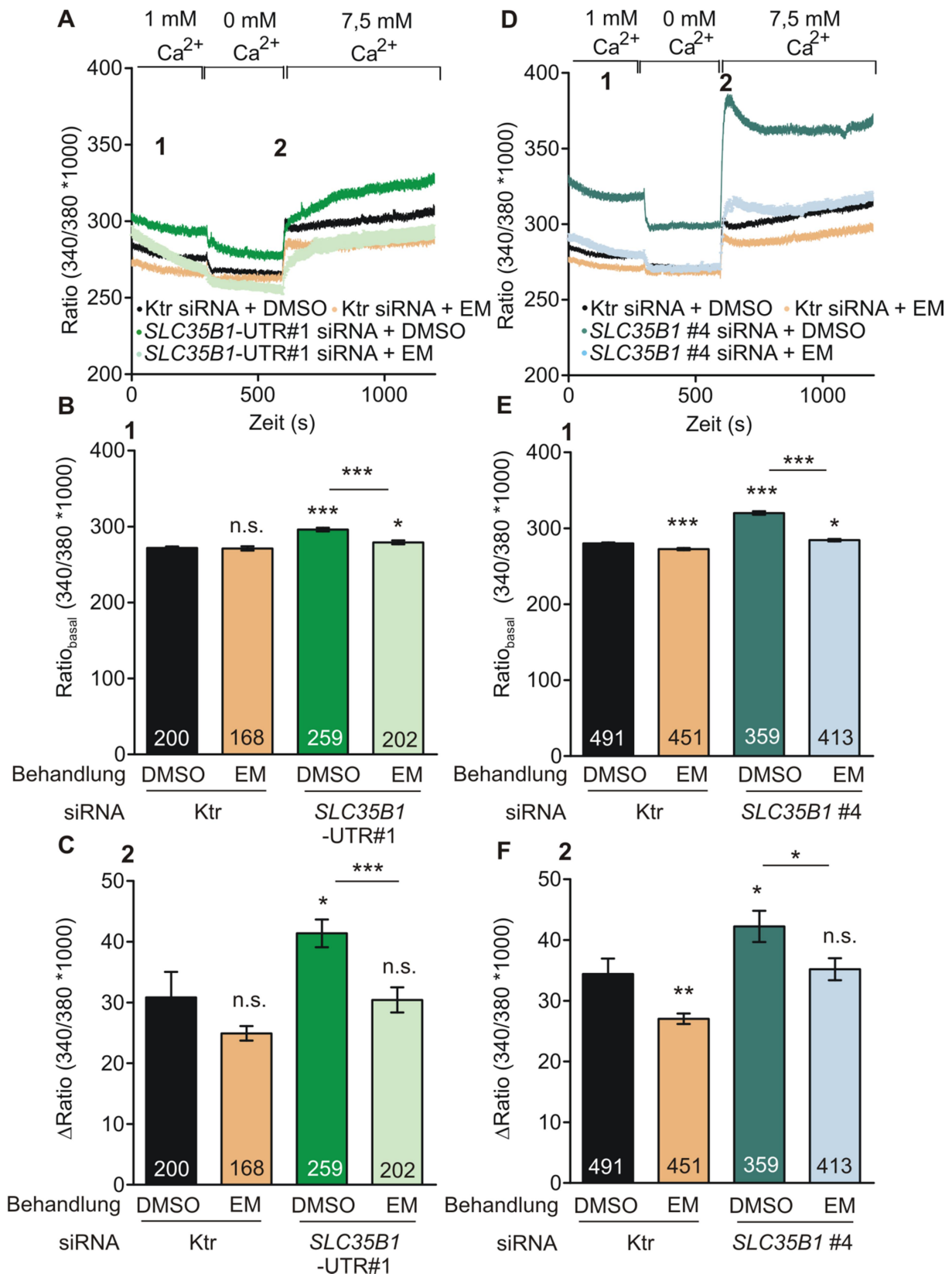


Abbildung 4.32: Einfluss der EM-vermittelten Sec61-Inhibition auf die Mechanismen des SOCE nach SLC35B1-Depletion in HeLa-Zellen. A-F Die auf Deckgläsern ausgesäten HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs (*SLC35B1*-UTR#1 10 nM, *SLC35B1* #4 siRNA 20 nM) behandelt und für 96 h inkubiert (3.2.1.4.1). Dann wurde das Deckglas entnommen und die Zellen für 2 h mit EM (EK 10 μ M) oder 0,0001 % DMSO inkubiert. Nach 1,5 h wurde zusätzlich der ratiometrische Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM (EK 4 μ M) hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend zum „Live Cell Calcium Imaging“ in ES + CaCl₂ (EK 1 mM) in den Strahlengang des iMIC-Mikroskops eingesetzt (3.2.2.3.2). Nach 5 min wurden durch die Zugabe von ES + EGTA (EK 0,5 mM) alle Ca²⁺-Ionen chelatiert und eine Ca²⁺-freie Messlösung generiert. Nach weiteren 5 min wurde ES + CaCl₂ appliziert (EK 6,5 mM). **A, D** Kinetische Aufnahmen der cytosolischen Ca²⁺-Level. Gezeigt sind die Mittelwerte aller Zellen ± SEM. Statistisch ausgewertet wurden sowohl die basale Ca²⁺-Konzentration (**1**), als auch die Veränderung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration vor und nach Applikation von Ca²⁺ (**2**), was in **B, E** und **C, F** dargestellt ist. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler SEM. Am Fuße der Balken ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Einzelzellen für die jeweilige Behandlung angegeben. Zur statistischen Analyse signifikanter Unterschiede der betrachteten Populationen wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, wobei galt: $p \leq 0,001 = ***$; $p \leq 0,01 = **$; $p \leq 0,05 = *$ und $p > 0,05 = \text{n.s.}$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrollpopulation (Ktr siRNA + DMSO) oder wie gekennzeichnet. Der Versuch wurde in 2 (UTR#1 siRNA) bzw. 4 Replikaten (#4 siRNA) durchgeführt. (EM = Emetin, EK = Endkonzentration, SEM = engl. "standard error of the mean")

Zusammenfassend zu Kapitel 4.2.4.2, in dem „Live Cell Calcium Imaging“-Versuche zur Aufklärung des funktionellen Zusammenhangs zwischen SLC35B1 und Sec61 durchgeführt wurden, ergaben sich folgende Ergebnisse (Veränderung SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation):

1. der Tg-sensitive Ca²⁺-Pool des ER zeigte eine deutliche Verringerung (Abbildung 4.29)
2. die Gesamtkonzentration an intrazellulärem Ca²⁺, das durch Ionomycin freigesetzt wurde, war ebenfalls signifikant erniedrigt (Abbildung 4.29)
3. der basale cytolische Ca²⁺-Gehalt war erhöht (Abbildung 4.30)
4. der SOCE war partiell prä-aktiviert (Abbildung 4.30)
5. der Sec61-Inhibitor EM führt zur Komplementation des Effektes auf die intrazelluläre Gesamtkonzentration an Ca²⁺ (2.), den erhöhten basalen cytosolischen Ca²⁺-Gehalt (3.), jedoch nicht auf den Ca²⁺-Pool im ER (1.) (Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32).

Diese Ergebnisse sprechen für einen funktionellen Zusammenhang zwischen SLC35B1 und dem Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER. Dieser Zusammenhang kann auf Basis der Ergebnisse aus Abbildung 4.28 in der ATP-Abhängigkeit von BiP liegen, das als wichtiger Regulator von Sec61 für die Beschränkung des Ca²⁺-Leckstroms bekannt ist.

4.2.4.3. Funktioneller Zusammenhang zwischen cytosolischem ATP-“signaling” und SLC35B1

Nachdem in Kapitel 4.2.4.2 Ca²⁺ als mögliches Signalmolekül eines Energiemangels, ausgelöst durch die siRNA-vermittelte SLC35B1-Depletion, untersucht wurde, stellte sich nun die Frage wie das Ca²⁺ im Cytosol dazu genutzt werden kann die Energiehomöostase wiederherzustellen. Ein dominanter Regulator in der zellulären Energiehomöostase ist AMPK, die AMP-aktivierte Proteinkinase. Sie wird von AMP, ADP und ATP reguliert und reagiert somit auf Energiemangel (Bindung von AMP oder ADP) bzw. Energieüberschuss

(Bindung von ATP) (Hardie et al., 2012) (siehe auch Kapitel 2.4.3). Die Aktivierung der AMPK erfolgt mit Hilfe von Kinasen, die entweder konstitutiv aktiv sind (LKB1), kann aber auch durch Ca^{2+} (CaMKK2) erfolgen (Hardie et al., 2012). Im Zusammenhang mit der Fragestellung nach dem regulatorischen Netzwerk des SLC35B1-vermittelten ATP-Transport, wurde nun getestet, ob die SLC35B1-Depletion Auswirkungen auf die Aktivierung der AMPK besitzt.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Proteinlevel von AMPK und der aktivierten pAMPK (phosphor-AMPK) mit spezifischen Antikörpern nach SLC35B1-Depletion im Vergleich zur Kontrolle (Ktr siRNA) überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Es ergab sich für SLC35B1-depletierte Zellen eine 1,8 - 2,3-fach erhöhte Proteinmenge für pAMPK (Abbildung 4.33, A). Für die unphosphorylierte Variante der AMPK war das Ergebnis mit einer 1,6-fachen Erhöhung weniger klar im Falle der Depletion mit der UTR#1 siRNA und einer leichten Erniedrigung (~85 %), wenn die #4 siRNA zur Depletion benutzt wurde (Abbildung 4.33, B). Ein repräsentativer Western Blot nach immunologischer Detektion mit den spezifischen Antikörpern ist in Abbildung 4.33, C gezeigt. Mitgeführt wurde eine HeLa-Zellpopulation, die 15 h mit dem AMP-Analogen AICAR (engl. "5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide") zur Induktion der Phosphorylierung der AMPK behandelt worden war.

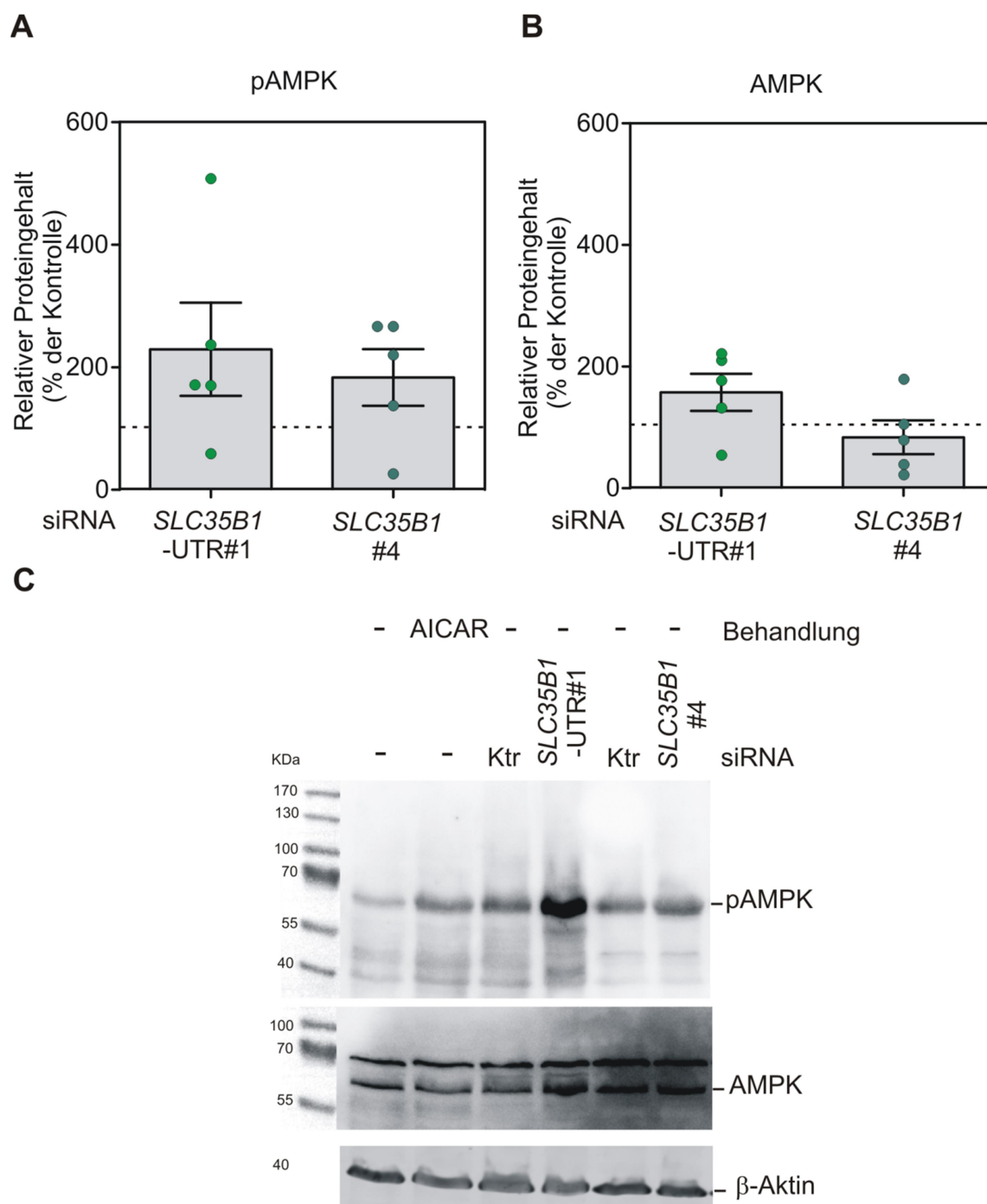


Abbildung 4.33: Effekt der SLC35B1-Depletion auf den Proteingehalt der AMPK in HeLa-Zellen. A-C Die Zellen wurden ausgesät, und für 96 h mit der angegebenen siRNA behandelt (3.2.1.4.1). Anschließend wurden die Zellen geerntet (3.2.1.5), zu Lysaten aufgearbeitet (3.2.1.7) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), Western Blot (3.2.3.5) und immunologischer Detektion (3.2.3.6) auf ihren jeweiligen Proteingehalt hin überprüft. Das Protein β -Aktin wurde als Gelladeg Kontrolle mitgeführt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Fusion SL und ImageQuant (3.2.3.13). **A, B** Die relativen Werte beziehen sich auf die Ktr siRNA (gestrichelte Linie). Die Balken entsprechen den Mittelwerten \pm SEM der jeweiligen Population und die Punkte den Einzelwerten aus jeweils 5-6 Replikaten. **C** Repräsentative Western Blots von $0,3 \times 10^6$ Zelläquivalenten der zu analysierenden Zellpopulationen. Zur Kontrolle der pAMPK-Induktion wurden die Zellen für 15 h mit 0,5 mM AICAR behandelt. (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Abschließen lässt sich das Kapitel 4.2.4 mit der Feststellung, dass es klare Hinweise dafür gibt, dass das regulatorische Netzwerk um den ATP-Transport, der durch SLC35B1 vermittelt wird, den Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstrom involviert. Letzterer wurde nach Depletion von SLC35B1 verstärkt, was mit Hilfe der “Live Cell Calcium Imaging”-Experimente mit Fura-2 aufgedeckt wurde (Abbildung 4.29). Der Grund hierfür könnte eine verringerte BiP-Funktion sein, verursacht durch den ATP-Mangel im ER, der sich nach SLC35B1-Depletion ergab. Dass die BiP-Funktion tatsächlich gestört zu sein scheint, zeigen *in vitro* Transportversuche des BiP-abhängigen Substrats Präproapelin (Abbildung 4.28). Zurück im regulatorischen Netzwerk bedeutet eine verringerte BiP-Funktion eine weniger effiziente Regulation des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms. Dass der Rückgang des Ca^{2+} in SLC35B1-depletierten Zellen auf eine erhöhte Ca^{2+} -Durchlässigkeit des Sec61-Komplexes rückzuführen ist, legen Versuche mit dem Sec61-Inhibitor EM nahe, der diese Effekte aufheben konnte (Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32). Ein erhöhter Ca^{2+} -Leak des ER führt zu einer erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 4.30 und Abbildung 4.32), die wiederum eine (eventuell CaMKK2-abhängige) Phosphorylierung der AMPK nach sich ziehen könnte. Auch für letzteres gibt es durch vermehrtes Vorkommen von pAMPK in SLC35B1-depletierten Zellen Hinweise (Abbildung 4.33), sodass diese Arbeit einen Vorschlag der Regulation der Energiehomöostase des ER beschreibt.

5. Diskussion

Die experimentellen Ergebnisse aus Kapitel 4 sollen nun in diesem abschließenden Kapitel diskutiert und in den aktuellen wissenschaftlichen Zusammenhang eingeordnet werden. Da in dieser Arbeit zwei Fragestellungen verfolgt wurden, bleibt diese Struktur auch in diesem Kapitel erhalten. Die Ergebnisse aus der ersten Fragestellung sind in Kapitel 4.1 diskutiert. Hierbei ging es um die Untersuchung der Porenringmutation der α -Untereinheit von Sec61 (Sec61 α (V85D)), die bei Patienten mit Plasmazelldefizienz (PAD) aufgetreten war. Die zellbiologischen und biochemischen Untersuchungen am HeLa-Zellmodell ergaben eine veränderte Ca²⁺-Homöostase, erhöhte UPR, sowie verändertes Transportverhalten von Vorläuferproteinen und werden vor dem Hintergrund des möglichen Mechanismus der Pathogenese diskutiert.

In der zweiten Fragestellung ging es darum ein Modell für die physiologische Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstroms zu entwickeln. Die Identifikation von SLC35B1 als ATP-Austauscher der ER-Membran ist das Herzstück dieser Arbeit und lieferte eine Möglichkeit über siRNA-vermittelte SLC35B1-Depletion die Ca²⁺- und Energiehomöostase miteinander in Verbindung stehend zu untersuchen. Es ergab sich ein Modell für einen Regulationsmechanismus der ER-Energiehomöostase, der als beteiligte Faktoren BiP und den Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstrom vorschlägt. Die Diskussion der Ergebnisse dieser Fragestellung erfolgt in Kapitel 5.2.

5.1. Einfluss der Sec61 α -Integrität auf die Ca²⁺-Homöostase am Beispiel der PAD-assoziierten Sec61 α -Mutation V85D

Zur Bearbeitung der ersten Zielsetzung dieser Arbeit wurden siRNA-vermittelte Genstillegungen von *SEC61A1* im HeLa-Zellmodell analog zu (Lang et al., 2012) durchgeführt. Der entstandene Phänotyp wurde anschließend durch Expression entweder des Sec61 α -Wt oder der Sec61 α (V85D)-Mutante komplementiert, um die volle phänotypische Ausprägung der Porenringmutation in Hinblick auf die Zellphysiologie zu untersuchen (Kapitel 4.1.1). Alternativ wurde vor endogenem Hintergrund die Sec61 α (V85D)-Mutante gemeinsam mit plasmidkodierten Varianten der verbleibenden Sec61-Untereinheiten, Sec61 β und Sec61 γ , exprimiert, was zu keinem vollen Sec61 α (V85D)-Phänotyp führte, sondern zur Phänokopie des heterozygoten Patientenbildes genutzt wurde (Kapitel 4.1.2).

5.1.1. Interpretation der Sec61 α (V85D)-Komplementation einer siRNA-vermittelten endogenen Sec61 α -Depletion

5.1.1.1. Die ER-Morphologie ist in HeLa-Zellen mit Sec61 α (V85D)-Komplementation unbeeinflusst

Zur Analyse der ER-Morphologie wurden HeLa-Zellen, die siRNA-vermittelt eine endogene Depletion von Sec61 α aufwiesen, mit Sec61 α (V85D) bzw. Sec61 α -Wt komplementiert und anhand der Sec62-gekoppelten Alexa594-Signale in einer hochauflösenden 3D-SIM-Mikroskopie miteinander verglichen. Die erhaltenen Sec62-Signale, stellvertretend für die ER-Morphologie, zeigten netzartige ER-Strukturen, mit einer abnehmenden Dichte vom kernnahen ER in die Peripherie (Abbildung 4.1), wobei die Komplementationseffizienz der α -Untereinheiten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Wt und V85D aufwiesen (Abbildung 4.1, B). Hier soll darauf hingewiesen werden, dass die Signale des Sec61 α -Wt und Sec61 α (V85D) bei der immunologischen Detektion im Western Blot nicht voneinander zu unterscheiden sind. Ferner waren in den 3D-SIM-Mikroskopieaufnahmen auch keine Unterschiede im Vergleich zur Sec61 α -Depletion feststellbar. Letzteres bestätigt frühere Studien zur Analyse der siRNA-vermittelten Sec61 α -Depletion, die in einem Zeitraum von 96 h zu ca. 20 % Restproteingehalt führte und keine morphologischen Unterschiede zu Kontroll-HeLa-Zellen aufwies (Lang et al., 2012). Unter den gleichen Bedingungen detektierten EM-Aufnahmen der *SEC61A1*-siRNA-behandelten HeLa-Zellen, dass die ER-gebundenen Ribosomen um 60 % von 17/ μ m auf 7/ μ m in Folge der Sec61 α -Depletion abnahmen (Lang et al., 2012).

Gefolgert werden kann aus den Ergebnissen, dass es keine offensichtlichen mit 3D-SIM-Mikroskopie detektierbaren Hinweise darauf gibt, dass Sec61 α (V85D) einen negativen Einfluss auf die ER-Morphologie besitzt, was denkbar wäre, wenn die mutierte Sec61 α -Variante Interaktionen mit Komplex-/Interaktionspartnern beeinflussen würde. Eine interessante Verbindung vom ER zu den Mikrotubuli besteht z. B. über Sec61 β , das direkt mit den Mikrotubuli interagiert (Zhu et al., 2018). Ein weiteres Beispiel wäre die Interaktion mit Sec62, das eine Rolle in der „ER-phagy“ spielt, bei der es für die Beseitigung exzessiver Membranen verantwortlich ist, um eine normale ER-Funktion und Struktur sicherzustellen (Fumagalli et al., 2016, Grumati et al., 2017). Als Limitierung dieses Versuchs zur ER-Morphologie ist sicherlich die begrenzte Auflösung der 3D-SIM-Mikroskopie zu nennen. Zwar liefert sie eine 2-fach verbesserte Auflösung als die Lichtmikroskopie mit ihrer Auflösungsgrenze bei ca. 200 nm, bleibt dennoch in zeitlicher und räumlicher Auflösung

begrenzt. Neue Studien fanden unter Verwendung verschiedener SR (engl. „super-resolution“-)Mikroskopietechniken sogar eine Strukturorganisation des ER, die als „ER-Matrices“ bezeichnet wird und die Rolle der peripheren, als ER-„Sheets“ bekannten ER-Strukturen, neu definiert, was besonders für die Kontaktflächen zu anderen Organellen während dynamischen ER-Umstrukturierungsprozessen eine Rolle spielt (Nixon-Abell et al., 2016). Weiterhin fehlt der direkte Vergleich zu Zellen, die im Rahmen dieses Versuchsaufbaus eine desintegrierte ER-Struktur aufweisen, was z.B. bei der Induktion der UPR der Fall ist. Zeitlich ist der Moment der strukturellen Reorganisation schwer abzubilden, da prolongierte UPR am Ende der PERK- und IRE1 α -Arme zur Induktion der Apoptose führt (Shore et al., 2011, Urra et al., 2013, Hetz und Papa, 2018). Versuche, unter anderem mit *Brucella melitensis* infizierten Makrophagen beweisen eine solche strukturelle ER-Reorganisation (Smith et al., 2013). In Hefen wurde eine mit ER-Stress assoziierte Ausweitung des ER in Abhängigkeit der Lipid-Synthese und des UPR-„signalings“ beobachtet (Schuck et al., 2009). Es ist möglich, dass Techniken wie die EM oder die oben erwähnte SR-Mikroskopie in der Lage sind differenziertere Phänotypen der ER-Struktur abzubilden, was sich für Versuche zur Komplementation mit Sec61 α (V85D), oder idealerweise mit primären B- oder Plasma-Zellen der PAD-Patienten als interessant herausstellen würde. Darüber hinaus sollten Studien zu einer intrazellulären Lokalisation von Sec61 α (V85D) sinnvoll sein, da im Falle der Sec61 α -Mutationen in ADTKD (engl. „Autosomal-dominant tubulo-interstitial kidney disease“-)Patienten, eine teilweise intrazelluläre Fehllokalisierung in den Golgi detektiert wurde (Bolar et al., 2016).

5.1.1.2. Die Sec61 α (V85D)-Komplementation führt zu einem verringerten Ca²⁺-Gehalt in HeLa-Zellen

Die durchgeführten „Live Cell Calcium Imaging“-Experimente nach Komplementation der endogenen Sec61 α -Depletion mit Sec61 α (V85D) detektierten deutliche Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Homöostase. Da Sec61 α einen passiven Ca²⁺-Leckkanal der ER-Membran darstellt, führt die Inhibition der SERCA durch Tg zur Demaskierung des passiven Ca²⁺-Leckstromes aus dem ER. Vergangene Forschungsarbeiten zeigten, dass die Zelle nach siRNA-vermittelter Sec61 α -Depletion ca. 60 % dieses Ca²⁺-Leckstroms einbüßt und dieser somit entscheidend zum Ca²⁺-Leckstromphänomen in HeLa-Zellen beiträgt (Lang et al., 2011a, Lang et al., 2011b). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Effekt reproduziert werden und auch mit plasmidgetriebenem Sec61 α -Wt vollständig komplementiert werden (Abbildung 4.2). Diese Komplementation des durch die Applikation von Tg induzierten Effektes der Sec61 α -Depletion, gelang mit Sec61 α (V85D) jedoch nicht. Bei Betrachtung der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die im „Live Cell Calcium Imaging“ durch die Applikation von Iono ermittelt wurde, ergab sich nach der Sec61 α -Depletion ein signifikanter Rückgang der Ca^{2+} -Konzentration, der nach Komplementation mit Sec61 α (V85D) noch sehr viel stärker ausgeprägt war und ca. 40 % der Gesamt- Ca^{2+} -Konzentration ausmachte. Die Komplementation mit Sec61 α -Wt führte hingegen zu Ca^{2+} -Leveln auf Kontrollniveau. Die Interpretation dieses Ergebnisses lässt mehrere Möglichkeiten zu.

Zum einen stellt der beinahe identische Phänotyp der Sec61 α (V85D)-Komplementation im Vergleich zur Sec61 α -Depletion nach Tg-Applikation den Erfolg der transgenen Expression von *SEC61A1(V85D)* und Synthese des mutierten Proteins oder seiner Stabilität in Frage. Die Überlegungen hierzu werden gesondert in Kapitel 5.1.1.3 diskutiert.

Zum anderen gibt es aber auch Hinweise darauf, dass die Sec61 α (V85D)-Mutante spezifische Effekte nach sich zieht, die differenziert betrachtet und zu einem Pathomechanismus zusammengefügt werden sollen. Betrachtet man die Sec61 α -Level der korrespondierenden HeLa-Lysate, wird eine partielle Rettung der Sec61 α -Depletion durch Sec61 α (V85D) mit einem Sec61 α -Gehalt von ca. 60 % deutlich, der doch stark vom niedrigen Restproteingehalt der *SEC61A1*-siRNA-Behandlung mit nur 17 % abweicht (Abbildung 4.2, E). Letzteres spricht, vor allem in Verbindung mit dem deutlich zum reinen Sec61 α -Depletion abweichenden Phänotyp der Ca^{2+} -Freisetzung (Iono), für einen spezifischen Effekt von Sec61 α (V85D) auf die Ca^{2+} -Homöostase. Auch die Lebendzellzahlen sind durch die Sec61 α (V85D)-Mutation negativer beeinflusst als es bei der alleinigen Sec61 α -Depletion der Fall war (Abbildung 4.2, F).

Um tiefer in die Frage nach der Proteininstabilität von Sec61 α (V85D) einzutauchen und die Unterschiede zwischen Sec61 α -Wt und -Mutante herauszuarbeiten wurden Kinetiken von Sec61 α und Sec61 β in dem konkreten Versuchsaufbau durchgeführt (siehe Kapitel 5.1.1.3).

5.1.1.3. Einfluss der Sec61 α (V85D) Mutante auf die Sec61-Komplexstabilität

Zur Analyse der Stabilität des heterotrimeren Sec61-Komplexes unter Einfluss der Sec61 α (V85D)-Mutation wurden Western Blots zu verschiedenen Zeitpunkten der Komplementation (48 h, 60 h, 72 h, 96 h und 120 h) durchgeführt. Die Komplementation erfolgte außerdem mit Sec61 α -Wt sowie Sec61 α (Y344H). Letztere Mutation wurde als ursächlich für einen Diabetes-ähnlichen Phänotyp in Mäusen charakterisiert (Lloyd et al., 2010) und als erste Sec61 α -Mutation im Zusammenhang mit einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase diskutiert (Schäuble et al., 2012).

Bei der Betrachtung der Komplementationskinetik fiel auf, dass die Expression der plasmidgetriebenen Sec61 α -Unterheiten nach 32 h relativ schnell die Maxima der

Sec61 α -Level generierte (nach 60 h), wohingegen die Synthese der β -Untereinheiten erst im Laufe der Zeit wieder anstieg, jeweils nach 96 h seinen höchsten Wert erreichte und somit zeitlich zu den Sec61 α -Synthesepeaks verschoben war. Wird die Menge an Sec61 β als Referenzwert herangezogen (Lang et al., 2012), bei dem man von funktionellen heterotrimeren Sec61-Komplexen ausgeht, fällt der Unterschied der beiden betrachteten Mutanten Sec61 α (V85D) und Sec61 α (Y344H) auf: während die Komplementation der siRNA-vermittelten Sec61 α -Depletion mit Sec61 α (Y344H) nach 96 h zu vollständig assemblierten Sec61-Komplexen führt (ca. 100 % Sec61 β), sind es im Fall der Sec61 α (V85D) nach dieser Zeit nur 53 %. Bei der Interpretation dieser Daten gilt es mehrere Aspekte zu berücksichtigen. So ist es möglich, dass die V85D-Mutation im Gegensatz zur Y344H-Mutation von Sec61 α , obwohl beides nicht synonyme Mutationen der Polypeptidkette darstellen, unterschiedlich drastische Effekte hervorrufen (Drummond und Wilke, 2008, Powers et al., 2009). Hinweise darauf geben möglicherweise auch mehrere bioinformatische Vorhersagen. Generell können beinahe alle der bisher charakterisierten Sec61 α -krankheitsassoziierten Mutationen bioinformatisch als krankmachend erfasst werden (Tabelle 5.1ss vgl. auch (Pan-Hammarstrom et al., 2018), weshalb es interessant ist auch die Proteinstabilität *in silico* zu testen (Tabelle 5.1, rechter Teil). Bei den eingesetzten Programmen wird der V85D-Mutante meist ein schwerwiegenderer Einfluss auf die Proteinstabilität vorhergesagt als es für die Y344H-Mutante der Fall ist (Tabelle 5.1, SDM und I-Mutant2).

Tabelle 5.1: *In silico*-Vorhersagen zur Proteinstabilität der verschiedenen Sec61 α -Mutanten. Die verschiedenen bioinformatischen Berechnungen zielen einmal auf die funktionelle Auswirkung der Mutante (SIFT, PMUT, Provean) und auf den Einfluss der Mutation auf die Stabilität des Proteins (SDM, MUpro, I-Mutant2). Der Berechnung liegt entweder die Aminosäuresequenz oder die Struktur von Sec61 α (SDM, I-Mutant2) zugrunde. Für letztere wurde die „protein data bank(PDB)“-Struktur 5A6U (Pfeffer et al., 2015) verwendet. (V85D, E381* = PAD-assoziiert; Y344H = Diabetes-assoziiert; V67G, T185A = ADTKD-assoziiert)

Name	Funktionelle Auswirkungen			Stabilitätsauswirkungen		
	SIFT	PMUT	Provean	SDM	MUpro	I-Mutant2
Ref.-Bereich	0-1; $\leq 0,05$ „damaging“ $> 0,05$ „tolerated“	0-1; $< 0,05$ „neutral“ $> 0,5$ „disease-associated“	$> -2,5$ „neutral“ $< -2,5$ „deleterious“	$[\Delta\Delta G]$; < 0 destabilisierend > 0 stabilisierend	$[\Delta\Delta G]$; ~ 0 unbeeinflusst ~ -1 destabilisierend ~ 1 stabilisierend	$[\Delta\Delta G]$; < 0 destabilisierend > 0 stabilisierend
V85D	0,00	0,87	-6,26	-0,58	-1,25	-1,93
E381*	/	/	-13	/	/	/
Y344H	0,00	0,88	-4,8	-0,21	-1,38	-0,39
V67G	0,01	0,69	-5,36	-1,97	-2,59	-2,48
T185A	0,57	0,47	-4,6	2,06	-0,57	-1,49

Lit- eratur	(Ng und Henikoff, 2003)	(Ferrer-Costa et al., 2002, Lopez-Ferrando et al., 2017)	(Choi und Chan, 2015)	(Pandurangan et al., 2017)	(Cheng et al., 2006)	(Capriotti et al., 2005)
------------------------	-------------------------	--	-----------------------	----------------------------	----------------------	--------------------------

Darüber hinaus soll kurz der Begriff der Proteostase eingeführt werden, was die Homöostase des Proteinnetzwerkes beschreibt (Powers et al., 2009). Die physiologische Faltung von Proteinen wird nicht nur durch chemische und energetische Eigenschaften der Aminosäuresequenz, sondern auch durch makromolekulare Faktoren, die die Faltungsbedingungen optimieren, z.B. Interaktionspartner, beeinflusst (Powers et al., 2009). Die Sec61 α (V85D)-Mutation kann durch ihre zentrale Lage in der Porenring-Region inmitten der Kavität des Sec61 α -Proteins in der Strukturassemblierung des Proteins beeinträchtigt sein, was die Funktionalität stört, oder es energetisch wesentlich aufwändiger und zeitintensiver macht eine stabile Konformation zu erreichen.

Hinzu kommt, dass die Faltung von Multi-TMD-Proteinen generell langsam verläuft, da die Faltung auf mehreren Ebenen realisiert werden muss, nämlich der des „lipid bilayers“ für die TMD sowie der wässrigen Umgebung für die cytosolischen und lumenalen Domänen (Kelly und Balch, 2006). Demgegenüber ist die Y344H-Mutation in der lumenalen 7. Schleife lokalisiert, wodurch Auswirkungen auf Interaktionspartner innerhalb des „lipid bilayers“ unwahrscheinlicher sind. Für die Stabilität des Sec61-Komplexes ist vor allem die Interaktion mit seinen Komplexpartnern Sec61 β und Sec61 γ (Pfeffer et al., 2015) zu nennen, aber relevant sind natürlich auch Interaktionen mit Sec61-assoziierten Proteinen (allein 10 in direkter räumlicher Nähe (Pfeffer et al., 2012, Pfeffer et al., 2014), sowie für die Funktionalität als Translokationskanal Interaktionen mit ribosomalen Proteinen (Voorhees et al., 2014, Pfeffer et al., 2016).

Integrität des heterotrimeren Komplexes

Die siRNA-vermittelte Sec61 α -Depletion führt zum gleichzeitigen Verlust der β -Untereinheit und wahrscheinlich auch zur Degradation des ganzen Komplexes. Ursprüngliche Versuche zur Etablierung der siRNA-vermittelten Genstilllegung zur Sec61 α -Depletion bestätigen die Abhängigkeit der Integrität des heterotrimeren Komplexes von der α -Untereinheit, da sowohl die β -, als auch die γ -Untereinheit dramatisch in ihrem Proteingehalt gesunken waren (Lang et al., 2012). Erklärt werden kann das durch die gestörte Proteostase und Beeinträchtigungen der Proteininteraktionen bei Fehlen der α -Untereinheit, da die „tail-anchor“-Proteine Sec61 β und Sec61 γ nicht auf Sec61 α zur Integration in die ER-Membran angewiesen sind. Der gleiche

Synergie-Effekt der Untereinheiten ist aus Sec61-Orthologen anderer Organismen bekannt. So führt ein verminderter SecE (*E. coli*-Ortholog von Sec61 γ)-Level zur Destabilisierung von SecY (*E. coli*-Ortholog von Sec61 α) (Taura et al., 1993) und auch die Überexpression von SecY ist nicht stabil, wenn nicht gleichzeitig eine Überexpression von SecE erfolgt (Taura et al., 1993). Auch für das Translokon höherer Organismen ist ähnliches beschrieben: Hefen des sog. *sec61-2*-Stammes (Biederer et al., 1996) wiesen neben der Sec61p- (Hefe-Ortholog von Sec61 α) Degradation auch den Rückgang von Sss1p (Hefe Ortholog von Sec61 γ) auf, weshalb die Autoren folgerten, dass die Mutation in Sec61p zur Dissoziation des Komplexes und zur Ubc6 und Ubc7-abhängigen Degradation führte (Biederer et al., 1996). Eine Expression der Sss1p-Untereinheit führte zur Stabilisierung des mutierten Sec61p-Proteins (Biederer et al., 1996). Interessant sind auch die Beobachtungen von Falcone et al., die zeigten, dass sogar eine Mutation im Kern der hydrophoben TMD von Sss1p die Stabilität der integralen Membranproteinpartner des Sec61-, des heptameren Sec-Komplexes sowie die ER-Funktion beeinträchtigen kann (Falcone et al., 2011), was zeigt wie komplex die Integrität des Komplexes reguliert ist. In der Hefe war Sbh1p (Hefe-Ortholog von Sec61 β) durch Mutationen in Sec61p nicht beeinträchtigt und blieb stabil (Biederer et al., 1996). Jedoch ist anzumerken, dass im Falle der β -Untereinheit die geringste Konservierung zwischen den Tierreichen und Spezies besteht (Nishiyama et al., 1994, Matlack et al., 1998, Falcone et al., 2011) und es offenbar hier zum evolutionären „gain-of-function“ kam (Zhu et al., 2018). In höheren Eukaryoten kann Sec61 β beispielsweise für die *Drosophila*-Entwicklung essentiell sein (Valcarcel et al., 1999), spielt eine Rolle in der *C. elegans*-Entwicklung und interagiert in Säugerzellen mit den Mikrotubuli, was der Erhaltung der ER-Homöostase dient (Zhu et al., 2018). Weiterhin führt der KO von Sec61 β zur defekten Reifung und Lokalisierung von Polycystin-1 an der PM, was zur polycystischen Nierenerkrankung führt (Besse et al., 2017). Demgegenüber sind die β -Untereinheiten von *E. coli* und Hefe nicht essentiell (Finke et al., 1996, Feng et al., 2007, Rapoport, 2007).

Es ist also wahrscheinlich, dass Sec61 α (V85D) Auswirkungen auf die Proteinstabilität besitzt und sich dies auch auf assoziierte Untereinheiten und Interaktionspartner überträgt. Dennoch ist zumindest ein Teil der Komplexe (ca. 50 %) mit der Mutante assoziiert und in der Lage einen spezifischen Phänotyp zu entwickeln. Interessant wäre es für Sec61 α (V85D)-komplementierte Zellen die potentielle Gegenregulation auf mRNA-Ebene zu beobachten, da bekannt ist, dass die Repression individueller Translokon-Gene die Expression der Gene von Komplexpartnern hochreguliert (Adamson et al., 2016).

Spezifischer Sec61 α (V85D)-assoziiierter Phänotyp

Für die Spezifität der unter Einfluss der Sec61 α (V85D)-Mutante beobachteten Effekte sprechen trotz einer deutlich schlechteren Assemblierung im Vergleich zum Sec61 α -Wt oder der Sec61 α (Y344H)-Mutation einige Argumente. Geht man dem Sec61 β -Gehalt folgend von 53 % assemblierter Komplexe bei Komplementation mit Sec61 α (V85D) aus, besteht ein deutlicher Unterschied zum Sec61-Silencing mit einem Restproteingehalt von 30 %. Daraus kann man folgern, dass ein Teil mutierter Sec61 α -Proteine in die ER-Membran eingebaut wird und vermutlich ursächlich für den intrazellulären Ca²⁺-Verlust ist (Abbildung 4.2).

Zur Überprüfung wurden „Live Cell Calcium-Imaging“-Versuche mit Zellen durchgeführt, die den geringeren Gehalt an Sec61 β spiegeln sollten, um zu analysieren ob der schlechtere Einbau von Sec61 α (V85D) auch den Ca²⁺-Phänotyp der Sec61 α (V85D)-Komplementation verursachen kann. Letzteres war nicht der Fall und selbst bei einem geringeren Restproteingehalt von Sec61 β (30 %) waren keine Unterschiede in der Ca²⁺-Homöostase erkennbar (Abbildung 4.4), was ein Hinweis auf die Spezifität des Sec61 α (V85D)-assoziierten Ca²⁺-Phänotyps ist. Diskussionswürdig sind dabei noch folgende Beobachtungen: die Restproteinmenge an Sec61 β ist analog zu der von Sec61 α aus dem Versuchsansatz aus Abbildung 4.2. Setzt man die kleinste Menge an vorhandenem Komplexpartner als limitierenden Faktor, stünden die Ergebnisse im Widerspruch, da für die Sec61 α -Depletion ein deutlicher Rückgang der Ca²⁺-Konzentration im ER detektierbar war, für die Sec61 β -Depletion jedoch nicht. Dennoch muss das nicht im Gegensatz stehen. Zum einen beträgt die siRNA-Behandlung für das Sec61 β -Silencing nur 72 h, wodurch die Zellen eventuell noch nicht proteostatisch an den veränderten Sec61 β -Gehalt angepasst sind. Zum anderen, zugegebenermaßen spekulativer, kann die Beobachtung bedeuten, dass die voll assemblierten Komplexe zwar auf 30 % depletiert sind, aber darüber hinaus noch eine weitere Population an Sec61 α vorliegt, die entweder allein, oder zumindest in Abwesenheit von Sec61 β existiert und zum Ca²⁺-Leckstrom beiträgt, auch wenn sie andere Funktionen, z.B. Proteintransport nicht korrekt ausführen kann. Auch von Sbh1p der Hefe scheint es eine autarke Subpopulation außerhalb des Sec61-Komplexes in der ER-Membran zu geben, die mit Rtn1, Rtn2 und Yop1p interagiert und einen Funktionsbereich außerhalb des Proteintransports für Sbh1p anzeigt (Feng et al., 2007, Zhao und Jantti, 2009). Dagegen sprechen Untersuchungen in Bakterien, in denen überexprimiertes SecY ohne gleichzeitige Überexpression seines limitierenden Faktors SecE direkt abgebaut wird. Es scheint wichtig für die Zellen unkomplexiertes SecY abzubauen, um eine optimale Proteintranslokation sicherzustellen und die Integrität der Membran zu erhalten (Taura et al., 1993, Kihara et al.,

1995). Dennoch muss auch diese Aussage in Bezug auf das Säuger-Translokon relativiert werden, da der große evolutionäre Unterschied zwischen SecYEG und Sec61 $\alpha\beta\gamma$ besteht und gerade die Bewahrung der Membranbarriere in Prokaryoten unabdingbar ist, da der Protonengradient über die Membran die Hauptenergiequelle darstellt (Van den Berg et al., 2004, Saparov et al., 2007).

Zur genauen Evaluierung der gestörten Proteostase im Zusammenhang mit Sec61 α (V85D), seiner Stabilität und seinem Interaktom, könnten IPs von Zellpopulationen unter der Expression von Sec61 α (V85D) in Vergleich zur Expression von Sec61 α -WT durchgeführt werden. Neben Unterschieden der Interaktionspartner und der Stabilität der Komplexpartner könnte auch ein Eindruck über mögliche Fehllokalisierung entstehen über die Lokalisierung der Interaktionspartner (Kapitel 4.2.3.1).

Abschließend zu diesem Kapitel soll angemerkt werden, dass es mehrere Hinweise darauf gibt, dass die Expression von Sec61 α (V85D) spezifische Effekte auf die Ca²⁺-Homöostase und die Sec61-Komplexassemblierung besitzt. Diese Aussage wird durch die Beobachtung einer anderen humanen PAD-assoziierten Sec61 α -Mutation, Sec61 α (E381*) unterstrichen, die zu einem C-terminal um 95 Aminosäuren trunkierten Protein führt, das sehr wahrscheinlich degradiert wird (Schubert et al., 2018). Patienten mit dieser Mutation zeigen einen milderen, eventuell reversiblen Phänotyp mit geringerer Durchdringung innerhalb der Familie, weshalb die Vermutung naheliegt, dass es hier zu einer Haploinsuffizienz von *SEC61A1* kommt. Im Falle der Sec61 α (V85D)-Mutation kommt es darüber hinaus zu einer dominant-negativen Beeinflussung der Ca²⁺-Homöostase, die schwerer wiegt als die reine Haploinsuffizienz (Schubert et al., 2018).

Im Folgenden soll besonders in Bezug auf den Pathomechanismus der PAD-Patienten die Rolle von Sec61 α (V85D) in der Ca²⁺-Homöostase weiterentwickelt werden.

5.1.2. Versuche zur Phänokopie der heterozygoten Patientensituation: Sec61 α (V85D) vor endogenem Hintergrund

Der Versuchsaufbau, in dem Sec61 α siRNA-vermittelt depletiert und dann komplementiert wird, birgt viele Vorteile, da es relativ leicht ist etwaige Phänotypen von mutierten Sec61 α -Varianten wie der V85D-Mutante zu beobachten. Dennoch sei zu Bedenken gegeben, dass es sich hierbei um einen artifiziellen Versuchsaufbau handelt, der durch die Depletion des endogenen Sec61 α bis auf den Restproteingehalt den Einfluss der eingebrachten Mutante, verglichen mit den heterozygoten Patienten, überbewerten kann. Hierzu scheint es passend zu erwähnen, dass generell Disruptionen der Proteinnetzwerke durch Mutationen in Proteinen

mit sehr spezifischen Aufgaben wesentlich milder verlaufen als es für Proteine in zentralerer Position eines Proteinnetzwerkes der Fall ist (Powers et al., 2009). Auf Mutationen von Sec61 α bezogen, dürfte letzteres der Fall sein, da Sec61 ein zentraler Knotenpunkt der Ca²⁺-Homöostase, des sekretorischen Wegs, der UPR und wie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, auch der ATP-Homöostase darstellt. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass die bis dato einzigen beschriebenen phänotypisch ausgeprägten Sec61 α -Mutationen in Menschen einen heterozygoten genetischen Hintergrund besaßen, sodass die Mutationen zwar krankheitsverursachend sein können, aber durch Existenz einer wildtypischen Kopie des Proteins die Letalität verhindert wird (Bolar et al., 2016, Schubert et al., 2018). Aus diesem Grund wurde zur weiteren Charakterisierung von Sec61 α (V85D) ein Versuchsaufbau gewählt, der diese genetische Situation eher abbildbar macht. Und zwar wurde vor endogenem Hintergrund Sec61 α (V85D) (und als Kontrollpopulation Sec61 α -Wt) für 42 h transgen exprimiert. Um es aus proteostatischer Sicht physiologischer zu gestalten, auch vor dem Hintergrund der Überlegungen zur Stabilität von Sec61 α (V85D) (Kapitel 5.1.1.3), wurden auch die β - und γ -Untereinheiten des heterotrimeren Sec61-Komplexes transgen exprimiert. Die Expression der Untereinheiten war insofern erfolgreich, als dass der Gehalt an Sec61 α und Sec61 β erhöht werden konnte. Nimmt man als Rationale für voll funktionale Sec61-Komplexe wieder die Menge an Sec61 β , erfolgt nach Expression der V85D-Mutante eine ca. 2-fache Überexpression von Sec61 α -Wt und eine ca. 1,5-fache Überexpression von Sec61 α (V85D). Die Tatsache, dass sich die Menge an Sec61 α nicht um mehr als das doppelte exprimieren ließ, wurde auch in anderen Organismen beobachtet wie in Hefen für die α -Untereinheit (Biederer et al., 1996) und in *C. elegans* für die β -Untereinheit (Zhu et al., 2018).

5.1.2.1. Die Expression von Sec61 α (V85D) führt zu ER-Stress

Im Vergleich zur transgenen Expression des Sec61 α -Wt ergab sich für die Expression von Sec61 α (V85D) eine leichte Erhöhung der ER-Stress-assoziierten Proteine BiP (160 %) und Grp170 (140 %). In Anbetracht der Tatsache, dass durch bereits diskutierte Ergebnisse (Kapitel 5.1.1.2) der Einfluss von Sec61 α (V85D) auf die Ca²⁺-Homöostase in HeLa-Zellen nachgewiesen wurde, scheint es eine Konsequenz zu sein, dass ER-lumenale Chaperone, wie BiP und Grp170, die von der Ca²⁺-Homöostase abhängig sind, ebenfalls durch die Mutation beeinflusst sind (Brostrom und Brostrom, 1998, Bertolotti et al., 2000). Da die reine Sec61 α -Depletion keinen Einfluss auf ER-Stress-assoziierte Proteine besaß (Lang et al., 2012), ist dies ein weiteres valides Indiz für einen dominant-negativen Phänotyp der Sec61 α (V85D)-Mutante. Versuche, die zum Einfluss der Sec61 α (V85D)-Mutante in multiplen Myelom (MM)-Zelllinien durchgeführt wurden, zeigten nach viraler Transduktion der MM-Zelllinien

einen erhöhten Proteinlevel von IRE1 α , PERK, XBP1s und ATF4, sowie eine Erhöhung der mRNA von XBP1s, ATF4 und CHOP (Schubert et al., 2018). Vor allem letzteres spricht dafür, dass die MM-Zellen durch den Einfluss von Sec61 α (V85D) den apoptotischen Weg einschlagen, was ein Grund für die Antikörperdefizienz sein kann. Auch andere Sec61 α -Mutationen führen im Zusammenhang mit ER-Stress-vermittelter Apoptose möglicherweise zur Pathogenese ihrer Erkrankungen. Hierbei handelt es sich zum einen um die bereits zuvor erwähnte Sec61 α (Y344H)-Mutation, die in homozygoten Mäusen zu β -Zellverlust, Hyperglykämie und Insulinsuffizienz führt (Lloyd et al., 2010). In diesen Mäusen sind die spezifischen ER-Stress-Marker BiP und Chop deutlich hochreguliert (Lloyd et al., 2010) und es stellte sich die Frage wie der ER-Stress ausgelöst wird. Das dazugehörige Modell liefert eine Erklärung, unter Berücksichtigung einer Sec61-vermittelten Änderung der Ca²⁺-Homöostase, deren Rolle im β -Zelltod hinlänglich bekannt ist (Schäuble et al., 2012). Zum anderen werden auch heterozygote Sec61-„loss of function“-Mutationen die mit der ADTKD assoziiert sind, als Erklärung für ihren Pathomechanismus mit ER-Stress assoziiert (Bolar et al., 2016). Somit gibt es mittlerweile neben vielen anderen ER-Stress assoziierten Pathologien (Oakes und Papa, 2015) auch mehrere Beispiele für Sec61 α -Mutationen, deren Pathogenese ER-Stress-assoziiert ist und auch valide Anhaltspunkte, dass dieser in Zusammenhang mit der Sec61 α -assoziierten Ca²⁺-Leckfunktion steht, weshalb sich die bisherigen Beobachtungen für Sec61 α (V85D) in das Bild fügen (vgl. Kapitel 5.1.1.2). Generell unterstützen diese Befunde zu Krankheits-assoziierten *SEC61A1*-Mutationen die Sichtweise, dass der humane Sec61-Komplex auch ohne Mutation als Ca²⁺-Leckkanal am Übertritt von Zellen in die Apoptose beteiligt sein könnte. Ebenfalls interessant im Zusammenhang mit den Sec61 α -Mutationen ist, wie bereits erwähnt, die Möglichkeit der gestörten Interaktion mit dem Sec61-Interaktom. Ein interessanter Interaktionspartner im Zusammenhang mit ER-Stress und UPR ist IRE1 α (Plumb et al., 2015, Sundaram et al., 2017). Auffallend ist, dass die Repression des Translokons vornehmlich den IRE1 α -Weg der UPR-Antwort aktiviert und die beiden anderen Wege inaktiv bleiben (Adamson et al., 2016). Darüber hinaus führte allein der IRE1 α -Zweig zur Hochregulation der Translokon-Untereinheiten (Shoulders et al., 2013), weshalb ein Feedback-Loop zur Regulation vorgeschlagen wurde. So könnte IRE1 α den Translokationsstatus überwachen, um, falls notwendig, die Translokationsmaschinerie hochzuregulieren, wodurch eine breitere UPR-Induktion und im weiteren „signaling“ der apoptotische Zelltod erst einmal verhindert wird (Adamson et al., 2016). Im Falle der Expression der Sec61 α (V85D)-Mutante in MM-Zelllinien ist nicht nur der IRE1 α -Weg hochreguliert, sondern auch PERK, was für einen ER-Stress-Level jenseits der Sec61-IRE1 α

Regulation spricht und auch dafür, dass schwerwiegender ER-Stress vorliegt (Sundaram et al., 2017) und das Gleichgewicht bereits in Richtung Apoptose verschoben ist.

Die Lebendzellzahlen der transgen mit Sec61 α (V85D) exprimierten HeLa-Zellen war im Vergleich zur Expression des Wt nicht verändert, was bedeutet, dass die Sec61 α (V85D)-Mutante in Bezug auf das Zellwachstum keinen dominanten Effekt besitzt. Auch diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus Sec61 α (V85D)-transduzierten Zelllinien, wo sämtliche nicht-lymphozytischen Zelllinien (darunter auch HeLa-Zellen) keinen Wachstumsdefizit aufwiesen (Schubert et al., 2018). Völlig anders verhielt es sich jedoch bei den MM-Zelllinien, die in ihrer Viabilität und Proliferation deutlich sensitiv auf die Expression von Sec61 α (V85D) reagierten, wobei innerhalb der verschiedenen MM-Zelllinien die JK6L-Zellen (sezernieren Antikörper) am sensitivsten auf die Mutante reagierten (Schubert et al., 2018).

5.1.2.2. Die transgene Expression von Sec61 α (V85D) führt zu disruptierter Ca²⁺-Homöostase

Die „Live Cell Calcium Imaging“-Versuche, denen experimentell die transgene Expression von Sec61 α (V85D), sowie Sec61 β und Sec61 γ vorausging, zeigten einen dominant negativen Effekt auf die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase (Abbildung 4.6). Beide Effektoren, Tg und Iono, führten unter Einfluss von Sec61 α (V85D) zur verringerten Ca²⁺-Konzentration, was dafür spricht, dass ein geringerer intrazellulärer Ca²⁺-Pool vorhanden ist, was sich auch in der Tg-Antwort bemerkbar macht, da das ER das Hauptspeicherorganell für Ca²⁺ ist (siehe Kapitel 2.3). In Kongruenz mit den Komplementationsversuchen mit Sec61 α (V85D) scheinen Zellen unter dem Einfluss der Mutation konstitutiv Ca²⁺ zu verlieren, was für einen unregulierten Leckstrom spricht, wohl durch die Disruption sowohl der Kanalintegrität, als auch seiner Interaktionspartner, die an der physiologischen Ca²⁺-Leckkontrolle beteiligt sind, wie z.B. BiP, ERj3, ERj6, CaM oder Sec62 (Erdmann et al., 2011, Schäuble et al., 2012, Dudek et al., 2015, Schorr et al., 2015, Lang et al., 2017). Wurde hingegen Sec61 α -Wt inklusive der beiden anderen Sec61-Komplex-Komponenten transfiziert, erfolgte ein erhöhter Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER, wie es das Vorhandensein zusätzlicher Sec61-Leckkanäle vermuten lässt. Dass hier auch die intrazelluläre Ca²⁺-Gesamtmenge erhöht war, macht unter der Annahme Sinn, dass ein erhöhter Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER, ein erhöhtes Bedürfnis der Regulation nach sich zieht. Dies kann bedeuten, dass die Zelle dem Verlust an ER-Ca²⁺ mit der Aktivierung des SOCE entgegentritt. Wichtig ist eine hohe Ca²⁺-Konzentration im ER für diverse Chaperone, die die ER-Homöostase sicherstellen und ER-Stress auflösen, u.a. auch für BiP, das auch als bedeutender allosterischer Regulator des Sec61-vermittelten Ca²⁺-

Leckstroms auf eine konsequente Ca^{2+} -Versorgung angewiesen ist (Brostrom und Brostrom, 1998, Bertolotti et al., 2000, Schäuble et al., 2012).

Die Mobilisierung von Ca^{2+} spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von B-Zellen. Dabei führt die Bindung von Antigen an den Immunglobulin (Ig)-Rezeptor der B-Zellen dazu, dass eine Phospholipase γ 2-vermittelte Erzeugung von IP_3 erfolgt, was ein bedeutender „second messenger“ zur Mobilisierung des Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern darstellt (Kurosaki und Hikida, 2009). Daraufhin kommt es zum SOCE, der das Wiederauffüllen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher über Ca^{2+} -Kanäle der PM sicherstellt (Feske, 2007, Oh-hora und Rao, 2008, Oh-Hora et al., 2008). Verluste von Orai oder STIM1 und STIM2, der Hauptakteure des SOCE (siehe Kapitel 2.3.3), resultieren in Beeinträchtigungen der Proliferation von B-Zellen (Matsumoto et al., 2011, Baba et al., 2014, Hemon et al., 2017). Zwar ist der SOCE bislang nicht mit der B-Zellentwicklung zu Plasmazellen in Verbindung gebracht worden (Feske, 2011, Matsumoto et al., 2011, Shaw und Feske, 2012), dennoch sollte das Ca^{2+} -„signaling“ unter dem Einfluss der Expression von Sec61 α (V85D) untersucht werden. Es wurden daher erste Versuche gestartet, die darauf abzielten, ob SOCE bei der Expression von Sec61 α (V85D) aktiviert ist und wie die intrazelluläre Verteilung der Ca^{2+} -Pools in diesen Zellen ist. Für eine Prä-Aktivierung des SOCE (Abbildung 4.7) gab es in diesem Versuchsaufbau keine Hinweise. Allerdings soll hier darauf hingewiesen werden, dass es sich nur um eine vorläufige Datenerhebung aus 2 biologischen Replikaten handelt, wobei bei einem Versuch die Expression von transgenem Sec61 β nicht erfolgreich war. D.h. hier würden sich weitere Versuche anbieten, auch mit einem anderen Messprotokoll, das die Ca^{2+} -Aufnahme (Umfang, Geschwindigkeit) nach ER-Entleerung mit Tg misst. Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, in denen zuerst mit Tg der ER- Ca^{2+} -Pool und anschließend mit Iono der restliche mobilisierbare Ca^{2+} -Pool entleert wurde. Die Idee dieses Experiments war es die Menge an Ca^{2+} aus anderen Pools zu ermitteln, wobei darunter neben ERGIC (engl. „endoplasmic reticulum Golgi intermediate complex“), Golgi, Peroxisomen und Lysosomen, vornehmlich das Mitochondrium zu nennen ist (Rizzuto et al., 1992, Chandra et al., 1994, Ying et al., 2002, Raychaudhury et al., 2006, Calcraft et al., 2009, Prins und Michalak, 2011). Ca^{2+} spielt innerhalb des mitochondrialen „signaling“ eine wichtige Rolle, nicht nur zur ATP-Produktion, sondern auch zur Apoptoseinduktion (Brown, 1992, Chami et al., 2008, Balaban, 2009, Hayashi et al., 2009, Bravo et al., 2011). Letztere ist im Zusammenhang der Fragestellung wie der Pathomechanismus der Plasmazellen (engl. „plasma cells“, PC) unter Einfluss der Sec61 α (V85D)-Mutante von statten geht essentiell. Die Versuche in Abbildung 4.8 zeigen lediglich, dass erwartungsgemäß in Kontrollzellen der Tg-

mobilisierbare Ca^{2+} -Pool (ER) größer ist als der der übrigen Ca^{2+} -Speicher. Dennoch ist eine nicht unbeträchtliche Menge auch im zweiten Ca^{2+} -Peak zu detektieren. Auffallend war in diesen Versuchen vor allem der geringe Unterschied zwischen Peak 1 und 2 in Zellen mit Sec61 α (V85D)-Expression, was bedeutet, dass eine größere Menge an Ca^{2+} anderen Pools entstammte (dem Mitochondrium?) im Vergleich zu Wt oder LV. Dies trägt zu der Hypothese bei, dass Sec61 α (V85D), auch wenn es vor endogenem genetischen Hintergrund exprimiert wird und so nur eine Teilmenge des gesamten Sec61 α -Pools ausmacht, einen dominant negativen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase besitzt, was eine mögliche Apoptoseinduktion der PC nach sich zieht. Einen ähnlich dominant negativen Effekt hat die Sec61 α (V85D)-Mutation auf HEK293T-Zellen, die mit Tg gestresst wurden, um Ca^{2+} -induzierten ER-Stress auszulösen (Schubert et al., 2018). Unter ungestressten Bedingungen zeigten diese Zellen keine Induktion der terminalen UPR, nach Tg-Behandlung allerdings hatte die Expression der Sec61 α (V85D)-Mutante eine deutliche Induktion von XBP1s zur Folge. Dies war auch der Fall, wenn eine Co-Expression des Sec61 α -Wt erfolgte (Schubert et al., 2018).

5.1.2.3. Die transgene Expression von Sec61 α (V85D) besitzt Effekte auf den Proteintransport

Die Versuchsreihe zum Proteinimport in das ER unter Einfluss der Expression von Sec61 α (V85D) vor endogenem Hintergrund detektierte einen unveränderten (Substrate ERj3, kappa) bzw. leicht verbesserten (Präproapelin, Präprolaktin) co-Transport im Vergleich zur Expression von Sec61 α -Wt (Abbildung 4.9). Interessant ist dies vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass es zu einer geringeren Expression von Sec61 α (V85D) im Gegensatz zu Sec61 α -Wt kommt (Abbildung 4.10). D.h. trotz, dass der Anteil der mutierten Sec61 α -Untereinheiten geringer ist, scheinen sie in der Lage zu sein einen verbesserten Transport der betrachteten Substrate vermitteln zu können. Im Zusammenhang mit Mutationen, die einen verbesserten Transport von Vorläufer-Proteinen vermitteln, sind vor allem die sog. *prl*-Mutationen in *E. coli* und auch der Hefe zu nennen (Emr et al., 1981, Bieker et al., 1990, Junne et al., 2007) Bei den *prl*-Mutationen handelt es sich um Suppressor-Mutationen defekter Signalsequenzen, d.h. Vorläufer mit defekten Signalsequenzen können den Sec61-Kanal aufgrund von Mutationen der Kanaluntereinheiten effektiv nutzen, da entweder die Öffnung des Kanals erleichtert oder die offene Form stabilisiert wird (Van den Berg et al., 2004, Smith et al., 2005). Generell gilt, dass nicht jede Porenringmutation einen *prl*-Phänotyp hervorruft (Junne et al., 2007) und Porenringmutation, die einen *prl*-Phänotyp bei defekten Signalsequenzen (z.B. CPY Δ 3) aufweisen, können unter co- und post-Transportbedingungen der Wt-Substrate (z.B. CPY) dennoch Transportdefekte aufweisen (Junne et al., 2010).

Interessant ist aber, dass der Austausch sämtlicher 6 hydrophoben Porenringamino­säuren durch 6 Lysine (K, positiv geladen) oder Aspartate (D, negativ geladen) innerhalb des Sec61p der Hefe nicht zur Letalität führt und die Defekte im Transport co- und post-Substrate nur mittel bis moderat (30 % co, 50 % post) ausfallen, obwohl vermutet werden könnte, dass die Ladungen zu Abstoßungsreaktionen und Beeinträchtigung der Insertion des Sec61-„Helix-Bundles“ führen (Junne et al., 2010).

Die Tatsache, dass bei der Sec61 α (V85D)-Mutante nur eine der hydrophoben Porenring-Aminosäuren durch das negativ geladene Aspartat (D) ausgetauscht wurde, könnte per se einen schwächeren Effekt auf die Viabilität, Transportverhalten etc. erwarten lassen als die 6D-Mutante aus Junne et al.. Jedoch ignoriert diese Vermutung den evolutionären Einfluss der Ca²⁺-Homöostase des ER, die Säuger und Hefen grundlegend unterscheidet. Das ER stellt in Säugern das intrazelluläre Hauptspeicherorganell für Ca²⁺ dar (Berridge et al., 2000), wohingegen die Hefen ca. 95 % ihres intrazellulären Ca²⁺-Gehalts in der Vakuole speichern (Dunn et al., 1994). D.h., auch wenn die Hefen im ER Ca²⁺ für die korrekte Faltung und die sekretorische Maschinerie vorhalten (Bonilla et al., 2002), spielt die Ca²⁺-Homöostase im ER der Säugerzellen eine weitreichende Rolle bis möglicherweise hin zur Verquickung mit der Energiehomöostase (Vishnu et al., 2014, Klein et al., 2018), weshalb Störungen der Ca²⁺-Homöostase insbesondere für professionell sekretorische Zellen des Immunsystems entscheidend sein können (Hara et al., 2014).

Auch die Stabilität der 6D- oder 6K-Sec61p-Mutanten war in einem Δ SEC61-Stamm nicht wesentlich reduziert. Lediglich im Falle der heterozygoten Situation, in Co-Expression mit dem Sec61p-Wt kam es zur Destabilisierung der Mutanten, wohl durch Konkurrenz um limitierte Interaktionspartner (Junne et al., 2007, Junne et al., 2010). Im Fall der Transportversuche mit der Sec61 α (V85D)-Mutante ist letzterem Szenario durch simultane Expression von Sec61 β und Sec61 γ entgegengewirkt worden, was auch für Hefestämme (Expression von sbh1p und sss1p) einen komplementierenden Effekt auf destabilisierende Mutanten hatte (Junne et al., 2007). Der verbesserte Transport der in dieser Arbeit betrachteten Transportsubstrate könnte eventuell für das Vorliegen einer Säuger-*prl*-Mutation sprechen, oder zumindest für eine, die den offenen Zustand des Komplexes stabilisiert bzw. den geschlossenen Zustand destabilisiert. Letzteres fügt sich gut in die Argumentationskette zur veränderten Ca²⁺-Homöostase ein, die sich durch einen konstitutiven Ca²⁺-Leckstrom aufgrund eines fehlregulierten oder strukturell destabilisierten Sec61-Komplex ergibt (Kapitel 5.1.2.2). Zur detaillierten Analyse müssten sich Versuche mit *prl*-Substraten anschließen. Dennoch stellt sich die Frage warum der Transport der Substrate ERj3 und Kappa weniger

beeinflusst ist als der von Präproapelin und Präprolaktin und ob es eine Substratspezifität geben kann. Kritisch zu sehen ist der Phänotyp des defekten Transports von Präprolaktin (26 %) in SP-Zellen unter Versuchsbedingungen, in denen das endogene Sec61 α depletiert und mit Sec61 α (V85D) komplementiert wurde (Schubert et al., 2018). Zuvor diskutierte Daten zur Ermittlung der Ca²⁺-Homöostase und der Stabilität des Komplexes unter Komplementationsbedingungen (Kapitel 5.1.1) ließen vermuten, dass Sec61 α (V85D) einen dominant negativen Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase hat und der verwendete Versuchsaufbau in der Lage ist Sec61 α (V85D)-assoziierte Veränderungen der Zellphysiologie abzubilden. Deshalb stellt sich die Frage warum sich bei dem Transport von Präprolaktin der entgegengesetzte Phänotyp darstellt, im Vergleich zum Versuchsaufbau der transgenen Expression. Da der Gehalt an Sec61 β in den Versuchen aus Schubert et al. 2018 nicht beobachtet wurde, wäre eine mögliche Erklärung, dass dieser deutlich unter dem Wert von 53 % lag und somit der Anteil der Sec61-Komplexe, die Sec61 α (V85D) enthielten, sehr gering war und zudem der Restprotein-Pool von Sec61 α -Wt mit der mutierten Form um die restlichen Untereinheiten und Interaktionspartner konkurrierte. Dann würde Sec61 α (V85D) phänotypisch gar nicht in Erscheinung treten, weshalb man die Versuche unter zusätzlicher Expression der β - und γ -Untereinheiten wiederholen sollte.

Die Tatsache, dass die Sec61-unabhängige Insertion des „tail-anchor“-Proteins Sec61 β (Abbildung 4.10) völlig unbeeinflusst von der Mutante von staten geht, spricht für die Integrität der ER-Membran unter Expression von Sec61 α (V85D) gemeinsamen mit Sec61 β und Sec61 γ .

Die erhobenen Daten zum Proteintransport deuten darauf hin, dass sich unter Einfluss von Sec61 α (V85D) das Transportverhalten von Vorläuferproteinen verändert. Dennoch bleiben Unterschiede je nach verwendetem experimentellen Ansatz, da sich nach Expression von Sec61 α (V85D), sowie Sec61 β und Sec61 γ vor endogenem Hintergrund ein *prl*-(ähnlicher) Phänotyp beobachten ließ, demgegenüber jedoch ein Transportdefekt von Präproapelin nach Komplementation der endogenen Sec61 α -Depletion mit Sec61 α (V85D) stand (Schubert et al., 2018). Die größte Limitation der experimentellen Ansätze ist die Schwierigkeit die Stabilität des mutierten Komplexes zu bewerten. Zwar hat man mit der Bestimmung von Sec61 β eine Rationale anzunehmen, dass der heterotrimere Komplex (partiell) wiederhergestellt ist, dennoch verbleiben Unwägbarkeiten, die sich vor allem auf den Restproteingehalt des endogenen Proteins beziehen. Um dem entgegenzuwirken bieten sich entweder Versuche mit einer getaggtten Sec61 α (V85D)-Mutante an, von deren Stabilität zumindest für C-terminal getaggte Myc-His-Varianten (Greenfield und High, 1999) und C-terminal getaggte FLAG-

Varianten (Bolar et al., 2016) auszugehen ist, oder im Idealfall die Generierung stabiler, genomisch integrierter Sec61 α (V85D)-Zellen. Versuche mittels HeLa-Flp-in-Zellen scheiterten bezüglich der Integration des mutierten Gens, was vermutlich auf die genomische Instabilität der HeLa-Zellen rückzuführen ist (Daten nicht gezeigt), weshalb sich zukünftig die Verwendung einer CRISPR/Cas9-Zelllinie für Sec61 α (V85D) anbieten würde. Zusätzlich wäre es interessant in das Spektrum der transportierten Substrate zusätzlich zu der leichten Antikörperkette kappa andere PC-spezifische mit aufzunehmen, wie den Vorläufer der verschiedenen schweren Ketten (α , δ , ϵ , γ und μ), die die Antikörperklassen definieren, jedoch jeweils dieselbe Signalsequenz besitzen. Weiterhin wäre z.B. Interleukin 21 (IL-21) möglicherweise ein interessantes Substrat, da seine Rolle in der terminalen B-Zelldifferenzierung beschrieben ist und auch ein Zusammenhang zu primären Immundefizienzen besteht (Kotlarz et al., 2013, Moens und Tangye, 2014). Außerdem sind noch keine Studien zur Integration von TMD-Proteinen unternommen worden, die potentiell auch von der V85D-Mutation beeinflusst werden könnten. Es wurde nämlich gezeigt, dass die Aminosäurekomposition des Porenrings entscheidend für den Hydrophobizitätsschwellenwert zur TMD-Integration ist (Junne et al., 2010). Um dies mit spezifisch für die B-Zellentwicklung benötigten Proteinen zu analysieren, könnten als Integrationssubstrate CD (engl. „cluster of differentiation“-)Antigene (z.B. CD27, CD38, CD126) der B-Zell-Plasmamembran untersucht werden. Letztere fungieren als Identitätsmarker der verschiedenen Lymphozyten.

5.1.3. Vermehrter Ca²⁺-Leckstrom aus dem ER als Modell des Pathomechanismus für humane PAD

PAD wird generell durch gestörte B-Zelldifferenzierung und -Funktion charakterisiert, was zu einer geringen Ig-Produktion führt (Fried und Bonilla, 2009). Die genaue Rolle des Ca²⁺-„signalings“ in der Entwicklung der PCs ist noch nicht gut erforscht, dennoch ist gestörtes intrazelluläres Ca²⁺-„signaling“ bislang mit mindestens 3 humoralen Immundefizienzen assoziiert, die durch Hypogammaglobulinämie gekennzeichnet sind (Simon et al., 1992, van Zelm et al., 2006, Foerster et al., 2010). Darüber hinaus spielen spezifische Transkriptionsfaktoren in der PC-Entwicklung eine wichtige Rolle, z.B. XBP-1, Blimp-1, IRF4, NF- κ B und NFAT (Rao et al., 1997, Reimold et al., 2001, Calame et al., 2003, Lin et al., 2003, Shaffer et al., 2004). Interessant ist die Verbindung zwischen der Ca²⁺-Homöostase und der Aktivierung von NFAT bzw. NF- κ B, die der Cytokin-Aktivierung und Proliferation dienen (Scharenberg et al., 2007), wobei der NFAT-assoziierte Weg bei einer niedrigen Ca²⁺-

Konzentrationssteigerung aktiviert wird (200 nM), wohingegen zur Aktivierung von NF- κ B Ca^{2+} -Erhöhungen von >500 nM notwendig sind (Dolmetsch et al., 1997, Healy et al., 1997, Macian, 2005, Hemon et al., 2017).

Dies unterstreicht die Bedeutung der Ca^{2+} -Homöostase für die Entwicklung der B-Zellen. Weiterhin erfordert die Transformation zu PC eine massive Weiterentwicklung des sekretorischen Apparates, der es den PC erlaubt riesige Mengen an Antikörpern zu sezernieren (Wiest et al., 1990, Calame et al., 2003). Diese Veränderungen bestehen beispielsweise in der 3-fachen Volumenvergrößerung der ER-Cisternen, sowie dem Anstieg von vielen ER-residenten Faltungsfaktoren und der Synthese von Membranen (Lewis et al., 1985, Wiest et al., 1990, Rush et al., 1991, van Anken et al., 2003, van Anken und Braakman, 2005, Kirk et al., 2010).

Mit der Bedeutung von XBP-1 besteht auch eine enge Verbindung zwischen UPR und PC-Entwicklung. Überraschenderweise sieht es so aus, als würde nicht das hohe Maß an ungefaltetem Ig die ER-Expansion vorantreiben, sondern als wäre dies ein Prozess der Zelle, die sich auf die Ig-Produktion vorbereitet (Gass et al., 2002, van Anken et al., 2003, van Anken und Braakman, 2005), was XBP-1 und seinen Zielgenen des sekretorischen Wegs (Cenci und Sitia, 2007) eine evolutionär gesehen neue Funktion einräumt (Shaffer et al., 2004). Interessant ist auch die Beobachtung, dass in kurzlebigen PC ein gleichzeitiger Rückgang an Proteasomen zu beobachten ist, was in Hinblick auf die erhöhte Proteinladung des ER auf den ersten Blick widersinnig erscheint, auf den zweiten Blick jedoch die Zellen für den apoptotischen Zelltod prädisponieren könnte (Cenci und Sitia, 2007).

Beachtlich ist, dass die mit PAD in Verbindung gebrachte Mutation V85D, der α -Untereinheit des Sec61-Komplexes, im proteostatischen Netzwerk mit all den angesprochenen zellphysiologischen Wegen in direkter Verbindung steht. Die Erforschung des passiven Sec61-assoziierten Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER steht im Zusammenhang mit der Homöostase der PC erst zu Beginn, dennoch zeichnet sich eine Korrelation zwischen Sec61-Gehalt in PC und Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER ab (Tillman Pick, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf die Bedeutung eines BI-1-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms aus dem ER für die B-Zellabhängige Antikörperproduktion, da BI-1-KO-Mäuse auf Antigen-Stimulation mit einer verringerten Ig-Sekretion reagierten (Lisak et al., 2016), was die Aktualität der Ca^{2+} -Leckstrom-Assoziation für die B- und T-Zellfunktionen unterstreicht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen einen deutlichen dominant negativen Effekt der Sec61 α (V85D)-Mutante auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Die naheliegendste Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist ein konstitutiver Verlust an

intrazellulärem Ca^{2+} aus dem ER aufgrund der fehlenden Integrität des Sec61-Komplexes durch die mutierte, kanalbildende α -Untereinheit. Als Folge wär ein pro-apoptotisches Ca^{2+} -„signaling“ denkbar (Nakagawa und Yuan, 2000), das die Zelle darin hindert, ein mittels XBP-1 eingeleitetes kontrolliertes ER-Expansionsprogramm zu starten, da das Gleichgewicht schon zu weit in Richtung Apoptose verschoben ist. Hierfür spricht auch die Induktion von PERK auf Proteinebene Sec61 α (V85D)-transduzierter MM-Zellen (Schubert et al., 2018), da PERK im Verlauf der B-Lymphozyten-Entwicklung in PC nicht notwendig ist, und hier wohl für terminalen ER-Stress steht (Gass et al., 2002, Zhang et al., 2005), sowie die mRNA-Induktion von XBP-1s, CHOP und ATF4 (Schubert et al., 2018). Vorstellbar ist auch eine Fehlregulation der Ca^{2+} -abhängigen Transkriptionsfaktoren, jedoch spricht die unbeeinflusste B-Zellentwicklung, -aktivierung und Gedächtnisbildung, wie sie bei anderen Immundefizienzen, die den CVID („common variable immunodeficiency“) -Erkrankungen zugeordnet werden, vorkommen, eher dagegen (van de Ven et al., 2011, Bogaert et al., 2016, Schubert et al., 2018). Dass ein verringerter intrazellulärer Ca^{2+} -Gehalt der Speicher mit ER-Stress, UPR und Apoptose assoziiert ist, belegen Beispiele aus der Literatur wie die Apoptose der Makrophagen unter dem Einfluss einer vermehrten freien Cholesterolkonzentration in der ER-Membran, die SERCA2b inhibiert (Li et al., 2004). Oder auch im Zusammenhang mit Insulin-resistenten Modellen der Fettleibigkeit, in denen chronischer ER-Stress nachgewiesen wurde, da die Inhibition von SERCA2b als Folge der Veränderungen der ER-Fettsäuren und -Lipidzusammensetzung, eine disruptierte Ca^{2+} -Homöostase nach sich zieht (Hotamisligil, 2010, Fu et al., 2011). Neben der Ca^{2+} -Homöostase soll im Zusammenhang mit der Sec61 α (V85D)-Mutante aber auch die Funktion des Proteintranslokationskanals Platz in diesem Pathogenese-Modell finden, da die Expansion des ER, seine ER-Stress-Induktion und die massive Antikörper-Synthese und -Sekretion besondere Herausforderungen der PC sind. Eine mutierte Form von Sec61 α , die in ihrer Funktion als Translokationskanal stark eingeschränkt ist, kann für die PC fatal sein, worauf Transportversuche mit Präprolaktin hindeuten (Schubert et al., 2018). Dennoch bleibt bei diesen Versuchen die Unsicherheit inwieweit es sich um translokationskompetente mutierte Sec61-Komplexe handelte. Ein anderer Versuchsaufbau, der den Einfluss der Sec61 α (V85D)-Mutante untersucht, zeigt einen leicht verbesserten Transport von Präprolaktin (Abbildung 4.9), was eher auf einen fehlregulierten offenen Kanal hindeutet, der die Proteinladung des ER, sowie die Qualitätskontrolle überstrapaziert. Als Limitierung in diesem Fall ist die experimentelle Beschränkung des HeLa-Zellmodells zu definieren, die sowohl bei transgener Expression von Sec61 α (V85D) vor endogenem Hintergrund, als auch bei siRNA-vermittelter endogener

Sec61 α -Depletion und Komplementation artifiziell bleibt. Zusätzlich zu der Schwierigkeit, die die Assemblierung eines mutierten 10 TMD-Domänen-Proteins wie Sec61 α (V85D) mit sich bringen kann (Kelly und Balch, 2006), sind diverse Manipulationen durch Transfektionen der Zelle erforderlich, sowie der Einfluss einer endogenen Restproteinmenge zu bedenken. Der Einsatz einer stabilen Zelllinie für zukünftige Arbeiten sollte deshalb oberste Priorität besitzen. Dennoch ergibt sich mit der disruptierten Ca²⁺-Homöostase ein kohärentes Bild im Zusammenhang mit der PAD-assoziierten Pathogenese der PC. Gegen einen reinen Phänotyp der Haploinsuffizienz von Sec61 α in PC, also sprich, dass die Gendosis nur eines funktionalen *SEC61A1*-Allels nicht für den Bedarf an sekretorischem Apparat in PC ausreicht, spricht der abgeschwächte PAD-Phänotyp der Sec61 α (E381*)-Mutation im Vergleich zur Sec61 α (V85D)-Mutation. Wohingegen erstere Sec61 α -Mutante vermutlich vollständig degradiert wird und die Haploinsuffizienz eines *SEC61A1*-Allels den PAD-Phänotyp verursacht, führt Sec61 α (V85D) zur teilweisen Assemblierung von Sec61-Komplexen mit dominant negativem Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase und potentiell den Proteintransport, was zu einer durchdringenderen PAD in dieser betroffenen Familie führt (Schubert et al., 2018).

Eine offene Frage im Zusammenhang mit dem Vorschlag der Sec61-assoziierten disruptierten Ca²⁺-Homöostase als zugrundeliegenden Pathomechanismus der PC der betrachteten PAD-Patienten anzunehmen, ist mit Sicherheit die Gewebsspezifität auf Plasmazellen. Natürlich stellen PC professionell sekretorische Zellen dar, die durch ihre ER-Expansion (Wiest et al., 1990, Cenci und Sitia, 2007) und konkomitante Hochregulation des ER-Translokase-Komplexes (Cenci und Sitia, 2007) für krankheitsverursachende Mutationen in *SEC61A1* prädisponiert sind. Allerdings beschränkt sich diese Tatsache nicht auf PC und könnte für alle professionell sekretorischen Zelltypen gefordert werden. Interessant zu beobachten ist, dass sich diese Gewebsspezifität der Pathologien auch auf die ADTKD übertragen lässt. Auch dort scheint die Sec61-Mutation spezifisch zu Funktionsstörungen in der Niere zu führen (Bolar et al., 2016). Zudem weisen weder die Patienten mit Sec61 α (V85D)-Mutation, noch die ADTKD-assoziierten Sec61 α 1-Mutationen Veränderungen der Glukose-Homöostase auf, wie es bei den homozygoten *Sec61 α 1^{Y344H/Y344H}* Mäusen der Fall ist (Lloyd et al., 2010, Bolar et al., 2016, Schubert et al., 2018). Ein Grund könnten gewebsspezifische Expressionsmuster von Sec61 α 2 in Kombination mit gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren sein, die zur Kompensation benutzt werden. Sec61 α 2 besitzt 95 % Sequenzidentität zu Sec61 α 1 und ist noch weitestgehend unerforscht. Die transgene Rettung der Sec61 α 1-Depletion war mit Sec61 α 2 nicht möglich. Entweder weil es in HeLa-Zellen nur zu einem sehr geringen Maße

exprimiert wird, oder weil die beiden Proteine keine Funktionshomologe darstellen (Lang et al., 2012). Aufschluss geben könnte der Vergleich der Sec61 α -Level mittels qRT-PCR in gesunden und erkrankten Geweben. Die Gewebsspezifität kann auch eine Folge der verschiedenen Bedürfnisse der sekretorischen Zellen an die UPR sein, die eng mit Sec61 α in Verbindung steht (Moore und Hollien, 2012, Plumb et al., 2015, Sundaram et al., 2017). So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass PC strikt abhängig von XBP-1 und IRE1 sind, was auf das Überleben pankreatischer β -Zellen nicht zutrifft (Lee et al., 2005, Iwakoshi et al., 2007, Iwawaki et al., 2010, Moore und Hollien, 2012). Umgekehrt scheint es für PERK zu sein (Harding et al., 2001, Zhang et al., 2002, Zhang et al., 2005, Gass et al., 2008).

Mit die größte Herausforderung der Erforschung von Erkrankungen ist neben der Aufklärung der Fehlregulation auf zellulärer Ebene zu versuchen die gestörte zelluläre Homöostase eventuell pharmakologisch abzuschwächen oder aufzuheben. Im Zusammenhang mit der PAD-assoziierten Sec61 α (V85D)-Mutation wurden im Laufe dieses Kapitels Indizien dafür gesammelt, dass die Mutation das Protein dahingehend verändert, dass es in seinem proteostatischen Netzwerk anders positioniert ist als der Wt. Letzteres ist eine häufige Ursache von Krankheiten, die zu fehlender Proteinstabilität, Aggregation, Fehllokalisierung, etc. führen (Balch et al., 2008, Mohamed et al., 2017). Um an diesem Punkt anzugreifen entstand die Idee der pharmakologischen Chaperone und Proteostase-Regulatoren (Powers et al., 2009). Als Beispiel sollen hier lysosomale Speicherkrankheiten (LSD, engl. „lysosomal storage diseases“) angeführt werden, bei denen ein mutationsbedingter enzymatischer Verlust der lysosomalen Enzyme krankheitsverursachend ist (Grayson, 2016). Die Folge sind z.B. geringere Proteinhalbwertszeiten, -degradation oder -aggregation (Mohamed et al., 2017). Die Therapie mit pharmazeutischen Chaperonen und Proteostase-Regulatoren zielt darauf die Enzymaktivität zu steigern, indem entweder das mutierte Enzym gebunden wird, oder indem Komponenten des proteostatischen Wegs dahingehend manipuliert werden, dass sie die Stabilität, Faltung und den Transport des mutierten Enzyms kompensieren (Fan et al., 1999, Sawkar et al., 2002, Grabowski, 2008, Mohamed et al., 2017). In zwei weiteren Pathologien wurde ein chemisches Chaperon (Natriumphanylbutyrat) eingesetzt, um den krankheitsverursachenden ER-Stress im Zusammenhang mit β -Zelltod und primärem Offenwinkelglaukom zu mildern (Xiao et al., 2011, Zode et al., 2011, Pan-Hammarstrom et al., 2018). Interessant in Hinblick auf die Sec61 α (V85D)-verursachte PAD ist die Tatsache, dass auch eine gestörte Ca²⁺-Homöostase im Zusammenhang mit den LSDs (Mu et al., 2008) mit diesen Verbindungen abgeschwächt werden kann, indem die ER-Ca²⁺-Konzentration und somit die Aktivität der dort vorhandenen Chaperone wie BiP wiederhergestellt wird

(Tartaglione et al., 1982, Powers et al., 2009, Wang et al., 2011, Mohamed et al., 2017). Somit geben pharmakologische Chaperone Grund zur Annahme, dass auch zukünftig noch mehr dieser mutationsverursachten Proteindefekte durch Unterstützung der zelleigenen Regulationsmechanismen wie gezielter UPR (Plate et al., 2016) erfolgreich behandelt werden können.

5.2. Identifikation von SLC35B1 als ATP_{ER}-Carrier und Modell der physiologischen Bedeutung des Sec61-vermittelten Ca²⁺-Leckstroms für die Energieversorgung des ER

Die Energieabhängigkeit des ER in Form von ATP ist durch seine multifunktionelle Bedeutung für die Zellphysiologie bedingt. ATP wird hauptsächlich für ER-residente Chaperone benötigt, die eine Rolle im Proteintransport über die ER-Membran spielen (Schatz und Dobberstein, 1996, Lyman und Schekman, 1997, Tyedmers et al., 2003) und essentiell für die Faltungshomöostase des ER sind (Pfeffer und Rothman, 1987, Kaufman, 2002, Schroder und Kaufman, 2005b). Weiterhin sind sowohl die Glykosylierung, als auch die Phosphorylierung von Proteinen, Proteoglykanen und Lipiden auf ATP angewiesen (Braakman et al., 1992, Hirschberg et al., 1998), genau wie im weiteren sekretorischen Weg der Zelle der Proteintransport zwischen ER und Golgi (Brandizzi et al., 2002). Der Haupt-ATP-Konsument des ER ist das Hsp70-Chaperon BiP, weshalb die Co-Expression mit BiP in humanen Geweben die zugrundeliegende Rationale auf der *in silico* Suche eines Kandidaten für den ATP/ADP-Austauscher war (siehe Kapitel 4.2.1). Dass diese Annahme ein valides Kriterium ist, zeigen Studien in *A. thaliana*, für die ein ER-ATP-Transporter charakterisiert wurde, ER-ANT1 (Leroch et al., 2008). In der Pflanze zeigen Gewebe, die sekretorisch hoch aktiv sind wie Pollen, Wurzelspitzen, apikales Meristem und Samen hohe Expressionsaktivitäten von ER-ANT1, die denen von BiP in den entsprechenden Geweben ähneln (Buzeli et al., 2002, Leroch et al., 2008). Die *in silico*-Analyse ergab SLC35B1 (UGTrel1) als Kandidaten, dessen Funktion bislang als die eines Nukleotidzucker-Transporters beschrieben ist (Nakanishi et al., 2001, Reyes et al., 2006, Dejima et al., 2009). Die Interpretationen der erhaltenen Ergebnisse in den folgenden Kapiteln werden deshalb alle mit der zugrundeliegenden Hypothese betrachtet, dass es sich bei SLC35B1 um einen ATP-Transporter der ER-Membran handelt.

5.2.1. Interpretationen zu den verschiedenen SLC35B1-Isoformen

Mittels Immunoblot konnte von SLC35B1 *in vivo* lediglich die Isoform 2 in einem Membranproteinextrakt aus rER-Mikrosomen des Hundepankreas nach hoher Anreicherung der Membranproteine nachgewiesen werden (Abbildung 4.11), was darauf hindeutet, dass SLC35B1 (18 nM) kein sehr abundantes Protein der ER-Membran darstellt. Letzteres passt zu den HeLa-Proteomdaten von Hein et al., in denen SLC35B1 im Vergleich zu beispielsweise Sec61 α (139 nM) oder BiP (8250 nM) unterrepräsentiert ist (Hein et al., 2015). Selbst der Versuch der Proteinanreicherung von SLC35B1 in HeLa-Zellen nach Tu-induziertem ER-Stress (mRNA induziert, vgl. Abbildung 4.12) führte nicht zu einer Induktion von SLC35B1, die die Proteinnachweisgrenze des verwendeten Antikörpers überschritt (nicht gezeigt). Dennoch muss die geringe Abundanz von SLC35B1 nicht im Widerspruch zu seiner bedeutenden zellphysiologischen Funktion stehen, da Proteine mit fundamentalen regulatorischen Funktionen wie Zellproliferation, Migration und Zelldifferenzierung auch häufig in geringeren Abundanzen vorliegen (Beck et al., 2011, Schwanhauser et al., 2011).

Die N-terminal verlängerte Isoform 2 von SLC35B1 enthält zwei phosphorylierbare Serine, weshalb sich die Frage stellte, ob der ATP_{ER}-Transport mit Hilfe dieser häufigen Modifikation reguliert werden könnte, wie es beispielsweise für ABC (engl. „ATP binding cassette“-)Transporter (Stolarczyk et al., 2011, Underwood und Somerville, 2017), aber auch für den mitochondrialen AAC der Fall ist. Bei letzterem spielt die Phosphorylierung der Tyrosin-Leiter eine wichtige Rolle in der Transition zwischen den beiden Konformationen des Carriers während des Transportzyklus (Feng et al., 2010). Aus diesem Grund wurden Punktmutationen von SLC35B1-Iso2 erzeugt, in denen die beiden Serine zu Aspartaten ausgetauscht wurden, was einen phosphomimetischen Effekt erzeugen sollte. Mit Hilfe der Expression dieser SLC35B1-Variante wurden *in vitro* Transportversuche in *E. coli* durchgeführt, die zu mit Isoform 2 vergleichbaren Transportraten führten (Klein et al., 2018), weshalb es vorläufig keine Hinweise auf einen funktionellen Einfluss der Phosphorylierung auf die ATP-Transportfunktion von SLC35B1 gibt.

5.2.2. Interpretationen der Auswirkung der SLC35B1-Depletion auf die HeLa-Zellphysiologie

5.2.2.1. Proliferation, Vitalität und Apoptose

Im Rahmen der Funktionssuche des wenig charakterisierten Proteins SLC35B1 sollten unter Verwendung eines siRNA-vermittelten Ansatzes zur Depletion des Proteins die

Auswirkungen für die Zellphysiologie der verwendeten HeLa-Zellen beobachtet werden. Dabei konnte die Effizienz der SLC35B1-siRNAs mit Hilfe der qRT-PCR auf der Ebene der mRNA verifiziert werden. Dabei zeigte sich eine bessere Effizienz der SLC35B1-UTR#1 siRNA im Vergleich zur SLC35B1#4 siRNA. Die Effizienz der Depletion konnte auf Proteinebene nur nachgewiesen werden, wenn SLC35B1 transgen überexprimiert wurde, was auf eine geringe Abundanz in HeLa-Zellen schließen lässt. Hinweise darauf geben auch proteomische Analysen der HeLa-Zellen (Hein et al., 2015) (siehe Kapitel 5.2.1). Zur Bestimmung der Proliferation und der Vitalität SLC35B1-depletierter Zellen wurden zum einen Lebendzellzahlen nach 96 h siRNA-vermittelter Depletion bestimmt und zum anderen das Wachstum mittels xCELLigence in Echtzeit verfolgt. Dabei wurde deutlich, dass die Depletion von SLC35B1 zu einem deutlich reduzierten Überleben der Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen führte. Zwar bedingte die Depletion von SLC35B1 nicht einen vergleichbar drastischen Rückgang der Proliferation wie die Depletion von BiP, das essentiell für die ER-Funktion ist (Gething und Sambrook, 1990, Braakman et al., 1992, Dorner und Kaufman, 1994, Csala et al., 2007), dennoch hatte sie einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation und auch die Lebendzellzahl nach 96 h siRNA-Behandlung war stark beeinträchtigt (Abbildung 4.14). Dabei waren die mit der siRNA #1-UTR transfizierten Zellen, die die mRNA effizienter depletierte auch stärker in ihrem Wachstum beeinträchtigt. An dieser Stelle sei auf die Limitierung hingewiesen, dass die Effizienz des siRNA-Knockdown nicht auf Proteinebene validiert werden konnte, weshalb die Halbwertszeit des Proteins verborgen bleibt und die Restproteinmenge einen drastischeren Effekt auf die Vitalität maskieren könnte. Versuche zur Bestimmung der Apoptose zeigten nach 96 h, dass die SLC35B1-siRNA-behandelten Zellen eine um ca. 2,5-fach erhöhte Apoptoserate aufwiesen als Kontrollzellen (Abbildung 4.17, A.), was die Beobachtungen der Zellproliferation der HeLa-Zellen widerspiegelt. Dennoch konnte keine Aussage darüber getroffen werden zu welchem Zeitpunkt der 96 h-Behandlung es zu der Verschiebung in Richtung Apoptose kam (Abbildung 4.17, C), da spätestens 30 h nach Addition des Apoptose-Detektionsreagenzes (77 h Gesamtexperimentdauer) das Signal die Linearität verließ, was wohl auf ein Absterben der Zellen oder ein Erreichen der Konfluenz zurückzuführen ist. Bemerkenswert sollte jedoch, dass sich die Apoptose-Kinetik der beiden SLC35B1-siRNAs dahingehend unterschied, dass die effizientere UTR#1 siRNA bereits nach 48 h zu einer erhöhten Apoptose führte, wohingegen es bei der #4 siRNA erst nach 48 h begann anzusteigen. Nachdenken sollte man aus diesem Grund über die Generierung einer stabilen SLC35B1-KO-Zelllinie, die auch Aufschlüsse darüber geben kann, ob SLC35B1 essentiell für

das Überleben der Zellen ist. In der Pflanze *A. thaliana* führt der KO des potentiellen Funktionshomologs von SLC35B1, ER-ANT1, zu massiv eingeschränktem Wachstum, vermutlich durch Entwicklungsstörungen der Wurzel, die für die Durchdringung des Bodens auf den sekretorischen Weg zur Sekretion der pektischen Polysaccharidschleimhaut angewiesen sind (Vicre et al., 2005, Leroch et al., 2008). Auch in *O. sativa* führte die Defizienz von ER-ANT1 zur Letalität der Setzlinge (Zhang et al., 2016). Betrachtet man die Orthologe von SLC35B1, besitzt *hut1* der Hefe keine Auswirkungen auf die Wachstumsraten, was sich beim Fadenwurm *C. elegans* jedoch anders darstellt (Nakanishi et al., 2001, Dejima et al., 2009). Hier sind homozygote Tiere stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt oder gar letal. Transgene Rettungsexperimente gelangen mit dem Säuger SLC35B1, nicht jedoch mit dem Hefe *hut1*, was auf eine konservierte Funktion von SLC35B1 in Metazoen hindeutet (Dejima et al., 2009).

Wegen der bereits diskutierten Bedeutung des ER-ATP-Transports auf die Funktionen der ER-Homöostase wird im folgenden Kapitel auf die Interpretation der Befunde der SLC35B1-Depletion im Zusammenhang mit ER-Stress eingegangen.

5.2.2.2. SLC35B1-Depletion und ER-Stress

SLC35B1-depletierte HeLa-Zellen weisen eine erhöhte mRNA von *DDIT3* (CHOP), sowie gering erhöhte *HSPA5* (BiP)-mRNA auf (Abbildung 4.18), was auf erhöhten ER-Stress und Induktion der UPR bzw. beginnende Apoptose (CHOP) hindeuten kann (vgl. Kapitel 5.2.2.1.). Dies könnte eine direkte Konsequenz der geringeren ATP-Verfügbarkeit im ER sein, von der viele Prozesse abhängig sind. BiP ist das Hsp70-Chaperon des ER-Lumens und bindet an exponierte hydrophobe Oligopeptide seiner Substrate, meist un-gefaltete Proteine, die im Rahmen des ATPase-Zyklus gefaltet werden (Flynn et al., 1991, Blond-Elguindi et al., 1993, Dudek et al., 2009, Mayer, 2013) (siehe Kapitel 2.2.2.1). Deshalb spielt BiP eine entscheidende Rolle in der gezielten Degradation von Proteinen innerhalb des ERAD-Wegs (Knittler et al., 1995, Stolz und Wolf, 2010), aber auch während der Initiationsphase der UPR, da BiP an den lumenalen Domänen der 3 Sensormoleküle der UPR bindet und die UPR-Wege inaktiviert, solange die Faltungs-Homöostase im ER-Lumen besteht (siehe Kapitel 2.3.5.2). Konkret wird z.B. für die BiP-Bindung an monomeres, inaktives IRE1 ein J-Protein (ERj4)-getriggertes ATP-abhängiges Bindungszyklus vorgeschlagen, der die Bedeutung für ATP-gebundenes BiP unterstreicht (Amin-Wetzel et al., 2017). Darüber hinaus reicht der Einfluss der BiP-Funktion auch in die Ca^{2+} -Homöostase hinein, da der Sec61-vermittelte Ca^{2+} -Leckstrom auf lumenaler Seite mittels BiP limitiert wird, wobei sich hierbei ERj3 und ERj6 als die beteiligten Hsp40-Co-Chaperone

herausgestellt haben (Schäuble et al., 2012, Schorr et al., 2015). Im Falle der SLC35B1-Depletion scheinen die Zellen aktives UPR-„signaling“ zu betreiben, was sich an der Induktion von *HSPA5* zeigt, da weniger ATP im ER zur Verfügung steht, um produktiv Substrate zu falten. Dies ist auch vor dem Hintergrund interessant, dass freies, aktives BiP, das zur Monomerisierung von IRE1 benutzt werden kann, im ER limitiert ist (Amin-Wetzel et al., 2017), da ein Großteil von BiP Substrat-gebunden, in inaktiven BiP-Oligomeren oder durch AMPylierung inaktiviert vorliegt (Freiden et al., 1992, Preissler et al., 2015a, Preissler et al., 2015b). Dass die Inaktivierung eines ER-ATP-Transporters zu ER-Stress und UPR führt, zeigen Experimente mit inaktiviertem ER-ANT1 in *O. sativa*. Es kam zur Hochregulation von BiP, Grp94, PDI und weiterhin von Sec61, Calnexin, Calreticulin, STT3, Ribophorin I und II (Zhang et al., 2016). Jedoch kehrten sich die Abundanzen der verschiedenen mRNAs in einem späteren Entwicklungsstadium um, was die Autoren mit prolongiertem ER-Stress erklärten (Zhang et al., 2016). Prolongierter ER-Stress führt zur Aktivierung des sog. RIDD-Pathways, der durch die RNase-Aktivität von *OsIRE1* vermittelt wird und zu einer globalen Herunterregulation von Genen führt, im Gegensatz zum Spleißen von *OsZIP50* während dem UPR-„signaling“ (Hollien und Weissman, 2006, Wakasa et al., 2012, Mishiba et al., 2013). Hierzu passen eventuell auch die Befunde von Leroch et al., die zeigten, dass die fehlende Energieversorgung des ER in ER-ANT1-KO-Zellen dazu führt, dass die mRNA von BiP1-3 und Calreticulin1 und 2 herunterreguliert wird (Leroch et al., 2008).

Auffallend ist, dass HUT1, das *C. elegans*-Homolog von SLC35B1 ebenfalls zu chronischem ER-Stress führt und auch eine genetische Interaktion mit *atf-6*, *pek-1* und *ire-1* aufweist, was die UPR-Orthologe sind (Dejima et al., 2009). Und auch für das Hefe-Ortholog Hut-1 ist eine Rolle in der ER-Faltungshomöostase beschrieben (Nakanishi et al., 2001).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass SLC35B1 selbst ein UPR-Zielgen zu sein scheint, worauf die Induktion von Glykosylierungsdefekten mittels Tu-Behandlung hindeutet (Abbildung 4.12). Diese Stressinduktion von SLC35B1 ist in vielen Organismen beschrieben, wie *A. thaliana* (Martinez und Chrispeels, 2003, Kamauchi et al., 2005), *C.elegans* (Shen et al., 2005), MEFs (engl. „mouse embryonic fibroblasts“) (Harding et al., 2003) und in humanen Zellen (Murray et al., 2004). Die Hochregulation des ATP-Transporters erscheint vor dem erhöhten Energiebedürfnis innerhalb des ER sinnvoll, da ER-residenten Chaperone, allen voran BiP, mit einem erhöhtem Substrataufkommen konfrontiert werden. Daneben existiert über BiP auch eine Schnittstelle zur Ca^{2+} -Homöostase, da der Sec61-vermittelte Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER durch BiP, unter Beteiligung der Hsp40-Co-

Chaperone ERj3 und ERj6 auf lumenaler Seite reguliert wird (Schauble et al., 2012, Schorr et al., 2015). In semiquantitativen Western Blots der SLC35B1-depletierten Zellen zeichnete sich tendenziell eine leichte Erhöhung von BiP und ERj3 ab, was den Nexus zur Ca^{2+} -Homöostase in Hinblick auf die Ca^{2+} -Leckregulation unterstreichen kann. Interessant ist weiterhin, dass gerade diese beiden Chaperone in der Nähe des Translokons agieren (Hamman et al., 1998, Guo und Snapp, 2013) und Chaperone der Klasse I sind, was bedeutet, dass sie multiple Bindestellen ihrer Substrate erkennen und faltungsaffin sind, im Gegensatz zu Chaperonen der Klasse II (Grp170, ERj4, ERj5), die spezifisch Aggregations-gefährdete Sequenzen erkennen und deshalb degradationsaffin sind (Behnke et al., 2016).

5.2.2.3. ER-Morphologie mittels EM-Aufnahmen und 3D-SIM von SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen

Um potentielle Auswirkungen der SLC35B1-Depletion auf die Zell- und ER-Morphologie der HeLa-Zellen zu analysieren, wurden sowohl EM-Aufnahmen angefertigt, als auch fluoreszenzbasiert Sec62-gekoppelte Alexa594-Signale in einer hochauflösenden 3D-SIM-Mikroskopie mit Kontrollzellen verglichen (Abbildung 4.16). Dabei waren keine offensichtlichen Auswirkungen der Depletion des putativen ATP-Transporters auf morphologische Aspekte detektierbar. Im Gegensatz dazu hatte das SLC35B1-Ortholog in *C. elegans* einen Einfluss auf die Morphologie: Darm-Querschnitte wiesen im Wt längliche und flache Vesikel auf, wobei es sich vermutlich um ER handelte, das sich in der *hut-1*-Depletion jedoch als runde Vesikel darstellte. Die Epidermis hingegen wies keinen Unterschied auf, weshalb sich die Frage nach einer gewebespezifischen Bedeutung der *hut-1*-Depletion stellt (Dejima et al., 2009). Konfokale Mikroskopie zeigte darüber hinaus eindeutig veränderte Muster in der ER-Kolokalisation von EGFP::HUT1 mit dem ER-Marker, da das retikuläre Netzwerk, das im wildtypischen Tieren beobachtet werden kann, in *hut-1*-depletierten zu dünnen Strängen agglutiniert war (Dejima et al., 2009). Nichts dergleichen wurde in den HeLa-Zellen epithelialen Ursprungs beobachtet (Abbildung 4.16).

Unterstützend wurden Western Blots von Komponenten der mitochondrialen ATP-Synthesemaschinerie angefertigt, um eine mögliche regulatorische Rückkopplung als Folge der gestörten ATP-Homöostase im ER nach SLC35B1-Depletion zu detektieren, wobei sich keine Veränderungen im Gesamtproteingehalt einzelner Komplexuntereinheiten der Elektronentransportkette ergaben (Abbildung 4.15). Die Frage, die sich für die morphologische Darstellung SLC35B1-depletierter Zellen stellt, ist, ob sich eventuell durch digitale Auswertungen mehr Informationen aus den EM-Aufnahmen herauslesen lassen. Es wäre sicher interessant die Abstände zwischen ER und Mitochondrien zu vermessen bzw.

Kontaktflächen in einer Art zu quantifizieren wie es auch für die Ribosomenbesetzung der ER-Membranen in Sec61-depletierten Zellen angestrengt wurde (Lang et al., 2012). Dies ist nicht nur eine relevante Frage im Vergleich zwischen SLC35B1-depletierten und Kontrollzellen, sondern auch zwischen Geweben, die professionell sekretorisch sind (Wiest et al., 1990, Cenci und Sitia, 2007) oder auch zwischen Krebszelllinien (Warburg, 1956a, Vander Heiden et al., 2009, Liberti und Locasale, 2016a) und gesunden Geweben. Dies alles involviert verschiedene Aspekte der Energiehomöostase in Verbindung mit der ER-Homöostase, worin die Rolle des ER-ATP-Transporters noch weitgehend unerforscht ist. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei MAMs um Abstände zwischen ER-Membran und Mitochondrium zwischen 10 und 30 nm handelt (Csordas et al., 2006, Wang et al., 2015, Giacomello und Pellegrini, 2016) und so die Quantifizierung der Abstände auf bildgebende Methoden beschränkt ist, die diesen Abstand auch auflösen können (Helle et al., 2013, Paillusson et al., 2016).

5.2.3. Funktionelle Charakterisierung von SLC35B1 als ATP/ADP-Austauscher der ER-Membran

5.2.3.1. Lokalisation von SLC35B1 in der ER-Membran und sein Interaktom

Das GFP-getaggte SLC35B1 wurde mit Hilfe der hochauflösenden 3D-SIM-Mikroskopie in HeLa-Zellen dargestellt, wobei sich eine Kolo-kalisation mit den Sec62-gekoppelten Alexa594-Signalen ergab, was für eine ER-Lokalisation von SLC35B1 spricht, das Sec62 als Teil der ER-Translokasemaschinerie ein ER-Membranprotein darstellt (Abbildung 4.19). Zudem wurde eine MS immunpräzipitierter Proteine nach Expression der beiden SLC35B1-Isoformen durchgeführt (Abbildung 4.20), wobei 52 % der 50 Proteine mit höchster Identifikationsabundanz ER-residente Proteine waren, womit das Interaktom von SLC35B1 ebenfalls auf eine Lokalisierung von SLC35B1 im ER schließen lässt. Dafür spricht auch, dass *hut-1*, das *C.elegans* Ortholog von SLC35B1 hauptsächlich im ER, aber auch teilweise im Golgi und potentiell im ERGIC lokalisiert ist (Dejima et al., 2009). Dabei könnte es sich aber auch um transiente Aufenthaltsorte von SLC35B1 handeln, da es ein ER-Retentionssignal enthält, das die Rückführung zum ER sicherstellt (Abbildung 4.11).

Weiterhin interessant ist, dass sich auch ein beträchtlicher Anteil (38 %) bekannter MAM-assoziiierter Proteine am SLC35B1-Gesamtinteraktom ergibt, was anknüpfend an zuvor beschriebene Überlegungen eine Relevanz für die funktionelle Interaktion zwischen dem ATP-Transporter, dem ATP-Vorrat aus Mitochondrium/Cytosol und der Energiehomöostase

des ER besitzen kann. Zur tiefergehenden Interpretation der erhaltenen Ergebnisse aus der MS, wurden die ersten 50 Treffer *in silico* mit String 10 (Szklarczyk et al., 2015) auf eine funktionelle Assoziation hin untersucht (Abbildung 5.1).

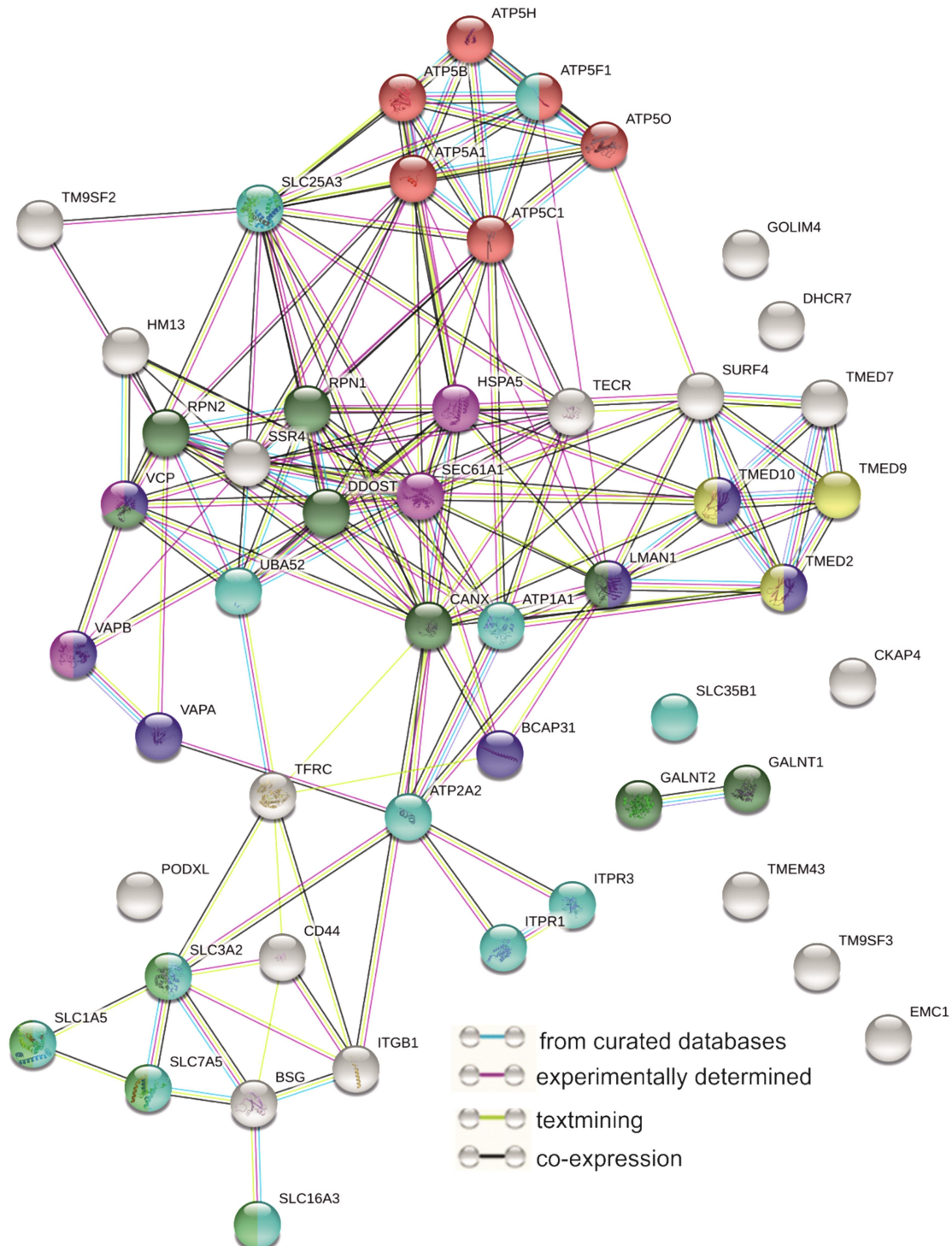









Abbildung 5.1: *In silico*-Analyse des SLC35B1-Interaktoms. String10 untersucht die funktionelle Assoziation, d.h. die produktive und spezifische Beziehung zwischen Proteinen, die wahrscheinlich zu einem biologischen Zweck zusammengeführt werden (Szklarczyk et al., 2015). Die Interaktionen entspringen verschiedenen Quellen, wie in der Legende angegeben. Bekannte Interaktionen sind „from

curated databases (blaue Linien)“ und „experimentally determined (violette Linien)“, „textmining (gelbe Linien)“ zeigt statistische oder semantische Verbindungen zwischen Proteinen, basierend auf Medline Abstracts und einer großen Kollektion von Volltext-Artikeln (Szklarczyk et al., 2015) und „co-expression (schwarze Linien)“ ist ein Hinweis für funktionelle Assoziationen (Szklarczyk et al., 2015).

Die String10-Analyse des eingegeben Netzwerkes ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an Interaktionen untereinander (PPI enrichment p-value: < 1.0e-16), verglichen mit einem zufällig ausgewählten Set von Proteinen ähnlicher Größe aus dem Genom, was für eine zumindest teilweise biologische Verbindung der eingegebenen Proteine spricht. Die funktionellen Anreicherungen sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst (Helle et al., 2013, Filadi et al., 2017a).

Tabelle 5.2: Funktionelle Anreicherungen aus dem SLC35B1-Netzwerk basierend auf mit transgen exprimierten SLC35B1 immunopräzipitierten Interaktionspartnern (GO = engl. „gene ontology“)

Farbkodierung in Abbildung 5.1	GO Biologischer Prozess	Anzahl
	Transmembrantransport	12
	Proteinglykosylierung	9
	ER zu Golgi Vesikel vermittelter Transport	7
	mitochondriale ATP-Synthese gekoppelter Protonentransport	6
	ER UPR	4
	organische Säuren Transmembrantransport	4
	Vesikeltargeting zu, vom oder im Golgi	3

Im SLC35B1-Netzwerk sind Prozesse überrepräsentiert, die den Transmembrantransport betreffen, ER-assoziierte Prozesse (z.B. Proteinglykosylierung, UPR), Vesikeltargeting, sowie die mitochondriale ATP-Synthese. Dies alles passt zu der putativen ATP-Transportfunktion von SLC35B1 in der ER-Membran und ist eine gute Grundlage zur Diskussion des regulatorischen Netzwerkes eines solchen ATP_{ER}-Transports. Wie bereits erwähnt sind viele MAM-lokalisierte Proteine unter den gefundenen des SLC35B1-Interaktoms, wie IP3R und Untereinheiten der ATP-Synthase (Poston et al., 2013), weshalb sich die Frage stellt, ob SLC35B1 auch in diesem subzellulären Kompartiment vorhanden ist. Plausibel wäre dies vor allem vor dem Hintergrund, dass MAMs wichtige Schnittstellen darstellen, die die ER-Homöostase, vor allem unter Verwendung von Ca²⁺ als „second messenger“ an beispielsweise die ATP-Produktion oder Apoptose-Induktion im Mitochondrium koppeln (Helle et al., 2013,

Filadi et al., 2017c). Zwar wurde SLC35B1 in bislang keiner der Studien (Zhang et al., 2011, Poston et al., 2013) als MAM-assoziiertes Protein charakterisiert, was aber auf eine Gewebespezifität der Expression oder die geringe Abundanz rückzuführen sein kann. Weiterhin sei zu bedenken, dass manche Zelltypen, darunter auch HeLa-Zellen ihre Energie vornehmlich aus der im Cytosol stattfindenden Glykolyse gewinnen (Lu et al., 2002, Mathupala et al., 2010, Vishnu et al., 2014). Deshalb ist ein Modell vorstellbar, indem es zwei SLC35B1-Populationen gibt, eine MAM-assoziierte, die die Brücke zur oxidativen Phosphorylierung schlägt, und eine weitere, die außerhalb der MAMs vorkommt, den Import von ATP aus dem Cytosol vermittelt und beispielsweise mit Sec61 α assoziiert vorliegt. Auffallend ist nämlich, dass sowohl Sec61 α , als auch BiP (HSPA5) sehr dominante Knotenpunkte innerhalb des SLC35B1-Interaktoms darstellen, was sehr gut zu den in Kapitel 5.2.4.1 diskutierten Ergebnissen zum funktionellen Einfluss von Sec61 und BiP auf SLC35B1 passt.

Um die Bedeutung der MAMs für den SLC35B1-vermittelten ATP-Transport zu analysieren, könnte man sich deshalb artifizieller Ankerproteine bedienen, die zuvor bereits benutzt wurden, um zu zeigen, dass eine erhöhte Verbindung zwischen ER und Mitochondrien zu vermehrtem Ca²⁺-Austausch zwischen den beiden Organellen führt (Csordas et al., 2006). Weiterhin wurden artifizielle Anker konzipiert, die mit Ca²⁺-Biosensoren fusioniert waren, um die lokale Ca²⁺-Konzentration in den MAMs zu bestimmen (Csordas et al., 2010). Zukünftig könnte man ähnliche Verfahren mit ATP-Sensoren nutzen, um in Abhängigkeit der Anwesenheit von SLC35B1 und in Abhängigkeit des verwendeten Zelltyps (OXPHOS vs. Warburg) Aufschlüsse über die Bedeutung der Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrien zu erlangen und die Frage nach verschiedenen ATP-Eintrittsstellen in das ER zu beantworten.

5.2.3.2. Direkte ATP-Messungen zur funktionellen Analyse von SLC35B1

Charakterisierung von SLC35B1 als ein ATP/ADP-Antiporter

In vitro Transportversuche mit radioaktiv markierten Adeninnukleotiden ergaben für heterolog exprimiertes SLC35B1 in *E. coli* eine spezifische Importaktivität für ATP und ADP (Abbildung 4.24.). Diese beiden Substrate waren auch die einzigen, die in der Lage waren radioaktiv markiertes ATP als Transportsubstrat zu verdrängen, was für eine Substratspezifität für ADP und ATP spricht (Tabelle 4.2). Mittels Substratsättigung in Verbindung mit Eadie-Hofstee-Analysen konnten so K_M und V_{max} -Werte ermittelt werden, die für die Isoformen 1 und 2 sehr ähnlich waren (K_M ATP 32,6-34,7 μ M und V_{max} 871-905 mg protein⁻¹ h⁻¹ (Klein et al., 2018, Supplement). Lediglich die dritte Isoform, die N-terminal um 78 Aminosäuren,

inklusive zweier N-terminaler TMD trunkiert ist, wies eine deutlich verringerte Transportaktivität von ATP auf (Abbildung 4.24.).

Diese Transportversuche mit radioaktivem ATP wurden darüber hinaus auch in Proteoliposomen durchgeführt, in die Säuger ER-Proteine integriert wurden (Hunde-ER K_M 32,6-40,1 μ M, Schweine-ER 94,3-104 μ M (Klein et al., 2018, Supplement)). Dabei ähneln die ATP-Affinitäten des Transports in den Proteoliposomen sehr dem von SLC35B1 (Isoform 1 und 2). Frühere Versuche mit rauen ER-Vesikeln aus Rattenleber und Hundepankreas zeigen eine höhere Affinität für ATP (K_M 3-4 μ M Clairmont et al., 1992 und K_M 1,5 μ M Shin et al., 2000), genau wie Versuche mit Hefe ER-Vesikeln (K_M 10,1 μ M Mayinger und Meyer, 1993). Diese Unterschiede sind entweder auf unterschiedliche ER-ATP-Transporter zurückzuführen, oder, was wahrscheinlicher ist, auf unterschiedliche Qualitäten und Zusammensetzungen der Proteoliposomen, was auch die Anwesenheit von allosterischen Regulatoren miteinschließen kann, als Folge der Rekonstitutionsmethoden, die auch bereits zuvor als limitierend beschrieben wurden (Guillen und Hirschberg, 1995, Shin et al., 2000). Interessant wären deshalb Transportstudien mit Proteoliposomen, die mit ER-Proteinen aus *SLC35B1*-exprimierenden HeLa-Zellen rekonstituiert werden (Klein et al., 2018).

Weiterhin wurden Versuche durchgeführt, die den Modus des ATP-Transports aufklären sollten. Hierzu wurde zum einen der Efflux von importiertem radioaktiv gelabelten ATP in SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen durch einen Überschuss an ungelabeltem ATP aus den Zellen induziert (Abbildung 4.25). Und zum anderen wurden Proteoliposomen, die solubilisierte Membranproteine der heterolog *SLC35B1*- oder *SLC35B1-Iso2*-exprimierenden *E. coli*-Zellen enthielten, zunächst mit ATP und ADP vorgeladen. Anschließend wurde der Import von radioaktivem ATP oder ADP in die Proteoliposomen verfolgt. Beide Methoden detektierten einen strikten ADP/ATP-Antiport-Mechanismus, der von SLC35B1 vermittelt wird. Dieser Antiport-Mechanismus von ATP und ADP entspricht ebenfalls dem Transportmodus, der in früheren Hefe- und Säuger-Proteoliposomen identifiziert wurde (Clairmont et al., 1992, Mayinger et al., 1995, Shin et al., 2000). Auch aus anderen Organellen sind ähnliche Antiport-Mechanismen bekannt. So wurde für den ATP-Transport in das Lumen des Golgi-Apparats in Rattenlebern ein gleichzeitiger Export von AMP beobachtet (Capasso et al., 1989). Ebenfalls ein ATP/AMP-Antiport scheint für den peroxisomalen Transporter Ant1p in Hefe zu gelten (Visser et al., 2002). Der prominenteste Nukleotid-Austauscher ist jedoch sicherlich der ADP/ATP-Austauscher der mitochondrialen Membran, AAC (siehe Einleitung, Kapitel 2.4.2.1, Klingenberg, 2008), zu dem SLC35B1 eine funktionelle Ähnlichkeit aufweist. Beide Austauscher weisen eine hohe Substratspezifität auf

(vgl. Tabelle 4.2) (Pfaff und Klingenberg, 1968, Duce und Vignais, 1969, Klingenberg, 2008) und auch die Tatsache, dass Mg^{2+} -Nukleotidkomplexe von AAC, wahrscheinlich strukturell durch ein positives Cluster, als Transportsubstrate ausgeschlossen werden (Pfaff und Klingenberg, 1968, Pfaff et al., 1969, Klingenberg, 2008), scheint sich in SLC35B1 wiederzufinden (Abbildung 5.2). EDTA als Kationenkomplexierer besitzt nämlich weder einen Einfluss auf heterolog exprimiertes SLC35B1, noch auf den Transport der mit Säuger-ER rekonstituierten Proteoliposomen (Klein et al., 2018, Tabelle 4.2). Strukturelle Hinweise darauf ergibt das SLC35B1-“Modelling” auf die Röntgenstruktur des *SnYddg*-Transporters von *Starkeya novella* (Tsuchiya et al., 2016), wobei 2 positive Cluster jeweils auf lumenaler und cytosolischer Seite der 5. TMD auffallen, die die zuvor beschriebene Funktion der Mg^{2+} -Exklusion ausüben könnten (rote Markierung in Abbildung 5.2). Vorstellbar ist ein dem AAC ähnlicher Mechanismus, bei dem alternierend die Substratbindetasche für ADP bzw. ATP dem Cytosol bzw. ER zugewandt werden (Klein et al., 2018).

Als treibende Kraft hinter dem ATP/ADP-Austausch ist der ATP-Gradient über die ER-Membran am wahrscheinlichsten (Depaoli et al., 2018, Klein et al., 2018). Dafür sprechen auch die Luciferase-basierten ATP-Messungen in HeLa-Zellen, deren Cytosol- und Organellenfraktion durch Semipermeabilisierung voneinander getrennt betrachtet wurden (Abbildung 4.27). Die Bestimmung ergab, dass sich der größte intrazelluläre Pool an ATP in der Cytosolfraction befand, was wohl dem glykolytischen Stoffwechsel der HeLa-Zellen zuzuschreiben ist (Hsu und Sabatini, 2008) (Kapitel 2.4.1.1). *In vivo* ATP-Messungen mit einem FRET-basierten cytosolischen FRET-Sensor zeigten keine Unterschiede zwischen SLC35B1-depletierten Zellen und Kontrollzellen (Abbildung 4.23), was darauf hindeutet, dass sich ATP-Unterschiede hauptsächlich im ER manifestieren und von dort aus die Regulationsroute gesteuert wird (siehe Modell aus Kapitel 5.2.5).

Um die funktionelle Ähnlichkeit zum AAC weiter zu charakterisieren, sollten Transportstudien mit SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen und im Idealfall mit Proteoliposomen mit rekonstituiertem SLC35B1-exprimierenden ER unter dem Einfluss bekannter AAC-Inhibitoren durchgeführt werden. Solche sind beispielsweise Atractylosid und Bongkreksäure, die als hoch spezifisch für AAC gelten (Klingenberg, 1979, Fiore et al., 1998, Palmieri, 2004, Klingenberg, 2008) und bislang weder in Hefen (Mayinger et al., 1995), noch in rekonstituierten Säuger-rER-Liposomen zur Inhibition des ER-ADP/ATP-Transporters führten (Clairmont et al., 1992, Kim et al., 1996). Auch funktionelle ADP/ATP-Transporter anderer Organellen waren durch die Behandlung mit Atractylosid unbeeinflusst (Winkler und Neuhaus, 1999, Palmieri et al., 2001). Demgegenüber ließ sich der ATP-Transport sowohl in

Hefe-ER-Vesikeln, als auch in Säuger-Proteoliposomen mit DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-Disulfonsäure) inhibieren, das einen Inhibitor von Anionentransportern, inklusive ATP-Transportern darstellt (Mayinger und Meyer, 1993, Shin et al., 2000). Durch dieses pharmakologische Inhibierungsprofil von SLC35B1 ließe sich entweder eine funktionelle Abgrenzung oder Annäherung zum AAC darstellen, sowie SLC35B1 als den wahrscheinlichen Transporter aus früheren Studien belegen (Clairmont et al., 1992, Guillen und Hirschberg, 1995, Kim et al., 1996).

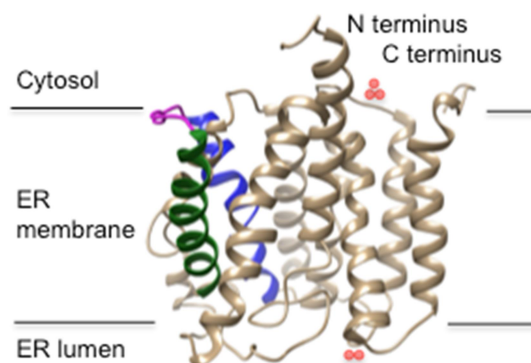
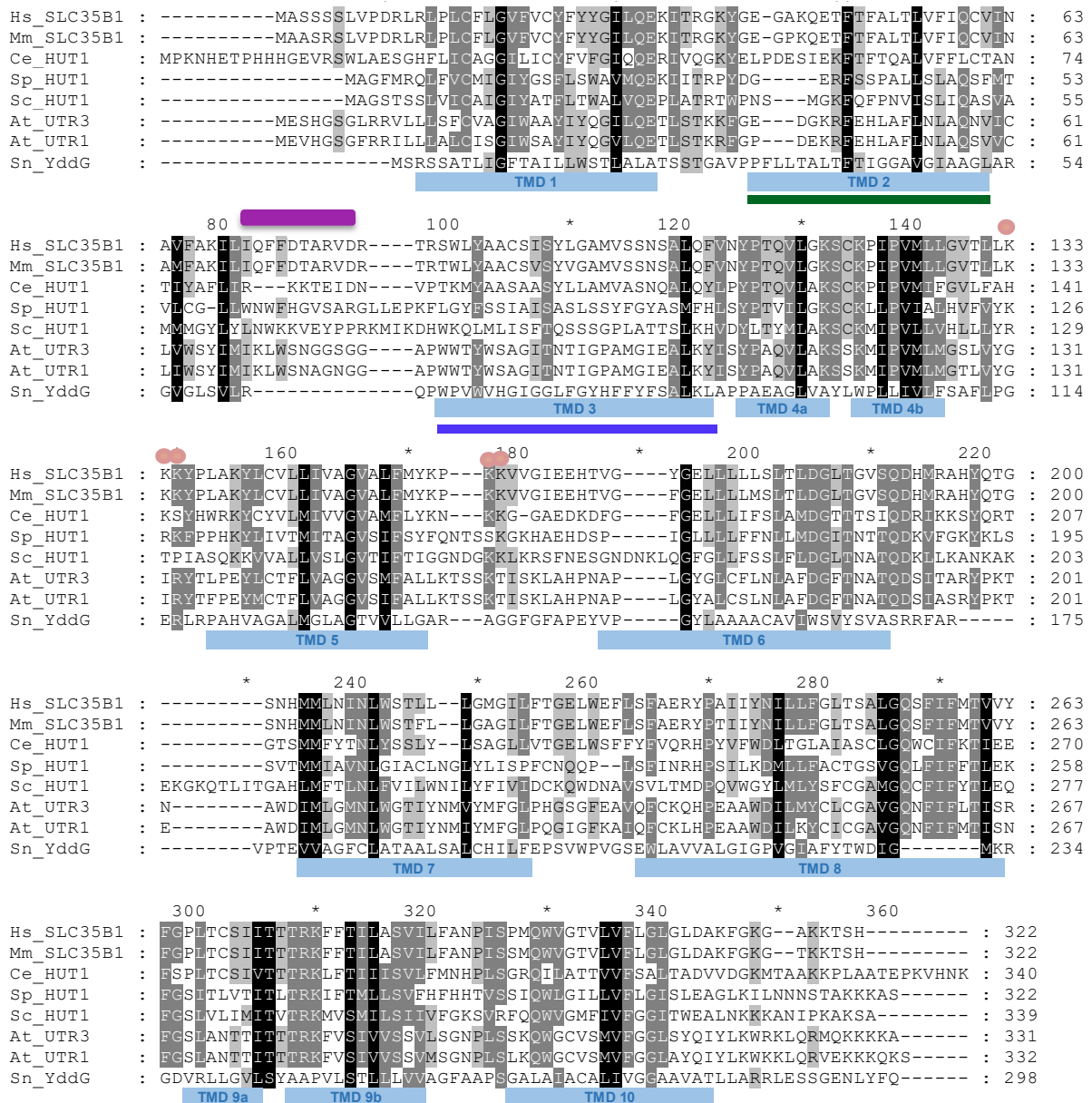


Abbildung 5.2: Die Proteinsequenzen verschiedener SLC35B1-Orthologe (Proteinsequenzen aus UniProt oder GeneBank, gezeigt im Einbuchstabencode für *Homo sapiens* (Hs, P78383.1; NM_005827.1), *Mus musculus* (Mm, P97858.1), *Caenorhabditis elegans* (Ce, CAC35849), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp,CAB46704.1), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, CAA97965),

Arabidopsis thaliana (At, At1g14360 und At2g02810), und *Starkeya novella* (YddG, gi:502932551). Die Sequenzen wurden mit ClustalX und GeneDoc aligned. Beide Termini liegen im Cytosol, das Doppellysin (KK)-Motiv in der Nähe des C-Terminus des Säuger-SLC35B1 dient als ER-Retentionsmotiv. Zusätzlich dargestellt ist das vorhergesagte IQ-Motiv des Säuger-SLC35B1 (violett), sowie die positiv geladenen Reste (hellrot). (Klein et al., 2018) Unten: Hypothetisches strukturelles Modell von SLC35B1 gemodelt mit Phyre2 (Kelley et al., 2015). Hervorgehoben sind die Helices 2 (grün) und 3 (blau) und die verbindende Schleife, die das IQ-Motiv enthält (violett). Die positiv geladenen Cluster sind in Analogie zu A rot gekennzeichnet. (veröffentlicht in Klein et al., 2018, Inhalt geschützt durch CC BY 4.0, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ATP_{ER}-Messungen in HeLa-Zellen

Mit Hilfe des ER-ATP-Sensor ERAT4.01 (Vishnu et al., 2014), der auf einem durch die Bindung von ATP an der ϵ -Untereinheit der bakteriellen F₀F₁-ATP-Synthase hervorgerufenen FRET-Signal basiert, wurde der ATP_{ER}-Status der HeLa-Zellen ermittelt. Dabei führte die Depletion von SLC35B1 in HeLa-Zellen dazu, dass der ATP-Sensor einen signifikant erniedrigten ATP-Gehalt im ER detektierte, ein Effekt, der durch die transgene Expressionen der beiden SLC35B1-Isoformen wieder vollständig aufgehoben werden konnte. Dies spricht für die Beteiligung von SLC35B1 an der ATP_{ER}-Homöostase und mit dem Wissen aus den Transportstudien des heterolog exprimierten SLC35B1 in *E. coli*, ist dieses Ergebnis ein starker Hinweis darauf, dass es sich bei SLC35B1 funktional um den bis dato einzigen identifizierten ATP-Transporter der Säuger-ER-Membran handelt. Weiterhin konnte auch die zuvor bereits beobachtete Korrelation zwischen Ca²⁺-Entleerung des ER und ATP-Aufnahme ins ER verifiziert werden (Vishnu et al., 2014). Die Applikation von Tg führte nämlich zu einem Anstieg des FRET-Signals, das die ATP-Aufnahme spiegelt. War SLC35B1, der putative ATP_{ER}-Transporter, depletiert, war dieser Anstieg signifikant beeinträchtigt (Abbildung 4.22) und konnte durch die transgene Expression von SLC35B1 gerettet werden. Dieser Zusammenhang zwischen der Ca²⁺- und Energiehomöostase des ER ist grundlegend für das vorgeschlagene Modell dieser Arbeit zum Funktionsmechanismus des regulatorischen Netzwerkes und wird in Kapitel 5.2.5 näher beleuchtet.

Die Frage, die Vishnu et al. weiterhin stellten, als sie die inverse Korrelation zwischen Ca²⁺-Mobilisierung aus und ATP-Aufnahme ins ER beschrieben, war, ob es sich um einen Effekt handelt, der an die ATP-Biosynthese gekoppelt war, oder ob der Anstieg an ATP_{ER} eine Folge des geringeren ATP-Verbrauchs im ER ist (Vishnu et al., 2014). Aus diesem Grund inhibierten sie die ATP-Synthese der Glykolyse mit 2-DG in HeLa-Zellen, was zu einem Abfall von ATP_{ER} führte und somit offenbarte, dass das Ca²⁺-gekoppelte ATP_{ER}-Signal eine kontinuierliche Synthese und den Transport von ATP über die ER-Membran gekoppelt benötigt (Vishnu et al., 2014).

Für zukünftige Versuche zur Spezifizierung der ATP-Transportfunktion von SLC35B1 könnten die Versuche mit ERAT4.01 in HeLa-Zellen wiederholt werden, die transgen die beiden Isoformen von SLC35B1 überexprimieren. Möglicherweise haben die Zellen dadurch einen erhöhten, basalen intralumenalen ATP-Gehalt, der auf eine Sensitivität gegenüber DIDS untersucht werden könnte. DIDS inhibiert Anionentransporter und in vergangenen Studien wurde der ER-ATP-Transport sowohl von Hefen, als auch Säugern als DIDS-sensitiv beschrieben (Clairmont et al., 1992, Mayinger und Meyer, 1993). Interessant wäre es auch die funktionelle Konservierung und evolutionäre Entwicklung von SLC35B1 zu testen, dessen Hefeortholog *hut1* als UDP-Gal-Transporter beschrieben ist (Kainuma et al., 2001, Nakanishi et al., 2001). So könnte man die verschiedenen Orthologe auf ihr Vermögen hin untersuchen, den durch die Depletion des humanen SLC35B1 verringerten ER-ATP-Gehalts zu retten. Ähnliches wurde für die Funktionsrettung der Larvenentwicklung in *C. elegans* durchgeführt. Der Defekt, den die genetische Inaktivierung von *hut-1* in *C. elegans* nach sich zog, konnte durch humanes SLC35B1 gerettet werden, nicht jedoch durch die Expression von *schut1* oder *sphut1* der verschiedenen Hefestämme (Dejima et al., 2009). Letzteres spricht für die funktionelle Evolution, die wie in Kapitel 5.2.5 näher erläutert wird, durch die Komplexität der Kopplung von Energie- und Ca^{2+} -Homöostase bedingt ist.

5.2.4. Entdeckung der Einflussfaktoren Ca^{2+} , Sec61 und BiP in der SLC35B1-Funktion und somit für die ATP-Regulation

5.2.4.1. BiP spielt eine Rolle in der SLC35B1-Funktion

SLC35B1 wurde als ein Protein charakterisiert, das *in vitro* einen ATP/ADP-Austausch vermitteln kann, der dem von Proteoliposomen mit Säuger-ER-Proteinen sehr stark ähnelt und möglicherweise die Frage nach der Art der Energieversorgung (Clairmont et al., 1992, Hirschberg et al., 1998, Kornmann und Walter, 2010, Vishnu et al., 2014) des ER beantwortet. Doch diese Arbeit entwickelt darüber hinaus ein Modell zur möglichen Regulation der Energiehomöostase des ER. Basierend auf den Beobachtungen, dass eine ER- Ca^{2+} -Depletion mit einem Anstieg von ATP im ER gekoppelt ist (Vishnu et al., 2014), entwickelten sich Ideen zum regulatorischen Netzwerk der ER-ATP-Energiehomöostase. Diese beinhalten einmal die Achse Sec61-vermittelter Ca^{2+} -Leckstrom, sowie BiP als lumenaler ATP-Hauptkonsument des ER in seiner Rolle als limitierender Faktor des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms.

Indem der *in vitro*-Proteintransport eines BiP-abhängigen Vorläuferproteins (Präproapelin) in SP-Zellen SLC35B1-depletierter HeLa-Zellen untersucht wurde, konnten Einblicke in die Funktionalität von BiP unter dem putativen ATP-Mangel im ER untersucht werden. Dabei ergab sich unter post-Transportbedingungen eine deutliche Akkumulation des Vorläufers (Abbildung 4.28), was auch bei einer Depletion von BiP der Fall war (Haßdenteufel et al., 2018). Dies spricht für eine Beeinträchtigung der BiP-Funktionen, was ein erster funktioneller Hinweis auf verminderte ATP-Level als Folge der SLC35B1-Depletion war. Frühe Versuche mit Hefe-ER-Vesikeln zeigten ebenfalls eine Transportbeeinträchtigung des Substrats Präpro- α -Faktor, wenn der putative ATP-Transporter entweder mit DIDS inhibiert oder mit Bz₂ATP (3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl-ATP) chemisch an den putativen ATP-Transporter quervernetzt wurde (Mayinger und Meyer, 1993). Das BiP-unabhängige Substrat Präprolaktin war im Gegensatz zu Präproapelin in seinem Transport nicht beeinträchtigt, sondern sogar verbessert, was möglicherweise auf Gegenregulationen Sec61-assoziiierter Proteine nach SLC35B1-Depletion zurückgeführt werden kann. Weitere Untersuchungen dieses Phänomens wurden noch nicht durchgeführt und könnten Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

5.2.4.2. Zusammenhang der SLC35B1-Funktion mit Sec61 und der Ca²⁺-Homöostase

Neben der Aufgabe im Proteintransport über die ER-Membran als akzessorisches Protein des Sec61-Komplexes, ist eine weitere BiP-Funktion eng mit dem Sec61-Komplex verknüpft. Hierbei handelt es sich um die Regulation des Ca²⁺-Leckstroms, den die kanalbildende α -Untereinheit des Sec61-Komplexes als Folge der Ionendurchlässigkeit und dem steilen Ca²⁺-Gradienten zwischen ER und Cytosol vermittelt (Hamman et al., 1998, Wirth et al., 2003, Erdmann et al., 2011, Lang et al., 2011a, Lang et al., 2011b, Schäuble et al., 2012). In HeLa-Zellen macht der Sec61-vermittelte Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER dabei etwa 60 % aller Leckkanäle der ER-Membran aus (Lang et al., 2011a). „Live cell calcium imaging“-Versuche, in denen cytosolisches Ca²⁺ nach SLC35B1-Depletion detektiert wurde, wiesen eine deutlich gestörte Ca²⁺-Homöostase auf (Abbildung 4.29), da die Zellen intrazellulär weniger Ca²⁺ enthielten, wohl als direkte Folge eines konstitutiven unregulierten Ca²⁺-Leckstroms (Abbildung 4.30). Somit bestärken die Ergebnisse die eingangs erwähnte Beobachtung von Vishnu et al., dass Ca²⁺ und ATP-Homöostase des ER miteinander zusammenhängen (Vishnu et al., 2014). Die unweigerliche Frage, die sich an diese Beobachtung anschließt, ist die nach der Ursache der fehlregulierten Ca²⁺-Homöostase. Beispiele für einen fehlregulierten Sec61-Kanal in Hinblick auf die Ca²⁺-Homöostase sind im ersten Teil dieser Arbeit bereits analysiert worden (siehe Kapitel 5.1.3) (Schubert et al., 2018). Die Sec61 α (V85D)-Mutation führte zu

einem Rückgang der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, da die Mutation den Kanal vermutlich konstitutiv Ca^{2+} -permeabel werden ließ. Diese phänotypische Ähnlichkeit zur SLC35B1-Depletion verleitet zu der Hypothese, dass auch im SLC35B1-Szenario Sec61 eine Rolle spielen könnte. Aus diesem Grund wurden die Ca^{2+} -Messungen unter Verwendung von EM wiederholt. EM inhibiert die Proteinbiosynthese, was zu einer Arretierung des naszierenden Polypeptids im Translokation führt (Pestka, 1971). Letzteres führt nachweislich zu einer verringerten Durchlässigkeit von Sec61 α für Ca^{2+} (Amer et al., 2009, Ong et al., 2007). Und tatsächlich wurden die Effekte, die SLC35B1 auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Gesamtkonzentration durch die Applikation von EM gerettet (Abbildung 4.31). Im Detail erklären sich diese Ergebnisse wie folgt. Während der Inkubation von EM für 2 h vor der Ca^{2+} -Messung, was zur Blockade des Sec61-vermittelten Ca^{2+} -Leckstroms führt, nehmen die SLC35B1-depletierten HeLa-Zellen, deren ER- Ca^{2+} -Speicher aufgrund der BiP-Fehlfunktion als allosterischer Sec61 α -Regulator deutlich dezimiert sind, Ca^{2+} aus dem Medium ins ER auf und normalisieren so ihre Ca^{2+} -Speicher. Dieser Effekt bildet sich während der Messungen in der Zellpopulation EM + Iono ab. Behandelt man die Zellen mit Tg, kann die Rettung des Phänotyps nicht detektiert werden, da Sec61 α als prominenter Ca^{2+} -Leckkanal inhibiert ist. Um diese Theorie weiter zu festigen, könnte die beeinträchtigte BiP-Funktion in der Sec61 α -Regulation pharmakologisch imitiert werden, indem beispielsweise Tu dazu benutzt wird, BiP vom Translokation zu titrieren, was den ATP-Mangel nach SLC35B1-Depletion widerspiegelt. Versuche in Kombination mit EM würden dann zeigen wie viel Rest-Leckstrom aus dem ER noch zu erwarten sei.

Neben einer möglichen Ca^{2+} -abhängigen Route zur SLC35B1-Aktivierung, gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass bei der Regulation von SLC35B1 Ca^{2+} eine direkte Rolle spielen kann. In dem Zusammenhang ist das CaM-Bindemotiv (IQ-Motiv) von SLC35B1 zu nennen, das sich in der cytosolischen Schleife zwischen den TMD 2 und 3 befindet (Abbildung 5.2, violetter Abschnitt). Die Anwesenheit der putativen CaM-Bindestelle wurde sowohl experimentell mittels Peptidspots von SLC35B1-Iso2 und ^{14}C -markierten Ca^{2+} -CaM 27 nachgewiesen, als auch *in silico* überprüft (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/sequence.html>) (Klein et al., 2018, Supplement). Beispiele, in denen Ca^{2+} eine direkte Aktivitätsregulation von mitochondrialen Transportern übernimmt, gibt es in der SLC25-Familie. Diese sog. CaMCs (engl. „ Ca^{2+} regulated mitochondrial transporters“) sind einmal Aspartat/Glutamat-Austauscher (AGCs) und einmal ATP-Mg $^{2+}$ /Pi Austausch (APCs) (Palmieri et al., 2001, del Arco und Satrustegui, 2004, Fiermonte et al., 2004, Del Arco et al., 2016). Während letztere starke Ca^{2+} -Signale zur

Aktivierung benötigen, reagieren AGCs bereits auf Ca^{2+} -Erhöhungen, die basale Ca^{2+} -Level nur wenig überschreiten, was ein Beispiel für die vielfältige Regulationsmöglichkeiten durch Ca^{2+} ist (Del Arco et al., 2016). Tatsächliche Hinweise auf eine direkte Aktivierung von SLC35B1 durch Ca^{2+} gibt es nicht, da *in vitro* ATP-Transporte von der Anwesenheit von Ca^{2+} oder EDTA in den Kompetitionsstudien der SLC35B1-exprimierenden *E. coli*-Zellen unbeeinflusst waren (Tabelle 4.2). Dennoch ist das Säuger-SLC35B1 das einzige mit IQ-Bindemotiv, was die evolutionäre Bedeutung für Ca^{2+} in der in Kapitel 5.2.5 vorgeschlagenen Regulationsroute unterstreichen könnte (Klein et al., 2018). Deshalb wäre es auch interessant zu sehen, ob und inwiefern Mutationen des IQ-Motivs Auswirkungen auf den *in vivo* ATP-Gehalt besitzen, sensitiver auf ER-Stress-induzierende Agenzien testen oder sich in Abhängigkeit des Zelltyps (Krebs vs. normal vs. professionell sekretorische Zellen) als bedeutend herausstellen.

5.2.4.3. Cytosolisches Ca^{2+} -abhängiges „signaling“ zur ATP-Produktion

Die Frage, die sich als nächstes stellt ist, wie das Ca^{2+} -Signal, das offenbar in der ATP_{ER} -Regulationsroute eine Rolle spielt (Vishnu et al., 2014) zur vermehrten ATP-Produktion und -Import ins ER führt. Dass der ATP-Anstieg eine Folge der ATP-Produktion ist, zeigen zuvor bereits zitierte Versuche aus Vishnu et al., die mit 2-DG die Glykolyse inhibierten, was zum Abfall des ATP_{ER} führt (Vishnu et al., 2014). Eine wahrscheinliche Möglichkeit verläuft über das AMPK-„signaling“. Diese Kinase ist ein zentraler intrazellulärer Energie-Stresssensor, die das Verhältnis von AMP zu ATP misst. Bei einem ATP-Mangel wird AMPK selbst aktivierend phosphoryliert. In aktivierter Form kann AMPK katabolische Wege, d.h. ATP-generierende Stoffwechselprozesse anschalten (siehe Kapitel 2.4.3). Interessant ist aber, dass diese Kinase auch über die CaMKK2, also Ca^{2+} -abhängig phosphoryliert und damit aktiviert werden kann. Ein relevantes Substrat der pAMPK ist die PFK2, ein Schlüsselenzym der Glykolyse, was zur ADP-Phosphorylierung führt (Marsin et al., 2000, Hardie et al., 2012). Somit würde sich der Kreis schließen und vor allem für Zellen, die für ihre ATP-Produktion hauptsächlich auf die Glykolyse angewiesen sind, wie HeLa-Zellen, eine nachvollziehbare Regulationsroute darstellen. Tatsächlich führte die Inhibition von SLC35B1 zu einer vermehrten Phosphorylierung von pAMPK (Abbildung 4.33), was nach bisherigem Stand der Experimente auf einen erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Gehalt (Abbildung 4.30) und CaMKK2-abhängige Phosphorylierung zurückzuführen ist. Zur genaueren Evaluierung sollten noch Western Blots mit immunologischer Detektion der phosphorylierten Form der PFK2 SLC35B1-depletierter Zellen angefertigt werden, was einen direkten Beweis dieser Regulationsroute darstellen würde. Um die Zusammenhänge dieses Zyklus weiter zu

untersuchen, sollten Depletionsversuche von AMPK in Kombination mit ATP_{ER}-Imaging (ähnlich Vishnu et al., 2014) und auch in simultaner Depletion mit SLC35B1 durchgeführt werden, was diese Regulationsroute absichern kann und Aufschluss darüber gibt, ob es noch weitere ATP_{ER}-Transporter gibt. Außerdem gilt es weiterhin die Phosphatase zu untersuchen, die pAMPK dephosphoryliert, um weiteren Aufschluss über die vollständige Regulationsroute zu erhalten. Denkbar wäre die Beteiligung der ubiquitär exprimierten Proteinphosphatase 2 (PP2), die man mit spezifischen Inhibitoren untersuchen könnte, wie z.B. calyculin A (Wu et al., 2007, Park et al., 2013).

5.2.5. Modell zur regulatorischen Route der ATP_{ER}-Regulation

Die in den vorangegangenen Kapiteln diskutierten Ergebnisse zur Identifikation von SLC35B1 als einen ER-ATP/ADP-Austauscher und das damit verbundene regulatorische Netzwerk fügen sich nun zu einem Modell zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase zusammen.

Eine konstante ATP-Versorgung im ER ist, wie bereits mehrfach diskutiert, unabdingbar für die Aufrechterhaltung von vielen Chaperon-vermittelten ER-Funktionen, wobei vor allem das sehr abundante Hsp70-Chaperon BiP zu nennen ist. BiP bindet unter anderem an den für kleine Moleküle durchlässigen Sec61-Kanal (Heritage und Wonderlin, 2001, Roy und Wonderlin, 2003, Wirth et al., 2003, Saparov et al., 2007), erlaubt und verschließt ihn so auf lumenaler Seite gegen den Verlust von Ca²⁺ aus dem ER (Alder et al., 2005, Schäuble et al., 2012). Fehlt eine konstante ATP-Versorgung, kommt es zum Funktionsverlust von BiP und Sec61 α wird für Ca²⁺ durchlässig, die sich in lokaler Nähe zur cytosolischen Seite der ER-Membran sammeln und von CaM gebunden werden (Erdmann et al., 2011). Ca²⁺-CaM dient als Aktivator der CaMKK2 (siehe Kapitel 2.4.3), die wiederum den cytosolischen Energiesensor AMPK phosphoryliert (Hardie et al., 2012). In seiner phosphorylierten Form dient AMPK als Aktivator der PF2K, einem Enzym der Glykolyse, was zu verstärkter ADP-Phosphorylierung führt. Das daraus vermehrt entstehende ATP wird über SLC35B1 ins ER transportiert, möglicherweise weil SLC35B1 selbst durch Bindung von Ca²⁺-CaM aktiviert wird (Abbildung 5.2). Das mit ATP aufgefüllte ER wird dadurch wieder homöostatisch, was auch bedeutet, das BiP Sec61 α wieder gegen den Verlust von Ca²⁺ reguliert. Erweiterte Faktoren des vorgeschlagenen Signalwegs sind die ATPase SERCA, die im Cytosol akkumuliertes Ca²⁺ wieder in das ER zurückpumpt, sowie die PP2, die aktiviertes pAMPK dephosphoryliert. Somit untermauert dieses Modell die Beobachtung von Vishnu et al., dass ATP-Import in das ER und Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER gekoppelt sind (Vishnu et al., 2014)

und ergänzt sie auf molekularer Ebene. Die offenen Fragen für die Zukunft sind unter anderem:

- a) wie das Modell für Zellen aussieht, die ihre ATP-Versorgung vornehmlich aus der mitochondrialen OXPHOS speisen. Hier ist es interessant, wie auch bereits in Kapitel 5.2.3.1 angerissen, die Bedeutung der Kontaktstellen zwischen ER und Mitochondrium (MAMs) in der regulatorischen Route zu beleuchten, da Ca^{2+} auch in der OXPHOS als bedeutendes Signal zur ATP-Produktion genutzt werden kann (siehe Kapitel 2.3.5.1).
- b) wie das negativ geladene Phosphat das ER wieder verlässt, ob es einen speziellen Transporter dafür gibt, wie z.B. in Mitochondrien (Seifert et al., 2015), oder ob Phosphat vielleicht sogar durch den nicht ionenselektiven Sec61-Kanal, der auch für Glutathion durchlässig ist, das ER verlässt (Ponsero et al., 2017, Klein et al., 2018).
- c) die Schnittstellen dieser Regulationsroute der ER-Energiehomöostase zur UPR, da sowohl AMPK, als auch SLC35B1 vermutlich UPR-Zielgene darstellen (Pereira et al., 2010, Preston und Hendershot, 2013).
- d) die Viabilität von SLC35B1 KO-Zellen. Zu tiefergehenden zellbiologischen und physiologischen Studien den ATP_{ER} -Transport betreffend ist es von hoher Priorität SLC35B1 KO-Zellen zu generieren, wobei sich dabei zunächst die Frage stellt, ob entsprechende Zellen lebensfähig sind oder es noch weitere, unentdeckte Funktionshomologe von SLC35B1 in den entsprechenden Zelltypen gibt.
- e) Zukünftig wird es auch von Interesse sein, ob *SLC35B1* als ein mit Krankheiten assoziiertes Gen beschrieben wird und wo putative Mutationen liegen, die zur Funktionsbeeinträchtigung und zum Zusammenbruch entweder der ATP_{ER} -Transportfunktion führen, oder die Interaktion mit dem funktionellen Netzwerk zur Regulation der Energiehomöostase im ER betreffen.

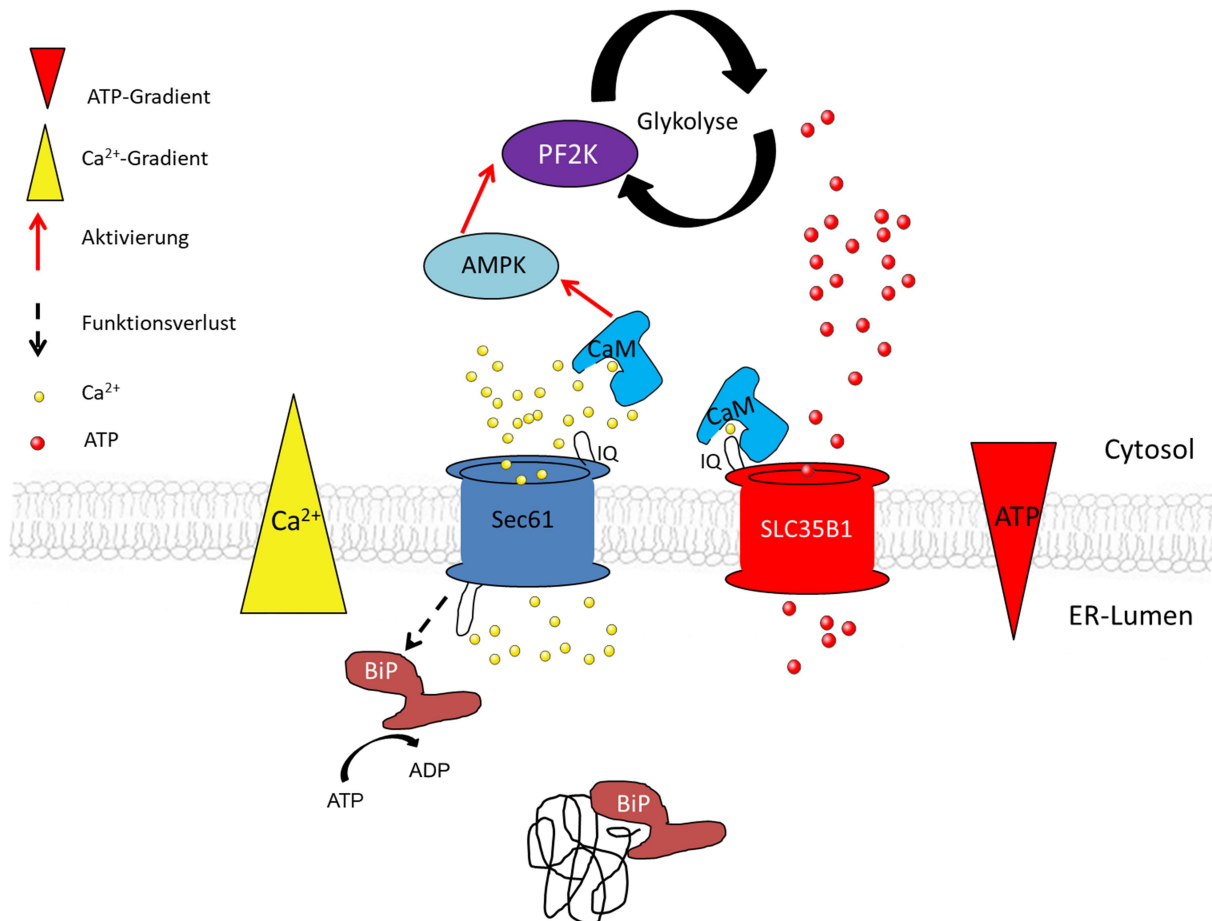


Abbildung 5.3: Modell der ATP_{ER} -Regulationsroute. Sobald die ER-lumenale ATP -Versorgung sinkt, ist BiP in seiner Funktion als Sec61- Ca^{2+} -Regulator beeinträchtigt und dissoziiert von Sec61. Dadurch wird Sec61 für Calcium-Ionen durchlässig, die auf cytosolischer Seite von CaM-gebunden werden. CaM dient als Aktivator der AMPK, dem zentralen Energiesensor, der Enzyme der Glykolyse (PF2K) aktiviert, wodurch mehr ATP generiert wird. Ca^{2+} -CaM kann wahrscheinlich ebenfalls direkt an SLC35B1 binden und es möglicherweise aktivieren. ATP wird daraufhin ins ER transportiert und die Homöostase wird wiederhergestellt. Zu beachten gilt, dass in diesem Szenario lediglich auf die ATP -Produktion mittels Glykolyse eingegangen wird, woraus z.B. Krebszellen ihre Hauptenergieversorgung speisen.

6. Literaturverzeichnis

- ADAMSON, B., NORMAN, T. M., JOST, M., CHO, M. Y., NUNEZ, J. K., CHEN, Y., VILLALTA, J. E., GILBERT, L. A., HORLBECK, M. A., HEIN, M. Y., PAK, R. A., GRAY, A. N., GROSS, C. A., DIXIT, A., PARNAS, O., REGEV, A. & WEISSMAN, J. S. 2016. A Multiplexed Single-Cell CRISPR Screening Platform Enables Systematic Dissection of the Unfolded Protein Response. *Cell*, 167, 1867-1882 e21.
- AKIYAMA, Y. & ITO, K. 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 6, 3465-70.
- ALDER, N. N., SHEN, Y., BRODSKY, J. L., HENDERSHOT, L. M. & JOHNSON, A. E. 2005. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 168, 389-99.
- ALGENSTAEDT, P., ANTONETTI, D. A., YAFFE, M. B. & KAHN, C. R. 1997. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart. *J Biol Chem*, 272, 23696-702.
- ALONSO, M. T., BARRERO, M. J., MICHELENA, P., CARNICERO, E., CUCHILLO, I., GARCIA, A. G., GARCIA-SANCHO, J., MONTERO, M. & ALVAREZ, J. 1999. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol*, 144, 241-54.
- AMER, M. S., LI, J., O'REGAN, D. J., STEELE, D. S., PORTER, K. E., SIVAPRASADARAO, A. & BEECH, D. J. 2009. Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, H910-6.
- AMIN-WETZEL, N., SAUNDERS, R. A., KAMPHUIS, M. J., RATO, C., PREISSLER, S., HARDING, H. P. & RON, D. 2017. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell*, 171, 1625-1637 e13.
- ANDERSEN, T. B., LOPEZ, C. Q., MANCZAK, T., MARTINEZ, K. & SIMONSEN, H. T. 2015. Thapsigargin--from *Thapsia L.* to mipsagargin. *Molecules*, 20, 6113-27.
- AST, T., COHEN, G. & SCHULDINER, M. 2013. A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, 152, 1134-45.
- AVIRAM, N., AST, T., COSTA, E. A., ARAKEL, E. C., CHUARTZMAN, S. G., JAN, C. H., HASSDENTEUFEL, S., DUDEK, J., JUNG, M., SCHORR, S., ZIMMERMANN, R., SCHWAPPACH, B., WEISSMAN, J. S. & SCHULDINER, M. 2016. The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum. *Nature*, 540, 134-138.
- AWAD, W., ESTRADA, I., SHEN, Y. & HENDERSHOT, L. M. 2008. BiP mutants that are unable to interact with endoplasmic reticulum DnaJ proteins provide insights into interdomain interactions in BiP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1164-9.
- BABA, Y., MATSUMOTO, M. & KUROSAKI, T. 2014. Calcium signaling in B cells: regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol Immunol*, 62, 339-43.
- BAGUR, R. & HAJNOCZKY, G. 2017. Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*, 66, 780-788.
- BAKSH, D., DAVIES, J. E. & KIM, S. 1998. Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*, 9, 743-8.
- BAKSH, S., BURNS, K., ANDRIN, C. & MICHALAK, M. 1995. Interaction of calreticulin with protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 270, 31338-44.
- BALABAN, R. S. 2009. The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1334-41.
- BALCH, W. E., MORIMOTO, R. I., DILLIN, A. & KELLY, J. W. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319, 916-9.
- BARNES, K., INGRAM, J. C., PORRAS, O. H., BARROS, L. F., HUDSON, E. R., FRYER, L. G., FOUFELLE, F., CARLING, D., HARDIE, D. G. & BALDWIN, S. A. 2002. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci*, 115, 2433-42.

- BARR, V. A., BERNOT, K. M., SRIKANTH, S., GWACK, Y., BALAGOPALAN, L., REGAN, C. K., HELMAN, D. J., SOMMERS, C. L., OH-HORA, M., RAO, A. & SAMELSON, L. E. 2008. Dynamic movement of the calcium sensor STIM1 and the calcium channel Orai1 in activated T-cells: puncta and distal caps. *Mol Biol Cell*, 19, 2802-17.
- BARRERO, M. J., MONTERO, M. & ALVAREZ, J. 1997. Dynamics of [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *J Biol Chem*, 272, 27694-9.
- BASSIK, M. C., SCORRANO, L., OAKES, S. A., POZZAN, T. & KORSMEYER, S. J. 2004. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *EMBO J*, 23, 1207-16.
- BAUGHMAN, J. M., PEROCCHI, F., GIRGIS, H. S., PLOVANICH, M., BELCHER-TIMME, C. A., SANCAK, Y., BAO, X. R., STRITTMATTER, L., GOLDBERGER, O., BOGORAD, R. L., KOTELIANSKY, V. & MOOTHA, V. K. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341-5.
- BAUMGARTNER, H. K., GERASIMENKO, J. V., THORNE, C., FERDEK, P., POZZAN, T., TEPIKIN, A. V., PETERSEN, O. H., SUTTON, R., WATSON, A. J. & GERASIMENKO, O. V. 2009. Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *J Biol Chem*, 284, 20796-803.
- BECK, M., SCHMIDT, A., MALMSTROEM, J., CLAASSEN, M., ORI, A., SZYMBORSKA, A., HERZOG, F., RINNER, O., ELLENBERG, J. & AEBERSOLD, R. 2011. The quantitative proteome of a human cell line. *Mol Syst Biol*, 7, 549.
- BECKER, T., BHUSHAN, S., JARASCH, A., ARMACHE, J. P., FUNES, S., JOSSINET, F., GUMBART, J., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O., SCHULTEN, K., WESTHOF, E., GILMORE, R., MANDON, E. C. & BECKMANN, R. 2009. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science*, 326, 1369-73.
- BEDARD, K., SZABO, E., MICHALAK, M. & OPAS, M. 2005. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol*, 245, 91-121.
- BEHNKE, J., FEIGE, M. J. & HENDERSHOT, L. M. 2015. BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions. *J Mol Biol*, 427, 1589-608.
- BEHNKE, J., MANN, M. J., SCRUGGS, F. L., FEIGE, M. J. & HENDERSHOT, L. M. 2016. Members of the Hsp70 Family Recognize Distinct Types of Sequences to Execute ER Quality Control. *Mol Cell*, 63, 739-52.
- BERBEY, C., WEISS, N., LEGRAND, C. & ALLARD, B. 2009. Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 284, 36387-94.
- BERNALES, S., MCDONALD, K. L. & WALTER, P. 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 4, e423.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- BERRIDGE, M. J., LIPP, P. & BOOTMAN, M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 11-21.
- BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., HENDERSHOT, L. M., HARDING, H. P. & RON, D. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2, 326-32.
- BESSE, W., DONG, K., CHOI, J., PUNIA, S., FEDELES, S. V., CHOI, M., GALLAGHER, A. R., HUANG, E. B., GULATI, A., KNIGHT, J., MANE, S., TAHVANAINEN, E., TAHVANAINEN, P., SANNA-CHERCHI, S., LIFTON, R. P., WATNICK, T., PEI, Y. P., TORRES, V. E. & SOMLO, S. 2017. Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function. *J Clin Invest*, 127, 3558.
- BEZPROZVANNY, I. 1996. Inositol (1,4,5)-trisphosphate receptors: functional properties, modulation, and role in calcium wave propagation. *Soc Gen Physiol Ser*, 51, 75-86.
- BIAN, J. H., GHOSH, T. K., WANG, J. C. & GILL, D. L. 1991. Identification of intracellular calcium pools. Selective modification by thapsigargin. *J Biol Chem*, 266, 8801-6.

- BIEDERER, T., VOLKWEIN, C. & SOMMER, T. 1996. Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 15, 2069-76.
- BIEKER, K. L., PHILLIPS, G. J. & SILHAVY, T. J. 1990. The sec and prl genes of Escherichia coli. *J Bioenerg Biomembr*, 22, 291-310.
- BIEKER, K. L. & SILHAVY, T. J. 1990. PrlA (SecY) and PrlG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in E. coli. *Cell*, 61, 833-42.
- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. 1975a. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, 67, 835-51.
- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. 1975b. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, 67, 852-62.
- BLOM, T., SOMERHARJU, P. & IKONEN, E. 2011. Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, a004713.
- BLOND-ELGUINDI, S., CWIRLA, S. E., DOWER, W. J., LIPSHUTZ, R. J., SPRANG, S. R., SAMBROOK, J. F. & GETHING, M. J. 1993. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 75, 717-28.
- BOGAERT, D. J., DULLAERS, M., LAMBRECHT, B. N., VERMAELEN, K. Y., DE BAERE, E. & HAERYNCK, F. 2016. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet*, 53, 575-90.
- BOGESKI, I., AL-ANSARY, D., QU, B., NIEMEYER, B. A., HOTH, M. & PEINELT, C. 2010. Pharmacology of ORAI channels as a tool to understand their physiological functions. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 3, 291-303.
- BOL, R., DE WIT, J. G. & DRIESSEN, A. J. 2007. The active protein-conducting channel of Escherichia coli contains an apolar patch. *J Biol Chem*, 282, 29785-93.
- BOLAR, N. A., GOLZIO, C., ZIVNA, M., HAYOT, G., VAN HEMELRIJK, C., SCHEPERS, D., VANDEWEYER, G., HOISCHEN, A., HUYGHE, J. R., RAES, A., MATTHYS, E., SYS, E., AZOU, M., GUBLER, M. C., PRAET, M., VAN CAMP, G., MCFADDEN, K., PEDIADITAKIS, I., PRISTOUPILOVA, A., HODANOVA, K., VYLETAL, P., HARTMANNOVA, H., STRANECKY, V., HULKOVA, H., BARESOVA, V., JEDLICKOVA, I., SOVOVA, J., HNIZDA, A., KIDD, K., BLEYER, A. J., SPONG, R. S., VANDE WALLE, J., MORTIER, G., BRUNNER, H., VAN LAER, L., KMOCH, S., KATSANIS, N. & LOEYS, B. L. 2016. Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia. *Am J Hum Genet*, 99, 174-87.
- BONILLA, M., NASTASE, K. K. & CUNNINGHAM, K. W. 2002. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J*, 21, 2343-53.
- BONORA, M., PATERGNANI, S., RIMESSI, A., DE MARCHI, E., SUSKI, J. M., BONONI, A., GIORGI, C., MARCHI, S., MISSIROLI, S., POLETTI, F., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2012. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*, 8, 343-57.
- BONORA, M., WIECKOWSKI, M. R., CHINOPOULOS, C., KEPP, O., KROEMER, G., GALLUZZI, L. & PINTON, P. 2015. Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene*, 34, 1608.
- BOOTMAN, M. R., K.; COLLINS, T.; WALKER, S.; SANDERSON, M. 2014. Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging. *Calcium Techniques*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BORGE, P. D., JR. & WOLF, B. A. 2003. Insulin receptor substrate 1 regulation of sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 3 in insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem*, 278, 11359-68.
- BORGESE, N. & FASANA, E. 2011. Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 937-46.
- BOSANAC, I., MICHIKAWA, T., MIKOSHIBA, K. & IKURA, M. 2004. Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1742, 89-102.
- BRAAKMAN, I. & BULLEID, N. J. 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 80, 71-99.

- BRAAKMAN, I. & HEBERT, D. N. 2013. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a013201.
- BRAAKMAN, I., HELENIUS, J. & HELENIUS, A. 1992. Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature*, 356, 260-2.
- BRACHER, A. & VERGHESE, J. 2015a. GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1 and BAG domain proteins: nucleotide exchange factors for Hsp70 molecular chaperones. *Subcell Biochem*, 78, 1-33.
- BRACHER, A. & VERGHESE, J. 2015b. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front Mol Biosci*, 2, 10.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRANDIZZI, F., SNAPP, E. L., ROBERTS, A. G., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & HAWES, C. 2002. Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: evidence from selective photobleaching. *Plant Cell*, 14, 1293-309.
- BRANDL, C. J., DELEON, S., MARTIN, D. R. & MACLENNAN, D. H. 1987. Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem*, 262, 3768-74.
- BRANDMAN, O., LIU, J., PARK, W. S. & MEYER, T. 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131, 1327-39.
- BRAVO, R., VICENCIO, J. M., PARRA, V., TRONCOSO, R., MUNOZ, J. P., BUI, M., QUIROGA, C., RODRIGUEZ, A. E., VERDEJO, H. E., FERREIRA, J., IGLEWSKI, M., CHIONG, M., SIMMEN, T., ZORZANO, A., HILL, J. A., ROTHERMEL, B. A., SZABADKAI, G. & LAVANDERO, S. 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci*, 124, 2143-52.
- BRIGGS, J. A., WILK, T., WELKER, R., KRAUSSLICH, H. G. & FULLER, S. D. 2003. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J*, 22, 1707-15.
- BRINI, M. & CARAFOLI, E. 2009. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev*, 89, 1341-78.
- BRINI, M. & CARAFOLI, E. 2011. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- BRODSKY, J. L., WERNER, E. D., DUBAS, M. E., GOECKELER, J. L., KRUSE, K. B. & MCCracken, A. A. 1999. The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem*, 274, 3453-60.
- BROSTROM, C. O. & BROSTROM, M. A. 1998. Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 58, 79-125.
- BROWN, G. C. 1992. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J*, 284 (Pt 1), 1-13.
- BRUZZONE, R., HORMUZDI, S. G., BARBE, M. T., HERB, A. & MONYER, H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13644-9.
- BUKAU, B. & HORWICH, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92, 351-66.
- BULTYNCK, G., KIVILUOTO, S., HENKE, N., IVANOVA, H., SCHNEIDER, L., RYBALCHENKO, V., LUYTEN, T., NUYTS, K., DE BORGGRAEVE, W., BEZPROZVANNY, I., PARYS, J. B., DE SMEDT, H., MISSIAEN, L. & METHNER, A. 2012. The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore. *J Biol Chem*, 287, 2544-57.
- BUZELI, R. A., CASCARDO, J. C., RODRIGUES, L. A., ANDRADE, M. O., ALMEIDA, R. S., LOUREIRO, M. E., OTONI, W. C. & FONTES, E. P. 2002. Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems. *Plant Mol Biol*, 50, 757-71.
- CAHALAN, M. D. 2009. STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat Cell Biol*, 11, 669-77.
- CALAME, K. L., LIN, K. I. & TUNYAPLIN, C. 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 205-30.

- CALCRAFT, P. J., RUAS, M., PAN, Z., CHENG, X., ARREDOUANI, A., HAO, X., TANG, J., RIETDORF, K., TEBOUL, L., CHUANG, K. T., LIN, P., XIAO, R., WANG, C., ZHU, Y., LIN, Y., WYATT, C. N., PARRINGTON, J., MA, J., EVANS, A. M., GALIONE, A. & ZHU, M. X. 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459, 596-600.
- CALO, D. & EICHLER, J. 2011. Crossing the membrane in Archaea, the third domain of life. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 885-91.
- CAMELLO, C., LOMAX, R., PETERSEN, O. H. & TEPIKIN, A. V. 2002. Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium*, 32, 355-61.
- CANNON, K. S., OR, E., CLEMONS, W. M., JR., SHIBATA, Y. & RAPOPORT, T. A. 2005. Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol*, 169, 219-25.
- CAPASSO, J. M., KEENAN, T. W., ABEIJON, C. & HIRSCHBERG, C. B. 1989. Mechanism of phosphorylation in the lumen of the Golgi apparatus. Translocation of adenosine 5'-triphosphate into Golgi vesicles from rat liver and mammary gland. *J Biol Chem*, 264, 5233-40.
- CAPOBIANCO, L., BISACCIA, F., MICHEL, A., SLUSE, F. E. & PALMIERI, F. 1995. The N- and C-termini of the tricarboxylate carrier are exposed to the cytoplasmic side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett*, 357, 297-300.
- CAPRIOTTI, E., FARISELLI, P. & CASADIO, R. 2005. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res*, 33, W306-10.
- CARAFOLI, E. 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1115-22.
- CARAFOLI, E. 2003. Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci*, 28, 175-81.
- CARAFOLI, E. 2004. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci*, 29, 371-9.
- CARDENAS, C., MILLER, R. A., SMITH, I., BUI, T., MOLGO, J., MULLER, M., VAIS, H., CHEUNG, K. H., YANG, J., PARKER, I., THOMPSON, C. B., BIRNBAUM, M. J., HALLOWS, K. R. & FOSKETT, J. K. 2010. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, 142, 270-83.
- CARRERAS-SUREDA, A., PIHAN, P. & HETZ, C. 2018. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium*, 70, 24-31.
- CASE, R. M., EISNER, D., GURNEY, A., JONES, O., MUALLEM, S. & VERKHRATSKY, A. 2007. Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium*, 42, 345-50.
- CENCI, S. & SITIA, R. 2007. Managing and exploiting stress in the antibody factory. *FEBS Lett*, 581, 3652-7.
- CHAE, H. J., KIM, H. R., XU, C., BAILLY-MAITRE, B., KRAJEWSKA, M., KRAJEWSKI, S., BANARES, S., CUI, J., DIGICAYLIOGLU, M., KE, N., KITADA, S., MONOSOV, E., THOMAS, M., KRESS, C. L., BABENDURE, J. R., TSIEN, R. Y., LIPTON, S. A. & REED, J. C. 2004. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell*, 15, 355-66.
- CHAMI, M., GOZUACIK, D., LAGORCE, D., BRINI, M., FALSON, P., PEAUCELLIER, G., PINTON, P., LECOEUR, H., GOUGEON, M. L., LE MAIRE, M., RIZZUTO, R., BRECHOT, C. & PATERLINI-BRECHOT, P. 2001. SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis. *J Cell Biol*, 153, 1301-14.
- CHAMI, M., OULES, B., SZABADKAI, G., TACINE, R., RIZZUTO, R. & PATERLINI-BRECHOT, P. 2008. Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol Cell*, 32, 641-51.
- CHAMI, M., PRANDINI, A., CAMPANELLA, M., PINTON, P., SZABADKAI, G., REED, J. C. & RIZZUTO, R. 2004. Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *J Biol Chem*, 279, 54581-9.

- CHANDRA, S., FEWTRELL, C., MILLARD, P. J., SANDISON, D. R., WEBB, W. W. & MORRISON, G. H. 1994. Imaging of total intracellular calcium and calcium influx and efflux in individual resting and stimulated tumor mast cells using ion microscopy. *J Biol Chem*, 269, 15186-94.
- CHEN, Y., ZHANG, Y., YIN, Y., GAO, G., LI, S., JIANG, Y., GU, X. & LUO, J. 2005. SPD--a web-based secreted protein database. *Nucleic Acids Res*, 33, D169-73.
- CHENEY, R. E. & MOOSEKER, M. S. 1992. Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol*, 4, 27-35.
- CHENG, J., RANDALL, A. & BALDI, P. 2006. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins*, 62, 1125-32.
- CHEUNG, K. H., SHINEMAN, D., MULLER, M., CARDENAS, C., MEI, L., YANG, J., TOMITA, T., IWATSUBO, T., LEE, V. M. & FOSKETT, J. K. 2008. Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP₃ receptor channel gating. *Neuron*, 58, 871-83.
- CHIN, D. & MEANS, A. R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, 10, 322-8.
- CHIPUK, J. E., MOLDOVEANU, T., LLAMBI, F., PARSONS, M. J. & GREEN, D. R. 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*, 37, 299-310.
- CHIRICO, W. J., WATERS, M. G. & BLOBEL, G. 1988. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 332, 805-10.
- CHOI, Y. & CHAN, A. P. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31, 2745-7.
- CHU, L., GRUBER, A., AST, M., SCHMITZ-ESSER, S., ALTENSELL, J., NEUHAUS, H. E., KROTH, P. G. & HAFERKAMP, I. 2017. Shuttling of (deoxy-) purine nucleotides between compartments of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol*, 213, 193-205.
- CHUNG, K. T., SHEN, Y. & HENDERSHOT, L. M. 2002. BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem*, 277, 47557-63.
- CHYUNG, J. H., RAPER, D. M. & SELKOE, D. J. 2005. Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. *J Biol Chem*, 280, 4383-92.
- CLAIRMONT, C. A., DE MAIO, A. & HIRSCHBERG, C. B. 1992. Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (GRP 78) and GRP 94. *J Biol Chem*, 267, 3983-90.
- CLAPHAM, D. E. 2007. Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-58.
- CLARKE, P. R. & HARDIE, D. G. 1990. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J*, 9, 2439-46.
- CLEMENCON, B., BABOT, M. & TREZEGUET, V. 2013. The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): pathological implications of its dysfunction. *Mol Aspects Med*, 34, 485-93.
- CONTI, B. J., DEVARANENI, P. K., YANG, Z., DAVID, L. L. & SKACH, W. R. 2015. Cotranslational stabilization of Sec62/63 within the ER Sec61 translocon is controlled by distinct substrate-driven translocation events. *Mol Cell*, 58, 269-83.
- COPELAND, D. E. & DALTON, A. J. 1959. An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J Biophys Biochem Cytol*, 5, 393-6.
- CORBETT, E. F., OIKAWA, K., FRANCOIS, P., TESSIER, D. C., KAY, C., BERGERON, J. J., THOMAS, D. Y., KRAUSE, K. H. & MICHALAK, M. 1999. Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem*, 274, 6203-11.
- CORTON, J. M., GILLESPIE, J. G., HAWLEY, S. A. & HARDIE, D. G. 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 229, 558-65.
- CROWLEY, K. S., LIAO, S., WORRELL, V. E., REINHART, G. D. & JOHNSON, A. E. 1994. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell*, 78, 461-71.

- CROWLEY, K. S., REINHART, G. D. & JOHNSON, A. E. 1993. The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell*, 73, 1101-15.
- CSALA, M., MARCOLONGO, P., LIZAK, B., SENESI, S., MARGITTAI, E., FULCERI, R., MAGYAR, J. E., BENEDETTI, A. & BANHEGYI, G. 2007. Transport and transporters in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 1325-41.
- CSORDAS, G., RENKEN, C., VARNAI, P., WALTER, L., WEAVER, D., BUTTLE, K. F., BALLA, T., MANNELLA, C. A. & HAJNOCZKY, G. 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*, 174, 915-21.
- CSORDAS, G., THOMAS, A. P. & HAJNOCZKY, G. 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J*, 18, 96-108.
- CSORDAS, G., VARNAI, P., GOLENAR, T., ROY, S., PURKINS, G., SCHNEIDER, T. G., BALLA, T. & HAJNOCZKY, G. 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell*, 39, 121-32.
- CSORDAS, G., VARNAI, P., GOLENAR, T., SHEU, S. S. & HAJNOCZKY, G. 2012. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology. *Mol Cell Endocrinol*, 353, 109-13.
- CSORDAS, G., WEAVER, D. & HAJNOCZKY, G. 2018. Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol*, 28, 523-540.
- D'HONDT, C., PONSARTS, R., DE SMEDT, H., VINKEN, M., DE VUYST, E., DE BOCK, M., WANG, N., ROGIERS, V., LEYBAERT, L., HIMPENS, B. & BULTYNCK, G. 2011. Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal*, 23, 305-16.
- DALBEY, R. V. H., G. 2002. *Protein Targeting, Transport, and Translocation*, Academic Press.
- DANG, C. V. 2012. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*, 26, 877-90.
- DAVIES, R. E. & KREBS, H. A. 1952. Biochemical aspects of the transport of ions by nervous tissue. *Biochem J*, 50, xxiv.
- DAVIES, S. P., CARLING, D., MUNDAY, M. R. & HARDIE, D. G. 1992. Diurnal rhythm of phosphorylation of rat liver acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase, demonstrated using freeze-clamping. Effects of high fat diets. *Eur J Biochem*, 203, 615-23.
- DAVILA, S., FURU, L., GHARAVI, A. G., TIAN, X., ONOE, T., QIAN, Q., LI, A., CAI, Y., KAMATH, P. S., KING, B. F., AZURMENDI, P. J., TAHVANAINEN, P., KAARIAINEN, H., HOCKERSTEDT, K., DEVUYST, O., PIRSON, Y., MARTIN, R. S., LIFTON, R. P., TAHVANAINEN, E., TORRES, V. E. & SOMLO, S. 2004. Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet*, 36, 575-7.
- DE BRITO, O. M. & SCORRANO, L. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456, 605-10.
- DE STEFANI, D., BONONI, A., ROMAGNOLI, A., MESSINA, A., DE PINTO, V., PINTON, P. & RIZZUTO, R. 2012. VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *Cell Death Differ*, 19, 267-73.
- DEBERARDINIS, R. J., SAYED, N., DITSWORTH, D. & THOMPSON, C. B. 2008. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 54-61.
- DEJIMA, K., MURATA, D., MIZUGUCHI, S., NOMURA, K. H., GENGYO-ANDO, K., MITANI, S., KAMIYAMA, S., NISHIHARA, S. & NOMURA, K. 2009. The ortholog of human solute carrier family 35 member B1 (UDP-galactose transporter-related protein 1) is involved in maintenance of ER homeostasis and essential for larval development in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 23, 2215-25.
- DEL ARCO, A., CONTRERAS, L., PARDO, B. & SATRUSTEGUI, J. 2016. Calcium regulation of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2413-21.
- DEL ARCO, A. & SATRUSTEGUI, J. 2004. Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains. *J Biol Chem*, 279, 24701-13.
- DEMAUREX, N. 2005. Calcium measurements in organelles with Ca²⁺-sensitive fluorescent proteins. *Cell Calcium*, 38, 213-22.
- DENMEADE, S. R. & ISAACS, J. T. 2012. Engineering enzymatically activated "molecular grenades" for cancer. *Oncotarget*, 3, 666-7.

- DENTON, R. M. 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1309-16.
- DENTON, R. M., RANDLE, P. J. & MARTIN, B. R. 1972. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J*, 128, 161-3.
- DEPAOLI, M. R., HAY, J. C., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2018. The enigmatic ATP supply of the endoplasmic reticulum. *Biol Rev Camb Philos Soc*.
- DERLER, I., JARDIN, I. & ROMANIN, C. 2016. Molecular mechanisms of STIM/Orai communication. *Am J Physiol Cell Physiol*, 310, C643-62.
- DERMAN, A. I., PUZISS, J. W., BASSFORD, P. J., JR. & BECKWITH, J. 1993. A signal sequence is not required for protein export in prlA mutants of Escherichia coli. *EMBO J*, 12, 879-88.
- DESHAIES, R. J., KOCH, B. D., WERNER-WASHBURNE, M., CRAIG, E. A. & SCHEKMAN, R. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, 332, 800-5.
- DESHAIES, R. J. & SCHEKMAN, R. 1990. Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol*, 10, 6024-35.
- DI LEVA, F., DOMI, T., FEDRIZZI, L., LIM, D. & CARAFOLI, E. 2008. The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys*, 476, 65-74.
- DOAN, N. T., PAULSEN, E. S., SEHGAL, P., MOLLER, J. V., NISSEN, P., DENMEADE, S. R., ISAACS, J. T., DIONNE, C. A. & CHRISTENSEN, S. B. 2015. Targeting thapsigargin towards tumors. *Steroids*, 97, 2-7.
- DOLMETSCH, R. E., LEWIS, R. S., GOODNOW, C. C. & HEALY, J. I. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, 386, 855-8.
- DORNER, A. J. & KAUFMAN, R. J. 1994. The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. *Biologicals*, 22, 103-12.
- DORNER, A. J., WASLEY, L. C. & KAUFMAN, R. J. 1990. Protein dissociation from GRP78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7429-32.
- DREMINA, E. S., SHAROV, V. S., KUMAR, K., ZAIDI, A., MICHAELIS, E. K. & SCHONEICH, C. 2004. Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). *Biochem J*, 383, 361-70.
- DRENTH, J. P., MARTINA, J. A., VAN DE KERKHOFF, R., BONIFACINO, J. S. & JANSEN, J. B. 2005. Polycystic liver disease is a disorder of cotranslational protein processing. *Trends Mol Med*, 11, 37-42.
- DRESES-WERRINGLOER, U., LAMBERT, J. C., VINGTDEUX, V., ZHAO, H., VAIS, H., SIEBERT, A., JAIN, A., KOPPEL, J., ROVELET-LECRUX, A., HANNEQUIN, D., PASQUIER, F., GALIMBERTI, D., SCARPINI, E., MANN, D., LENDON, C., CAMPION, D., AMOUYEL, P., DAVIES, P., FOSKETT, J. K., CAMPAGNE, F. & MARAMBAUD, P. 2008. A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*, 133, 1149-61.
- DRUMMOND, D. A. & WILKE, C. O. 2008. Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution. *Cell*, 134, 341-52.
- DU PLESSIS, D. J., NOUWEN, N. & DRIESSEN, A. J. 2011. The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 851-65.
- DUDEK, J., BENEDIX, J., CAPPEL, S., GREINER, M., JALAL, C., MULLER, L. & ZIMMERMANN, R. 2009. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1556-69.
- DUDEK, J., PFEFFER, S., LEE, P. H., JUNG, M., CAVALIE, A., HELMS, V., FORSTER, F. & ZIMMERMANN, R. 2015. Protein transport into the human endoplasmic reticulum. *J Mol Biol*, 427, 1159-75.
- DUEE, E. D. & VIGNAIS, P. V. 1969. Kinetics and specificity of the adenine nucleotide translocation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 244, 3920-31.

- DUNN, T., GABLE, K. & BEELER, T. 1994. Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. *J Biol Chem*, 269, 7273-8.
- ECKENRODE, E. F., YANG, J., VELMURUGAN, G. V., FOSKETT, J. K. & WHITE, C. 2010. Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem*, 285, 13678-84.
- EFREMOV, R. G., LEITNER, A., AEBERSOLD, R. & RAUNSER, S. 2015. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature*, 517, 39-43.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ELLSGAARD, L., MCCAUL, N., CHATSISVILI, A. & BRAAKMAN, I. 2016. Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER. *Traffic*, 17, 615-38.
- ELLSGAARD, L., MOLINARI, M. & HELENIUS, A. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, 286, 1882-8.
- EMR, S. D., HANLEY-WAY, S. & SILHAVY, T. J. 1981. Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell*, 23, 79-88.
- ERDMANN, F., SCHAUBLE, N., LANG, S., JUNG, M., HONIGMANN, A., AHMAD, M., DUDEK, J., BENEDIX, J., HARSMAN, A., KOPP, A., HELMS, V., CAVALIE, A., WAGNER, R. & ZIMMERMANN, R. 2011. Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 30, 17-31.
- ESCHRICH, S., YANG, I., BLOOM, G., KWONG, K. Y., BOULWARE, D., CANTOR, A., COPPOLA, D., KRUIHOFFER, M., AALTONEN, L., ORNTOFT, T. F., QUACKENBUSH, J. & YEATMAN, T. J. 2005. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*, 23, 3526-35.
- ESTRELLA, V., CHEN, T., LLOYD, M., WOJTKOWIAK, J., CORNNELL, H. H., IBRAHIM-HASHIM, A., BAILEY, K., BALAGURUNATHAN, Y., ROTHBERG, J. M., SLOANE, B. F., JOHNSON, J., GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. 2013. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*, 73, 1524-35.
- FALCIERI, E., MARTELLI, A. M., BAREGGI, R., CATALDI, A. & COCCO, L. 1993. The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun*, 193, 19-25.
- FALCONE, D., HENDERSON, M. P., NIEUWLAND, H., COUGHLAN, C. M., BRODSKY, J. L. & ANDREWS, D. W. 2011. Stability and function of the Sec61 translocation complex depends on the Sss1p tail-anchor sequence. *Biochem J*, 436, 291-303.
- FAN, G., BAKER, M. L., WANG, Z., BAKER, M. R., SINYAGOVSKIY, P. A., CHIU, W., LUDTKE, S. J. & SERYSHEVA, II 2015. Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. *Nature*, 527, 336-41.
- FAN, J. Q., ISHII, S., ASANO, N. & SUZUKI, Y. 1999. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med*, 5, 112-5.
- FARAH, C. A. & SOSSIN, W. S. 2012. The role of C2 domains in PKC signaling. *Adv Exp Med Biol*, 740, 663-83.
- FECHER-TROST, C., WISSENBACH, U., BECK, A., SCHALKOWSKY, P., STOERGER, C., DOERR, J., DEMBEK, A., SIMON-THOMAS, M., WEBER, A., WOLLENBERG, P., RUPPERT, T., MIDDENDORFF, R., MAURER, H. H. & FLOCKERZI, V. 2013. The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG. *J Biol Chem*, 288, 16629-44.
- FEDELES, S. V., TIAN, X., GALLAGHER, A. R., MITOBE, M., NISHIO, S., LEE, S. H., CAI, Y., GENG, L., CREWS, C. M. & SOMLO, S. 2011. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet*, 43, 639-47.
- FENG, D., ZHAO, X., SOROMANI, C., TOIKKANEN, J., ROMISCH, K., VEMBAR, S. S., BRODSKY, J. L., KERANEN, S. & JANTTI, J. 2007. The transmembrane domain is sufficient for Sbh1p function, its association with the Sec61 complex, and interaction with Rtn1p. *J Biol Chem*, 282, 30618-28.

- FENG, J., LUCCHINETTI, E., ENKAVI, G., WANG, Y., GEHRIG, P., ROSCHITZKI, B., SCHAUB, M. C., TAJKHORSHID, E., ZAUGG, K. & ZAUGG, M. 2010. Tyrosine phosphorylation by Src within the cavity of the adenine nucleotide translocase 1 regulates ADP/ATP exchange in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298, C740-8.
- FERRER-COSTA, C., OROZCO, M. & DE LA CRUZ, X. 2002. Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties. *J Mol Biol*, 315, 771-86.
- FESKE, S. 2007. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*, 7, 690-702.
- FESKE, S. 2009. ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca²⁺ entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev*, 231, 189-209.
- FESKE, S. 2011. Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Ann N Y Acad Sci*, 1238, 74-90.
- FIERMONTE, G., DE LEONARDIS, F., TODISCO, S., PALMIERI, L., LASORSA, F. M. & PALMIERI, F. 2004. Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem*, 279, 30722-30.
- FILADI, R., BASSO, E., LEFKIMMIATIS, K. & POZZAN, T. 2017a. Beyond Intracellular Signaling: The Ins and Outs of Second Messengers Microdomains. *Adv Exp Med Biol*, 981, 279-322.
- FILADI, R., GREOTTI, E., TURACCHIO, G., LUINI, A., POZZAN, T. & PIZZO, P. 2017b. On the role of Mitofusin 2 in endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E2266-E2267.
- FILADI, R. & POZZAN, T. 2015. Generation and functions of second messengers microdomains. *Cell Calcium*, 58, 405-14.
- FILADI, R., THEUREY, P. & PIZZO, P. 2017c. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium*, 62, 1-15.
- FINKE, K., PLATH, K., PANZNER, S., PREHN, S., RAPOPORT, T. A., HARTMANN, E. & SOMMER, T. 1996. A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J*, 15, 1482-94.
- FIGLIORE, C., TREZEGUET, V., LE SAUX, A., ROUX, P., SCHWIMMER, C., DIANOUX, A. C., NOEL, F., LAUQUIN, G. J., BRANDOLIN, G. & VIGNAIS, P. V. 1998. The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie*, 80, 137-50.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- FLAHERTY, K. M., DELUCA-FLAHERTY, C. & MCKAY, D. B. 1990. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346, 623-8.
- FLAVENY, C. A., GRIFFETT, K., EL-GENDY BEL, D., KAZANTZIS, M., SENGUPTA, M., AMELIO, A. L., CHATTERJEE, A., WALKER, J., SOLT, L. A., KAMENECKA, T. M. & BURRIS, T. P. 2015. Broad Anti-tumor Activity of a Small Molecule that Selectively Targets the Warburg Effect and Lipogenesis. *Cancer Cell*, 28, 42-56.
- FLOURAKIS, M., VAN COPPENOLLE, F., LEHEN'KYI, V., BECK, B., SKRYMA, R. & PREVARSKAYA, N. 2006. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J*, 20, 1215-7.
- FLYNN, G. C., POHL, J., FLOCCO, M. T. & ROTHMAN, J. E. 1991. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 353, 726-30.
- FOERSTER, C., VOELXEN, N., RAKHMANOV, M., KELLER, B., GUTENBERGER, S., GOLDACKER, S., THIEL, J., FESKE, S., PETER, H. H. & WARNATZ, K. 2010. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol*, 184, 7305-13.
- FONS, R. D., BOGERT, B. A. & HEGDE, R. S. 2003. Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol*, 160, 529-39.

- FORSTER, F. & HEGERL, R. 2007. Structure determination in situ by averaging of tomograms. *Methods Cell Biol*, 79, 741-67.
- FOSKETT, J. K. & MAK, D. O. 2004. Novel model of calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate regulation of InsP3 receptor channel gating in native endoplasmic reticulum. *Biol Res*, 37, 513-9.
- FOYOUZI-YOUSSEFI, R., ARNAUDEAU, S., BORNER, C., KELLEY, W. L., TSCHOPP, J., LEW, D. P., DEMAUREX, N. & KRAUSE, K. H. 2000. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5723-8.
- FRASSON, M., VITADELLO, M., BRUNATI, A. M., LA ROCCA, N., TIBALDI, E., PINNA, L. A., GORZA, L. & DONELLA-DEANA, A. 2009. Grp94 is Tyr-phosphorylated by Fyn in the lumen of the endoplasmic reticulum and translocates to Golgi in differentiating myoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 239-52.
- FREIDEN, P. J., GAUT, J. R. & HENDERSHOT, L. M. 1992. Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *EMBO J*, 11, 63-70.
- FRENKEL, Z., SHENKMAN, M., KONDRATYEV, M. & LEDERKREMER, G. Z. 2004. Separate roles and different routing of calnexin and ERp57 in endoplasmic reticulum quality control revealed by interactions with asialoglycoprotein receptor chains. *Mol Biol Cell*, 15, 2133-42.
- FRIBLEY, A., ZHANG, K. & KAUFMAN, R. J. 2009. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. *Methods Mol Biol*, 559, 191-204.
- FRIED, A. J. & BONILLA, F. A. 2009. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev*, 22, 396-414.
- FRIEDMAN, J. R. & VOELTZ, G. K. 2011. The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol*, 21, 709-17.
- FRITZ, J. M. & WEAVER, T. E. 2014. The BiP cochaperone ERdj4 is required for B cell development and function. *PLoS One*, 9, e107473.
- FU, S., YANG, L., LI, P., HOFMANN, O., DICKER, L., HIDE, W., LIN, X., WATKINS, S. M., IVANOV, A. R. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2011. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*, 473, 528-31.
- FUMAGALLI, F., NOACK, J., BERGMANN, T. J., CEBOLLERO, E., PISONI, G. B., FASANA, E., FREGNO, I., GALLI, C., LOI, M., SOLDA, T., D'ANTUONO, R., RAIMONDI, A., JUNG, M., MELNYK, A., SCHORR, S., SCHREIBER, A., SIMONELLI, L., VARANI, L., WILSON-ZBINDEN, C., ZERBE, O., HOFMANN, K., PETER, M., QUADRONI, M., ZIMMERMANN, R. & MOLINARI, M. 2016. Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. *Nat Cell Biol*, 18, 1173-1184.
- FURUICHI, T., YOSHIKAWA, S., MIYAWAKI, A., WADA, K., MAEDA, N. & MIKOSHIBA, K. 1989. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature*, 342, 32-8.
- GALIONE, A., LEE, H. C. & BUSA, W. B. 1991. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*, 253, 1143-6.
- GALLEGO-SANDIN, S., ALONSO, M. T. & GARCIA-SANCHO, J. 2011. Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress. *Biochem J*, 437, 469-75.
- GASS, J. N., GIFFORD, N. M. & BREWER, J. W. 2002. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem*, 277, 49047-54.
- GASS, J. N., JIANG, H. Y., WEK, R. C. & BREWER, J. W. 2008. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells. *Mol Immunol*, 45, 1035-43.
- GERVASIO, O. L., WHITEHEAD, N. P., YEUNG, E. W., PHILLIPS, W. D. & ALLEN, D. G. 2008. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Sci*, 121, 2246-55.
- GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. 1990. Transport and assembly processes in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Biol*, 1, 65-72.
- GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355, 33-45.
- GIACOMELLO, M., DRAGO, I., BORTOLOZZI, M., SCORZETO, M., GIANELLE, A., PIZZO, P. & POZZAN, T. 2010. Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺

- mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Mol Cell*, 38, 280-90.
- GIACOMELLO, M., DRAGO, I., PIZZO, P. & POZZAN, T. 2007. Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ*, 14, 1267-74.
- GIACOMELLO, M. & PELLEGRINI, L. 2016. The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ*, 23, 1417-27.
- GIORGI, C., BALDASSARI, F., BONONI, A., BONORA, M., DE MARCHI, E., MARCHI, S., MISSIROLI, S., PATERGNANI, S., RIMESSI, A., SUSKI, J. M., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2012. Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell Calcium*, 52, 36-43.
- GOGALA, M., BECKER, T., BEATRIX, B., ARMACHE, J. P., BARRIO-GARCIA, C., BERNINGHAUSEN, O. & BECKMANN, R. 2014. Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature*, 506, 107-10.
- GORLICH, D., HARTMANN, E., PREHN, S. & RAPOPORT, T. A. 1992a. A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*, 357, 47-52.
- GORLICH, D., PREHN, S., HARTMANN, E., KALIES, K. U. & RAPOPORT, T. A. 1992b. A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, 71, 489-503.
- GORLICH, D. & RAPOPORT, T. A. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75, 615-30.
- GOWANS, G. J., HAWLEY, S. A., ROSS, F. A. & HARDIE, D. G. 2013. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab*, 18, 556-66.
- GRABOWSKI, G. A. 2008. Treatment perspectives for the lysosomal storage diseases. *Expert Opin Emerg Drugs*, 13, 197-211.
- GRAYSON, M. 2016. Lysosomal storage disorders. *Nature*, 537, S145.
- GREENFIELD, J. J. & HIGH, S. 1999. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci*, 112 (Pt 10), 1477-86.
- GREINER, M., KREUTZER, B., LANG, S., JUNG, V., CAVALIE, A., UNTEREGGER, G., ZIMMERMANN, R. & WULLICH, B. 2011. Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *Prostate*, 71, 1074-83.
- GRIFFITHS, E. J. & RUTTER, G. A. 2009. Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1324-33.
- GRUMATI, P., MOROZZI, G., HOLPER, S., MARI, M., HARWARDT, M. I., YAN, R., MULLER, S., REGGIORI, F., HEILEMANN, M. & DIKIC, I. 2017. Full length RTN3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy. *Elife*, 6.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-50.
- GUDLUR, A., QUINTANA, A., ZHOU, Y., HIRVE, N., MAHAPATRA, S. & HOGAN, P. G. 2014. STIM1 triggers a gating rearrangement at the extracellular mouth of the ORAI1 channel. *Nat Commun*, 5, 5164.
- GUILLEN, E. & HIRSCHBERG, C. B. 1995. Transport of adenosine triphosphate into endoplasmic reticulum proteoliposomes. *Biochemistry*, 34, 5472-6.
- GULTEKIN, H. & HEERMANN, K. H. 1988. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem*, 172, 320-9.
- GUO, F. & SNAPP, E. L. 2013. ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells. *J Cell Sci*, 126, 1429-39.
- GWINN, D. M., SHACKELFORD, D. B., EGAN, D. F., MIHAYLOVA, M. M., MERY, A., VASQUEZ, D. S., TURK, B. E. & SHAW, R. J. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-26.
- HAAS, I. G. & WABL, M. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, 306, 387-9.
- HALPERIN, L., JUNG, J. & MICHALAK, M. 2014. The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. *IUBMB Life*, 66, 318-26.
- HAMANAKA, R. B. & CHANDEL, N. S. 2011. Cell biology. Warburg effect and redox balance. *Science*, 334, 1219-20.

- HAMMADI, M., OULIDI, A., GACKIERE, F., KATSOGIANNOU, M., SLOMIANNY, C., ROUDBARAKI, M., DEWAILLY, E., DELCOURT, P., LEPAGE, G., LOTTEAU, S., DUCREUX, S., PREVARSKAYA, N. & VAN COPPENOLLE, F. 2013. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J*, 27, 1600-9.
- HAMMAN, B. D., CHEN, J. C., JOHNSON, E. E. & JOHNSON, A. E. 1997. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell*, 89, 535-44.
- HAMMAN, B. D., HENDERSHOT, L. M. & JOHNSON, A. E. 1998. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, 92, 747-58.
- HAMMOND, C., BRAAKMAN, I. & HELENIUS, A. 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 913-7.
- HAMMOND, C. & HELENIUS, A. 1994a. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science*, 266, 456-8.
- HAMMOND, C. & HELENIUS, A. 1994b. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 126, 41-52.
- HANEIN, D., MATLACK, K. E., JUNGNICKEL, B., PLATH, K., KALIES, K. U., MILLER, K. R., RAPOPORT, T. A. & AKEY, C. W. 1996. Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, 87, 721-32.
- HAO, L., RIGAUD, J. L. & INESI, G. 1994. Ca²⁺/H⁺ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. *J Biol Chem*, 269, 14268-75.
- HARA, T., MAHADEVAN, J., KANEKURA, K., HARA, M., LU, S. & URANO, F. 2014. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to beta-cell death. *Endocrinology*, 155, 758-68.
- HARDIE, D. G. 2014. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annu Rev Nutr*, 34, 31-55.
- HARDIE, D. G. & ASHFORD, M. L. 2014. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda)*, 29, 99-107.
- HARDIE, D. G., ROSS, F. A. & HAWLEY, S. A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 251-62.
- HARDING, H. P., ZENG, H., ZHANG, Y., JUNGRIES, R., CHUNG, P., PLESKEN, H., SABATINI, D. D. & RON, D. 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*, 7, 1153-63.
- HARDING, H. P., 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, 897-904.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P. D., CALFON, M., SADRI, N., YUN, C., POPKO, B., PAULES, R., STOJDL, D. F., BELL, J. C., HETTMANN, T., LEIDEN, J. M. & RON, D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-33.
- HARDINGHAM, G. E. & BADING, H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11, 682-96.
- HARTL, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-9.
- HARTL, F. U. & HAYER-HARTL, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 574-81.
- HARTMANN, E., SOMMER, T., PREHN, S., GORLICH, D., JENTSCH, S. & RAPOPORT, T. A. 1994. Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*, 367, 654-7.
- HABDENTEUFEL, S., JOHNSON, N., PATON, A. W., PATON, J. C., 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, 1373-1386.

- HABDENTEUFEL, S., KLEIN, M. C., MELNYK, A. & ZIMMERMANN, R. 2014. Protein transport into the human ER and related diseases, Sec61-channelopathies. *Biochem Cell Biol*, 92, 499-509.
- HABDENTEUFEL, S., SICKING, M., SCHORR, S., AVIRAM, N., FECHER-TROST, C., SCHULDINER, M., JUNG, M., ZIMMERMANN, R. & LANG, S. 2017. hSnd2 protein represents an alternative targeting factor to the endoplasmic reticulum in human cells. *FEBS Lett*, 591, 3211-3224.
- HAWLEY, S. A., BOUDEAU, J., REID, J. L., MUSTARD, K. J., UDD, L., MAKELA, T. P., ALESSI, D. R. & HARDIE, D. G. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2, 28.
- HAWLEY, S. A., DAVISON, M., WOODS, A., DAVIES, S. P., BERI, R. K., CARLING, D. & HARDIE, D. G. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271, 27879-87.
- HAWLEY, S. A., PAN, D. A., MUSTARD, K. J., ROSS, L., BAIN, J., EDELMAN, A. M., FRENGUELLI, B. G. & HARDIE, D. G. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2, 9-19.
- HAYASHI, T., MARTONE, M. E., YU, Z., THOR, A., DOI, M., HOLST, M. J., ELLISMAN, M. H. & HOSHIIJIMA, M. 2009. Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J Cell Sci*, 122, 1005-13.
- HAZE, K., YOSHIDA, H., YANAGI, H., YURA, T. & MORI, K. 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 10, 3787-99.
- HEALY, J. I., DOLMETSCH, R. E., TIMMERMAN, L. A., CYSTER, J. G., THOMAS, M. L., CRABTREE, G. R., LEWIS, R. S. & GOODNOW, C. C. 1997. Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling. *Immunity*, 6, 419-28.
- HEDIGER, M. A., CLEMENCON, B., BURRIER, R. E. & BRUFORD, E. A. 2013. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med*, 34, 95-107.
- HEGDE, R. S., VOIGT, S., RAPOPORT, T. A. & LINGAPPA, V. R. 1998. TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell*, 92, 621-31.
- HEIN, M. Y., HUBNER, N. C., POSER, I., COX, J., NAGARAJ, N., TOYODA, Y., GAK, I. A., WEISSWANGE, I., MANSFELD, J., BUCHHOLZ, F., HYMAN, A. A. & MANN, M. 2015. A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances. *Cell*, 163, 712-23.
- HEINTZMANN, R. 2003. Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns. *Micron*, 34, 283-91.
- HEINTZMANN, R. & BENEDETTI, P. A. 2006. High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation. *Appl Opt*, 45, 5037-45.
- HEINTZMANN, R. & FICZ, G. 2006. Breaking the resolution limit in light microscopy. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5, 289-301.
- HELENIUS, A., MARQUARDT, T. & BRAAKMAN, I. 1992. The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol*, 2, 227-31.
- HELLE, S. C., KANFER, G., KOLAR, K., LANG, A., MICHEL, A. H. & KORNMANN, B. 2013. Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2526-41.
- HEMON, P., RENAUDINEAU, Y., DEBANT, M., LE GOUX, N., MUKHERJEE, S., BROOKS, W. & MIGNEN, O. 2017. Calcium Signaling: From Normal B Cell Development to Tolerance Breakdown and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 53, 141-165.
- HENDERSHOT, L. M. 2004. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, 71, 289-97.
- HERITAGE, D. & WONDERLIN, W. F. 2001. Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *J Biol Chem*, 276, 22655-62.

- HETZ, C., CHEVET, E. & OAKES, S. A. 2015. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*, 17, 829-38.
- HETZ, C. & PAPA, F. R. 2018. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*, 69, 169-181.
- HIGH, S., LECOMTE, F. J., RUSSELL, S. J., ABELL, B. M. & OLIVER, J. D. 2000. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett*, 476, 38-41.
- HIGH, S. & STIRLING, C. J. 1993. Protein translocation across membranes: common themes in divergent organisms. *Trends Cell Biol*, 3, 335-9.
- HIRSCHBERG, C. B., ROBBINS, P. W. & ABEIJON, C. 1998. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem*, 67, 49-69.
- HOFER, A. M., CURCI, S., MACHEN, T. E. & SCHULZ, I. 1996. ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. *FASEB J*, 10, 302-8.
- HOGAN, P. G. 2015. The STIM1-ORAI1 microdomain. *Cell Calcium*, 58, 357-67.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. & GELFAND, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7276-80.
- HOLLIEN, J., LIN, J. H., LI, H., STEVENS, N., WALTER, P. & WEISSMAN, J. S. 2009. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*, 186, 323-31.
- HOLLIEN, J. & WEISSMAN, J. S. 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 313, 104-7.
- HOLMES, B. F., KURTH-KRACZEK, E. J. & WINDER, W. W. 1999. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 87, 1990-5.
- HOPPE, S., BIERHOFF, H., CADO, I., WEBER, A., TIEBE, M., GRUMMT, I. & VOIT, R. 2009. AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17781-6.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 140, 900-17.
- HSU, P. P. & SABATINI, D. M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134, 703-7.
- HU, P., HAN, Z., COUVILLON, A. D., KAUFMAN, R. J. & EXTON, J. H. 2006. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol*, 26, 3071-84.
- HURLEY, R. L., ANDERSON, K. A., FRANZONE, J. M., KEMP, B. E., MEANS, A. R. & WITTERS, L. A. 2005. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem*, 280, 29060-6.
- HURTLEY, S. M., BOLE, D. G., HOOVER-LITTY, H., HELENIUS, A. & COPELAND, C. S. 1989. Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol*, 108, 2117-26.
- HURTLEY, S. M. & HELENIUS, A. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 277-307.
- HUTVAGNER, G. & SIMARD, M. J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 22-32.
- IMAMURA, H., NHAT, K. P., TOGAWA, H., SAITO, K., IINO, R., KATO-YAMADA, Y., NAGAI, T. & NOJI, H. 2009. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15651-6.
- INESI, G. & TADINI-BUONINSEGNI, F. 2014. Ca(2+)/H(+) exchange, luminal Ca(2+) release and Ca(2+)/ATP coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Cell Commun Signal*, 8, 5-11.
- ISHIKAWA, M., IWAMOTO, T., NAKAMURA, T., DOYLE, A., FUKUMOTO, S. & YAMADA, Y. 2011. Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol*, 193, 1257-74.

- IVANOVA, H., VERVLIET, T., MISSIAEN, L., PARYS, J. B., DE SMEDT, H. & BULTYNCK, G. 2014. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2164-83.
- IWAKOSHI, N. N., PYPAERT, M. & GLIMCHER, L. H. 2007. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med*, 204, 2267-75.
- IWAWAKI, T., AKAI, R. & KOHNO, K. 2010. IRE1alpha disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level. *PLoS One*, 5, e13052.
- JACQUIER, N., CHOUDHARY, V., MARI, M., TOULMAY, A., REGGIORI, F. & SCHNEITER, R. 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 124, 2424-37.
- JAGER, S., HANDSCHIN, C., ST-PIERRE, J. & SPIEGELMAN, B. M. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 12017-22.
- JAISWAL, J. K. 2001. Calcium - how and why? *J Biosci*, 26, 357-63.
- JIANG, J., MAES, E. G., TAYLOR, A. B., WANG, L., HINCK, A. P., LAFER, E. M. & SOUSA, R. 2007. Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol Cell*, 28, 422-33.
- JOHN, L. M., LECHLEITER, J. D. & CAMACHO, P. 1998. Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol*, 142, 963-73.
- JOHNSON, N., HASSDENTEUFEL, S., THEIS, M., PATON, A. W., PATON, J. C., ZIMMERMANN, R. & HIGH, S. 2013. The signal sequence influences post-translational ER translocation at distinct stages. *PLoS One*, 8, e75394.
- JOHNSON, N., VILARDI, F., LANG, S., LEZNICKI, P., ZIMMERMANN, R. & HIGH, S. 2012. TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci*, 125, 3612-20.
- JORGENSEN, S. B., NIELSEN, J. N., BIRK, J. B., OLSEN, G. S., VIOLLET, B., ANDREELLI, F., SCHJERLING, P., VAULONT, S., HARDIE, D. G., HANSEN, B. F., RICHTER, E. A. & WOJTASZEWSKI, J. F. 2004. The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. *Diabetes*, 53, 3074-81.
- JUNG, V., KINDICH, R., KAMRADT, J., JUNG, M., MULLER, M., SCHULZ, W. A., ENGERS, R., UNTEREGGER, G., STOCKLE, M., ZIMMERMANN, R. & WULLICH, B. 2006. Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res*, 4, 169-76.
- JUNGNICKEL, B. & RAPOPORT, T. A. 1995. A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 82, 261-70.
- JUNNE, T., KOCIK, L. & SPIESS, M. 2010. The hydrophobic core of the Sec61 translocon defines the hydrophobicity threshold for membrane integration. *Mol Biol Cell*, 21, 1662-70.
- JUNNE, T., SCHWEDE, T., GODER, V. & SPIESS, M. 2007. Mutations in the Sec61p channel affecting signal sequence recognition and membrane protein topology. *J Biol Chem*, 282, 33201-9.
- KAINUMA, M., CHIBA, Y., TAKEUCHI, M. & JIGAMI, Y. 2001. Overexpression of HUT1 gene stimulates in vivo galactosylation by enhancing UDP-galactose transport activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18, 533-41.
- KAMAUCHI, S., NAKATANI, H., NAKANO, C. & URADE, R. 2005. Gene expression in response to endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J*, 272, 3461-76.
- KAMPINGA, H. H. & CRAIG, E. A. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 579-92.
- KANAI, Y., CLEMENCON, B., SIMONIN, A., LEUENBERGER, M., LOCHNER, M., WEISSTANNER, M. & HEDIGER, M. A. 2013. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Mol Aspects Med*, 34, 108-20.
- KAUFMAN, R. J. 2002. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110, 1389-98.
- KAUFMAN, R. J. & MALHOTRA, J. D. 2014. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2233-9.

- KAWASAKI, H., NAKAYAMA, S. & KRETSINGER, R. H. 1998. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals*, 11, 277-95.
- KELLEY, L. A., MEZULIS, S., YATES, C. M., WASS, M. N. & STERNBERG, M. J. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10, 845-58.
- KELLY, J. W. & BALCH, W. E. 2006. The integration of cell and chemical biology in protein folding. *Nat Chem Biol*, 2, 224-7.
- KENNEDY, E. P. & LEHNINGER, A. L. 1949. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*, 179, 957-72.
- KIEWITZ, R., ACKLIN, C., SCHAFFER, B. W., MACO, B., UHRIK, B., WUYTACK, F., ERNE, P. & HEIZMANN, C. W. 2003. Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 550-7.
- KIHARA, A., AKIYAMA, Y. & ITO, K. 1995. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4532-6.
- KIM, H. R., LEE, G. H., HA, K. C., AHN, T., MOON, J. Y., LEE, B. J., CHO, S. G., KIM, S., SEO, Y. R., SHIN, Y. J., CHAE, S. W., REED, J. C. & CHAE, H. J. 2008. Bax Inhibitor-1 Is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 283, 15946-55.
- KIM, S. H., SHIN, S. J. & PARK, J. S. 1996. Identification of the ATP transporter of rat liver rough endoplasmic reticulum via photoaffinity labeling and partial purification. *Biochemistry*, 35, 5418-25.
- KIMBERLY, W. T., ESLER, W. P., YE, W., OSTASZEWSKI, B. L., GAO, J., DIEHL, T., SELKOE, D. J. & WOLFE, M. S. 2003a. Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s). *Biochemistry*, 42, 137-44.
- KIMBERLY, W. T., LAVOIE, M. J., OSTASZEWSKI, B. L., YE, W., WOLFE, M. S. & SELKOE, D. J. 2003b. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6382-7.
- KIRK, S. J., CLIFF, J. M., THOMAS, J. A. & WARD, T. H. 2010. Biogenesis of secretory organelles during B cell differentiation. *J Leukoc Biol*, 87, 245-55.
- KIVILUOTO, S., VERVLIET, T., IVANOVA, H., DECUYPERE, J. P., DE SMEDT, H., MISSIAEN, L., BULTYNCK, G. & PARYS, J. B. 2013. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1612-24.
- KLAPPA, P., MAYINGER, P., PIPKORN, R., ZIMMERMANN, M. & ZIMMERMANN, R. 1991. A microsomal protein is involved in ATP-dependent transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *EMBO J*, 10, 2795-803.
- KLEIN, M. C., ZIMMERMANN, K., SCHORR, S., LANDINI, M., KLEMENS, P. A. W., ALTENSELL, J., JUNG, M., KRAUSE, E., NGUYEN, D., HELMS, V., RETTIG, J., FECHER-TROST, C., CAVALIÉ, A., HOTH, M., BOGESKI, I., NEUHAUS, H. E., ZIMMERMANN, R., LANG, S. & HAFERKAMP, I. 2018. AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum. *Nat Commun*, 9, 3489.
- KLINGENBERG, M. 1979. Overview of mitochondrial metabolite transport systems. *Methods Enzymol*, 56, 245-52.
- KLINGENBERG, M. 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1978-2021.
- KLINGENBERG, M. & ROTTENBERG, H. 1977. Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane. *Eur J Biochem*, 73, 125-30.
- KNITTLER, M. R., DIRKS, S. & HAAS, I. G. 1995. Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1764-8.
- KNOLL M., R. E. 1932. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, Band 78, S. 318–339.

- KOCHENDORFER, K. U., THEN, A. R., KEARNS, B. G., BANKAITIS, V. A. & MAYINGER, P. 1999. Sac1p plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *EMBO J*, 18, 1506-15.
- KORBEL, C., LINXWEILER, M., BOCHEN, F., WEMMERT, S., SCHICK, B., MEYER, M., MAURER, H., MENGER, M. D., ZIMMERMANN, R. & GREINER, M. 2018. Treatment of SEC62 over-expressing tumors by Thapsigargin and Trifluoperazine. *Biomol Concepts*, 9, 53-63.
- KORNMANN, B. & WALTER, P. 2010. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*, 123, 1389-93.
- KOTLARZ, D., ZIETARA, N., UZEL, G., WEIDEMANN, T., BRAUN, C. J., DIESTELHORST, J., KRAWITZ, P. M., ROBINSON, P. N., HECHT, J., PUCHALKA, J., GERTZ, E. M., SCHAFFER, A. A., LAWRENCE, M. G., KARDAVA, L., PFEIFER, D., BAUMANN, U., PFISTER, E. D., HANSON, E. P., SCHAMBACH, A., JACOBS, R., KREIPE, H., MOIR, S., MILNER, J. D., SCHWILLE, P., MUNDLOS, S. & KLEIN, C. 2013. Loss-of-function mutations in the IL-21 receptor gene cause a primary immunodeficiency syndrome. *J Exp Med*, 210, 433-43.
- KRAMER, R. & KLINGENBERG, M. 1977. Reconstitution of adenine nucleotide transport with purified ADP, ATP-carrier protein. *FEBS Lett*, 82, 363-7.
- KREBS, H. A. 1940. The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J*, 34, 775-9.
- KREBS, J., AGELLON, L. B. & MICHALAK, M. 2015. Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 114-21.
- KUNJI, E. R., ALEKSANDROVA, A., KING, M. S., MAJD, H., ASHTON, V. L., CERSON, E., SPRINGETT, R., KIBALCHENKO, M., TAVOULARI, S., CRICHTON, P. G. & RUPRECHT, J. J. 2016. The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2379-93.
- KUO, T. H., KIM, H. R., ZHU, L., YU, Y., LIN, H. M. & TSANG, W. 1998. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene*, 17, 1903-10.
- KUROSAKI, T. & HIKIDA, M. 2009. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev*, 228, 132-48.
- KUTAY, U., HARTMANN, E. & RAPOPORT, T. A. 1993. A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol*, 3, 72-5.
- LADIGES, W. C., KNOBLAUGH, S. E., MORTON, J. F., KORTH, M. J., SOPHER, B. L., BASKIN, C. R., MACAULEY, A., GOODMAN, A. G., LEOEUF, R. C. & KATZE, M. G. 2005. Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. *Diabetes*, 54, 1074-81.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAKKARAJU, A. K., THANKAPPAN, R., MARY, C., GARRISON, J. L., TAUNTON, J. & STRUB, K. 2012. Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell*, 23, 2712-22.
- LANG, S., BENEDIX, J., FEDELES, S. V., SCHORR, S., SCHIRRA, C., SCHAUBLE, N., JALAL, C., GREINER, M., HASSDENTEUFEL, S., TATZELT, J., KREUTZER, B., EDELMANN, L., KRAUSE, E., RETTIG, J., SOMLO, S., ZIMMERMANN, R. & DUDEK, J. 2012. Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci*, 125, 1958-69.
- LANG, S., ERDMANN, F., JUNG, M., WAGNER, R., CAVALIE, A. & ZIMMERMANN, R. 2011a. Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels (Austin)*, 5, 228-35.
- LANG, S., PFEFFER, S., LEE, P. H., CAVALIE, A., HELMS, V., FORSTER, F. & ZIMMERMANN, R. 2017. An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front Physiol*, 8, 887.
- LANG, S., SCHAUBLE, N., CAVALIE, A. & ZIMMERMANN, R. 2011b. Live cell calcium imaging combined with siRNA mediated gene silencing identifies Ca(2)(+) leak channels in the ER membrane and their regulatory mechanisms. *J Vis Exp*, e2730.

- LEBECHE, D., LUCERO, H. A. & KAMINER, B. 1994. Calcium binding properties of rabbit liver protein disulfide isomerase. *Biochem Biophys Res Commun*, 202, 556-61.
- LEE, A. H., CHU, G. C., IWAKOSHI, N. N. & GLIMCHER, L. H. 2005. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J*, 24, 4368-80.
- LEE, M. K., SLUNT, H. H., MARTIN, L. J., THINAKARAN, G., KIM, G., GANDY, S. E., SEEGER, M., KOO, E., PRICE, D. L. & SISODIA, S. S. 1996. Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci*, 16, 7513-25.
- LEHNART, S. E., TERRENOIRE, C., REIKEN, S., WEHRENS, X. H., SONG, L. S., TILLMAN, E. J., MANCARELLA, S., COROMILAS, J., LEDERER, W. J., KASS, R. S. & MARKS, A. R. 2006. Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7906-10.
- LEHNINGER B., N. D., COX M. 1993. *Principles of Biochemistry*, Worth, New York, WH Freeman.
- LEROCH, M., NEUHAUS, H. E., KIRCHBERGER, S., ZIMMERMANN, S., MELZER, M., GERHOLD, J. & TJADEN, J. 2008. Identification of a novel adenine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Plant Cell*, 20, 438-51.
- LEV, S. 2010. Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 739-50.
- LEWIS, D., PILANKATTA, R., INESI, G., BARTOLOMMEI, G., MONCELLI, M. R. & TADINI-BUONINSEGNI, F. 2012. Distinctive features of catalytic and transport mechanisms in mammalian sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) and Cu⁺ (ATP7A/B) ATPases. *J Biol Chem*, 287, 32717-27.
- LEWIS, M. J., MAZZARELLA, R. A. & GREEN, M. 1985. Structure and assembly of the endoplasmic reticulum. The synthesis of three major endoplasmic reticulum proteins during lipopolysaccharide-induced differentiation of murine lymphocytes. *J Biol Chem*, 260, 3050-7.
- LI, L., PARK, E., LING, J., INGRAM, J., PLOEGH, H. & RAPOPORT, T. A. 2016. Crystal structure of a substrate-engaged SecY protein-translocation channel. *Nature*, 531, 395-399.
- LI, Y. & CAMACHO, P. 2004. Ca²⁺-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol*, 164, 35-46.
- LI, Y., GE, M., CIANI, L., KURIAKOSE, G., WESTOVER, E. J., DURA, M., COVEY, D. F., FREED, J. H., MAXFIELD, F. R., LYTTON, J. & TABAS, I. 2004. Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem*, 279, 37030-9.
- LIAO, J., LI, H., ZENG, W., SAUER, D. B., BELMARES, R. & JIANG, Y. 2012. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science*, 335, 686-90.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016a. Metabolism: A new layer of glycolysis. *Nat Chem Biol*, 12, 577-8.
- LIBERTI, M. V. & LOCASALE, J. W. 2016b. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.
- LIEVREMONT, J. P., 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 Ca²⁺. *J Biol Chem*, 272, 30873-9.
- LIN, K. I., TUNYAPLIN, C. & CALAME, K. 2003. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev*, 194, 19-28.
- LIN, L., YEE, S. W., KIM, R. B. & GIACOMINI, K. M. 2015. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 14, 543-60.
- LINXWEILER, M., LINXWEILER, J., BARTH, M., BENEDIX, J., JUNG, V., KIM, Y. J., BOHLE, R. M., ZIMMERMANN, R. & GREINER, M. 2012. Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol*, 180, 473-83.
- LINXWEILER, M., SCHORR, S., SCHAUBLE, N., JUNG, M., LINXWEILER, J., LANGER, F., SCHAFERS, H. J., CAVALIE, A., ZIMMERMANN, R. & GREINER, M. 2013. Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a

- clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer*, 13, 574.
- LIU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., JR. & MEYER, T. 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15, 1235-41.
- LISAK, D., SCHACHT, T., GAWLITZA, A., ALBRECHT, P., AKTAS, O., KOOP, B., GLIEM, M., HOFSTETTER, H. H., ZANGER, K., BULTYNCK, G., PARYS, J. B., DE SMEDT, H., KINDLER, T., ADAMS-QUACK, P., HAHN, M., WAISMAN, A., REED, J. C., HOVELMEYER, N. & METHNER, A. 2016. BAX inhibitor-1 is a Ca(2+) channel critically important for immune cell function and survival. *Cell Death Differ*, 23, 358-68.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LLOYD, D. J., WHEELER, M. C. & GEKAKIS, N. 2010. A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes*, 59, 460-70.
- LOCASALE, J. W. & CANTLEY, L. C. 2011. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab*, 14, 443-51.
- LODISH H., B. A., KAISER C., KRIEGER M., SCOTT M., BRETSCHER A. 2008. *Molecular Cell Biology*, New York, W. H. Freeman and Company.
- LOMAX, R. B., CAMELLO, C., VAN COPPENOLLE, F., PETERSEN, O. H. & TEPIKIN, A. V. 2002. Basal and physiological Ca(2+) leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem*, 277, 26479-85.
- LOPEZ-FERRANDO, V., GAZZO, A., DE LA CRUZ, X., OROZCO, M. & GELPI, J. L. 2017. PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Res*, 45, W222-W228.
- LOSFELD, M. E., NG, B. G., KIRCHER, M., BUCKINGHAM, K. J., TURNER, E. H., EROSHKIN, A., SMITH, J. D., SHENDURE, J., NICKERSON, D. A., BAMSHAD, M. J. & FREEZE, H. 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, 1602-5.
- LU, H., FORBES, R. A. & VERMA, A. 2002. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*, 277, 23111-5.
- LU, M., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S., ACOSTA-ALVEAR, D., KIMMIG, P., MENDEZ, A. S., PATON, A. W., PATON, J. C., WALTER, P. & ASHKENAZI, A. 2014. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*, 345, 98-101.
- LU, Z., ZHOU, L., KILLELA, P., RASHEED, A. B., DI, C., POE, W. E., MCLENDON, R. E., BIGNER, D. D., NICCHITTA, C. & YAN, H. 2009. Glioblastoma proto-oncogene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res*, 69, 9105-11.
- LUCEY, B. P., NELSON-REES, W. A. & HUTCHINS, G. M. 2009. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch Pathol Lab Med*, 133, 1463-7.
- LYMAN, S. K. & SCHEKMAN, R. 1997. Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, 88, 85-96.
- LYTTON, J. & MACLENNAN, D. H. 1988. Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem*, 263, 15024-31.
- MACHAMER, C. E., DOMS, R. W., BOLE, D. G., HELENIUS, A. & ROSE, J. K. 1990. Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *J Biol Chem*, 265, 6879-83.
- MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5, 472-84.
- MACLENNAN, D. H. & KRANIAS, E. G. 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 566-77.

- MAEDA, N., NIINOBE, M. & MIKOSHIBA, K. 1990. A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex. *EMBO J*, 9, 61-7.
- MARCHI, S., BITTREMIEUX, M., MISSIROLI, S., MORGANTI, C., PATERGNANI, S., SBANO, L., RIMESSI, A., KERKHOFS, M., PARYS, J. B., BULTYNCK, G., GIORGI, C. & PINTON, P. 2017. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication Through Ca(2+) Signaling: The Importance of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs). *Adv Exp Med Biol*, 997, 49-67.
- MARCINIAK, S. J., YUN, C. Y., OYADOMARI, S., NOVOA, I., ZHANG, Y., JUNGREIS, R., NAGATA, K., HARDING, H. P. & RON, D. 2004. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 18, 3066-77.
- MARGULIS, L. 1981. *Symbiosis in cell evolution*, New York, W. H. Freeman.
- MARINO, M., STOILOVA, T., GIORGI, C., BACHI, A., CATTANEO, A., AURICCHIO, A., PINTON, P. & ZITO, E. 2015. SEPNI1, an endoplasmic reticulum-localized selenoprotein linked to skeletal muscle pathology, counteracts hyperoxidation by means of redox-regulating SERCA2 pump activity. *Hum Mol Genet*, 24, 1843-55.
- MARQUARDT, T. & HELENIUS, A. 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 117, 505-13.
- MARSIN, A. S., BERTRAND, L., RIDER, M. H., DEPREZ, J., BEAULOYE, C., VINCENT, M. F., VAN DEN BERGHE, G., CARLING, D. & HUE, L. 2000. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*, 10, 1247-55.
- MARSIN, A. S., BOUZIN, C., BERTRAND, L. & HUE, L. 2002. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277, 30778-83.
- MARTIN, W. F., GARG, S. & ZIMORSKI, V. 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370, 20140330.
- MARTINEZ, I. M. & CHRISPPEELS, M. J. 2003. Genomic analysis of the unfolded protein response in Arabidopsis shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell*, 15, 561-76.
- MARY, C., SCHERRER, A., HUCK, L., LAKKARAJU, A. K., THOMAS, Y., JOHNSON, A. E. & STRUB, K. 2010. Residues in SRP9/14 essential for elongation arrest activity of the signal recognition particle define a positively charged functional domain on one side of the protein. *RNA*, 16, 969-79.
- MATHUPALA, S. P., KO, Y. H. & PEDERSEN, P. L. 2010. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 1225-30.
- MATLACK, K. E., MOTHES, W. & RAPOPORT, T. A. 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, 92, 381-90.
- MATLACK, K. E., PLATH, K., MISSELWITZ, B. & RAPOPORT, T. A. 1997. Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science*, 277, 938-41.
- MATSUMOTO, M., FUJII, Y., BABA, A., HIKIDA, M., KUROSAKI, T. & BABA, Y. 2011. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity*, 34, 703-14.
- MATTHEWS, G., NEHER, E. & PENNER, R. 1989. Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J Physiol*, 418, 105-30.
- MAYER, M. P. 2013. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci*, 38, 507-14.
- MAYINGER, P., BANKAITIS, V. A. & MEYER, D. I. 1995. Sac1p mediates the adenosine triphosphate transport into yeast endoplasmic reticulum that is required for protein translocation. *J Cell Biol*, 131, 1377-86.
- MAYINGER, P. & MEYER, D. I. 1993. An ATP transporter is required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 12, 659-66.
- MCCAFFREY, K. & BRAAKMAN, I. 2016. Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem*, 60, 227-235.

- MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. 1979. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J*, 180, 533-44.
- MCCORMACK, J. G. & DENTON, R. M. 1990. Intracellular calcium ions and intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism in mammalian tissues. *Proc Nutr Soc*, 49, 57-75.
- MCCULLOUGH, K. D., MARTINDALE, J. L., KLOTZ, L. O., AW, T. Y. & HOLBROOK, N. J. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-59.
- MCCULLOUGH, S. & LUCOCQ, J. 2005. Endoplasmic reticulum positioning and partitioning in mitotic HeLa cells. *J Anat*, 206, 415-25.
- MEISTER, G. & TUSCHL, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-9.
- MELDOLESI, J. & POZZAN, T. 1998a. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*, 23, 10-4.
- MELDOLESI, J. & POZZAN, T. 1998b. The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J Cell Biol*, 142, 1395-8.
- MELNYK, A., RIEGER, H. & ZIMMERMANN, R. 2015. Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum. *Subcell Biochem*, 78, 179-200.
- MERRILL, G. F., KURTH, E. J., HARDIE, D. G. & WINDER, W. W. 1997. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol*, 273, E1107-12.
- MEYER, D. I. & DOBBERSTEIN, B. 1980. Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 87, 503-8.
- MEYER, H. A., GRAU, H., KRAFT, R., KOSTKA, S., PREHN, S., KALIES, K. U. & HARTMANN, E. 2000. Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem*, 275, 14550-7.
- MICHALAK, M., ROBERT PARKER, J. M. & OPAS, M. 2002. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 32, 269-78.
- MIKOSHIBA, K. 2007. The IP3 receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function. *Biochem Soc Symp*, 9-22.
- MINOR, D. L., JR. & FINDEISEN, F. 2010. Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (Ca_v) function and modulation. *Channels (Austin)*, 4, 459-74.
- MISHIBA, K., NAGASHIMA, Y., SUZUKI, E., HAYASHI, N., OGATA, Y., SHIMADA, Y. & KOIZUMI, N. 2013. Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the Arabidopsis unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 5713-8.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-8.
- MOENS, L. & TANGYE, S. G. 2014. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol*, 5, 65.
- MOGAMI, H., TEPIKIN, A. V. & PETERSEN, O. H. 1998. Termination of cytosolic Ca²⁺ signals: Ca²⁺ reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca²⁺ concentration in the store lumen. *EMBO J*, 17, 435-42.
- MOHAMED, F. E., AL-GAZALI, L., AL-JASMI, F. & ALI, B. R. 2017. Pharmaceutical Chaperones and Proteostasis Regulators in the Therapy of Lysosomal Storage Disorders: Current Perspective and Future Promises. *Front Pharmacol*, 8, 448.
- MOHORKO, E., GLOCKSHUBER, R. & AEBI, M. 2011. Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *J Inherit Metab Dis*, 34, 869-78.
- MOORE, G. A., MCCONKEY, D. J., KASS, G. E., O'BRIEN, P. J. & ORRENIUS, S. 1987. 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel inhibitor of liver microsomal Ca²⁺ sequestration. *FEBS Lett*, 224, 331-6.
- MOORE, K. A. & HOLLIEN, J. 2012. The unfolded protein response in secretory cell function. *Annu Rev Genet*, 46, 165-83.
- MORCIANO, G., GIORGI, C., BONORA, M., PUNZETTI, S., PAVASINI, R., WIECKOWSKI, M. R., CAMPO, G. & PINTON, P. 2015. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 78, 142-53.

- MORI, H., TSUKAZAKI, T., MASUI, R., KURAMITSU, S., YOKOYAMA, S., JOHNSON, A. E., KIMURA, Y., AKIYAMA, Y. & ITO, K. 2003. Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J Biol Chem*, 278, 14257-64.
- MORI, K. 2009. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem*, 146, 743-50.
- MORI, Y., SATO, F., SELARU, F. M., OLARU, A., PERRY, K., KIMOS, M. C., TAMURA, G., MATSUBARA, N., WANG, S., XU, Y., YIN, J., ZOU, T. T., LEGGETT, B., YOUNG, J., NUKIWA, T., STINE, O. C., ABRAHAM, J. M., SHIBATA, D. & MELTZER, S. J. 2002. Instability typing reveals unique mutational spectra in microsatellite-unstable gastric cancers. *Cancer Res*, 62, 3641-5.
- MOTHESE, W., PREHN, S. & RAPOPORT, T. A. 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J*, 13, 3973-82.
- MU, T. W., FOWLER, D. M. & KELLY, J. W. 2008. Partial restoration of mutant enzyme homeostasis in three distinct lysosomal storage disease cell lines by altering calcium homeostasis. *PLoS Biol*, 6, e26.
- MUIK, M., FAHRNER, M., SCHINDL, R., STATHOPOULOS, P., FRISCHAUF, I., DERLER, I., PLENK, P., LACKNER, B., GROSCHNER, K., IKURA, M. & ROMANIN, C. 2011. STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *EMBO J*, 30, 1678-89.
- MUIK, M., FRISCHAUF, I., DERLER, I., FAHRNER, M., BERGSMANN, J., EDER, P., SCHINDL, R., HESCH, C., POLZINGER, B., FRITSCH, R., KAHR, H., MADL, J., GRUBER, H., GROSCHNER, K. & ROMANIN, C. 2008. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem*, 283, 8014-22.
- MULLER, L., DE ESCAURIAZA, M. D., LAJOIE, P., THEIS, M., JUNG, M., MULLER, A., BURGARD, C., GREINER, M., SNAPP, E. L., DUDEK, J. & ZIMMERMANN, R. 2010. Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell*, 21, 691-703.
- MUOIO, D. M., SEEFELD, K., WITTERS, L. A. & COLEMAN, R. A. 1999. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*, 338 (Pt 3), 783-91.
- MURRAY, J. I., WHITFIELD, M. L., TRINKLEIN, N. D., MYERS, R. M., BROWN, P. O. & BOTSTEIN, D. 2004. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol Biol Cell*, 15, 2361-74.
- MUSCH, A., WIEDMANN, M. & RAPOPORT, T. A. 1992. Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 69, 343-52.
- NAKAGAWA, T. & YUAN, J. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 150, 887-94.
- NAKANISHI, H., NAKAYAMA, K., YOKOTA, A., TACHIKAWA, H., TAKAHASHI, N. & JIGAMI, Y. 2001. Hsp70 proteins identified in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* are functional homologues involved in the protein-folding process at the endoplasmic reticulum. *Yeast*, 18, 543-54.
- NANODROP TECHNOLOGIES, I. 2007. *ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual* [Online]. [Accessed 16.12.2018 2018].
- NEDIANI, C., FORMIGLI, L., PERNA, A. M., PACINI, A., PONZIANI, V., MODESTI, P. A., IBBA-MANNESCHI, L., ZECCHI-ORLANDINI, S., FIORILLO, C., CECCHI, C., LIGUORI, P., FRATINI, G., VANNI, S. & NASSI, P. 2002. Biochemical changes and their relationship with morphological and functional findings in pig heart subjected to lasting volume overload: a possible role of acylphosphatase in the regulation of sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Basic Res Cardiol*, 97, 469-78.

- NELSON, O., SUPNET, C., LIU, H. & BEZPROZVANNY, I. 2010. Familial Alzheimer's disease mutations in presenilins: effects on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and correlation with clinical phenotypes. *J Alzheimers Dis*, 21, 781-93.
- NELSON, O., SUPNET, C., TOLIA, A., HORRE, K., DE STROOPER, B. & BEZPROZVANNY, I. 2011. Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore. *J Biol Chem*, 286, 22339-47.
- NELSON, O., TU, H., LEI, T., BENTAHIR, M., DE STROOPER, B. & BEZPROZVANNY, I. 2007. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *J Clin Invest*, 117, 1230-9.
- NG, P. C. & HENIKOFF, S. 2003. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31, 3812-4.
- NGUYEN, D., STUTZ, R., SCHORR, S., LANG, S., PFEFFER, S., FREEZE, H. H., FORSTER, F., HELMS, V., DUDEK, J. & ZIMMERMANN, R. 2018. Proteomics reveals signal peptide features determining the client specificity in human TRAP-dependent ER protein import. *Nat Commun*, 9, 3765.
- NIGGLI, V., ADUNYAH, E. S., CAMERON, B. F., BABABUNMI, E. A. & CARAFOLI, E. 1982a. The Ca²⁺-pump of sickle cell plasma membranes. Purification and reconstitution of the ATPase enzyme. *Cell Calcium*, 3, 131-51.
- NIGGLI, V., SIGEL, E. & CARAFOLI, E. 1982b. The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem*, 257, 2350-6.
- NISHITOH, H. 2012. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem*, 151, 217-9.
- NISHIYAMA, K., HANADA, M. & TOKUDA, H. 1994. Disruption of the gene encoding p12 (SecE) reveals the direct involvement and important function of SecE in the protein translocation of Escherichia coli at low temperature. *EMBO J*, 13, 3272-7.
- NIXON-ABELL, J., OBARA, C. J., WEIGEL, A. V., LI, D., LEGANT, W. R., XU, C. S., PASOLLI, H. A., HARVEY, K., HESS, H. F., BETZIG, E., BLACKSTONE, C. & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. 2016. Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science*, 354.
- NYATHI, Y., WILKINSON, B. M. & POOL, M. R. 2013. Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 2392-402.
- OAKES, S. A. & PAPA, F. R. 2015. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol*, 10, 173-94.
- ODERMATT, A., BECKER, S., KHANNA, V. K., KURZYDLOWSKI, K., LEISNER, E., PETTE, D. & MACLENNAN, D. H. 1998. Sarcoplipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem*, 273, 12360-9.
- OH-HORA, M. & RAO, A. 2008. Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 20, 250-8.
- OH-HORA, M., YAMASHITA, M., HOGAN, P. G., SHARMA, S., LAMPERTI, E., CHUNG, W., PRAKRIYA, M., FESKE, S. & RAO, A. 2008. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol*, 9, 432-43.
- ONG, H. L., DE SOUZA, L. B., CHENG, K. T. & AMBUDKAR, I. S. 2014. Physiological functions and regulation of TRPC channels. *Handb Exp Pharmacol*, 223, 1005-34.
- ONG, H. L., LIU, X., SHARMA, A., HEGDE, R. S. & AMBUDKAR, I. S. 2007. Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. *Pflugers Arch*, 453, 797-808.
- OTERO, J. H., LIZAK, B. & HENDERSHOT, L. M. 2010. Life and death of a BiP substrate. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 472-8.
- PAILLUSSON, S., STOICA, R., GOMEZ-SUAGA, P., LAU, D. H. W., MUELLER, S., MILLER, T. & MILLER, C. C. J. 2016. There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci*, 39, 146-157.
- PALADE, G. E. & PORTER, K. R. 1954. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *J Exp Med*, 100, 641-56.

- PALMER, A. E., JIN, C., REED, J. C. & TSIEN, R. Y. 2004. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17404-9.
- PALMIERI, F. 2004. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*, 447, 689-709.
- PALMIERI, F. 2013. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med*, 34, 465-84.
- PALMIERI, F. 2014. Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases: a review. *J Inherit Metab Dis*, 37, 565-75.
- PALMIERI, F. & MONNE, M. 2016. Discoveries, metabolic roles and diseases of mitochondrial carriers: A review. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2362-78.
- PALMIERI, L., ROTTENSTEINER, H., GIRZALSKY, W., SCARCIA, P., PALMIERI, F. & ERDMANN, R. 2001. Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J*, 20, 5049-59.
- PALTY, R., OHANA, E., HERSHFINKEL, M., VOLOKITA, M., ELGAZAR, V., BEHARIER, O., SILVERMAN, W. F., ARGAMAN, M. & SEKLER, I. 2004. Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger. *J Biol Chem*, 279, 25234-40.
- PALTY, R., SILVERMAN, W. F., HERSHFINKEL, M., CAPORALE, T., SENSI, S. L., PARNIS, J., NOLTE, C., FISHMAN, D., SHOSHAN-BARMATZ, V., HERRMANN, S., KHANANSHVILI, D. & SEKLER, I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 436-41.
- PAN-HAMMARSTROM, Q., ABOLHASSANI, H. & HAMMARSTROM, L. 2018. Defects in plasma cell differentiation are associated with primary immunodeficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1217-1219.
- PANDURANGAN, A. P., OCHOA-MONTANO, B., ASCHER, D. B. & BLUNDELL, T. L. 2017. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res*, 45, W229-W235.
- PARK, E., MENETRET, J. F., GUMBART, J. C., LUDTKE, S. J., LI, W., WHYNOT, A., RAPOPORT, T. A. & AKEY, C. W. 2014. Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation. *Nature*, 506, 102-6.
- PARK, E. & RAPOPORT, T. A. 2012a. Bacterial protein translocation requires only one copy of the SecY complex in vivo. *J Cell Biol*, 198, 881-93.
- PARK, E. & RAPOPORT, T. A. 2012b. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys*, 41, 21-40.
- PARK, S., SCHEFFLER, T. L., ROSSIE, S. S. & GERRARD, D. E. 2013. AMPK activity is regulated by calcium-mediated protein phosphatase 2A activity. *Cell Calcium*, 53, 217-23.
- PATON, A. W., BEDDOE, T., THORPE, C. M., WHISSTOCK, J. C., WILCE, M. C., ROSSJOHN, J., TALBOT, U. M. & PATON, J. C. 2006. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature*, 443, 548-52.
- PENA, F., JANSSENS, A., VAN ZADELHOFF, G. & BRAAKMAN, I. 2010. Calcium as a crucial cofactor for low density lipoprotein receptor folding in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 285, 8656-64.
- PENNER, R., MATTHEWS, G. & NEHER, E. 1988. Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature*, 334, 499-504.
- PEREIRA, E. R., LIAO, N., NEALE, G. A. & HENDERSHOT, L. M. 2010. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS One*, 5.
- PESTKA, S. 1971. Inhibitors of ribosome functions. *Annu Rev Microbiol*, 25, 487-562.
- PETERSEN, O. H. 2005. Ca²⁺ signalling and Ca²⁺-activated ion channels in exocrine acinar cells. *Cell Calcium*, 38, 171-200.
- PFAFF, E., HELDT, H. W. & KLINGENBERG, M. 1969. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. Kinetics of the adenine nucleotide exchange. *Eur J Biochem*, 10, 484-93.
- PFAFF, E. & KLINGENBERG, M. 1968. Adenine nucleotide translocation of mitochondria. 1. Specificity and control. *Eur J Biochem*, 6, 66-79.

- PFEFFER, S., BRANDT, F., HRABE, T., LANG, S., EIBAUER, M., ZIMMERMANN, R. & FORSTER, F. 2012. Structure and 3D arrangement of endoplasmic reticulum membrane-associated ribosomes. *Structure*, 20, 1508-18.
- PFEFFER, S., BURBAUM, L., UNVERDORBEN, P., PECH, M., CHEN, Y., ZIMMERMANN, R., BECKMANN, R. & FORSTER, F. 2015. Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. *Nat Commun*, 6, 8403.
- PFEFFER, S., DUDEK, J., GOGALA, M., SCHORR, S., LINXWEILER, J., LANG, S., BECKER, T., BECKMANN, R., ZIMMERMANN, R. & FORSTER, F. 2014. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat Commun*, 5, 3072.
- PFEFFER, S., DUDEK, J., SCHAFFER, M., NG, B. G., ALBERT, S., PLITZKO, J. M., BAUMEISTER, W., ZIMMERMANN, R., FREEZE, H. H., ENGEL, B. D. & FORSTER, F. 2017. Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex. *Nat Commun*, 8, 14516.
- PFEFFER, S., DUDEK, J., ZIMMERMANN, R. & FORSTER, F. 2016. Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 2122-9.
- PFEFFER, S. R. & ROTHMAN, J. E. 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem*, 56, 829-52.
- PIETROPAOLO, A., PIERRI, C. L., PALMIERI, F. & KLINGENBERG, M. 2016. The switching mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier explored by free-energy landscapes. *Biochim Biophys Acta*, 1857, 772-81.
- PINCUS, D., CHEVALIER, M. W., ARAGON, T., VAN ANKEN, E., VIDAL, S. E., EL-SAMAD, H. & WALTER, P. 2010. BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 8, e1000415.
- PINTON, P., FERRARI, D., MAGALHAES, P., SCHULZE-OSTHOFF, K., DI VIRGILIO, F., POZZAN, T. & RIZZUTO, R. 2000. Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol*, 148, 857-62.
- PLATE, L., COOLEY, C. B., CHEN, J. J., PAXMAN, R. J., GALLAGHER, C. M., MADOUX, F., GENEREUX, J. C., DOBBS, W., GARZA, D., SPICER, T. P., SCAMPAVIA, L., BROWN, S. J., ROSEN, H., POWERS, E. T., WALTER, P., HODDER, P., WISEMAN, R. L. & KELLY, J. W. 2016. Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation. *Elife*, 5.
- PLATTNER, H. & VERKHRATSKY, A. 2013. Ca²⁺ signalling early in evolution--all but primitive. *J Cell Sci*, 126, 2141-50.
- PLEMPER, R. K., BOHMLER, S., BORDALLO, J., SOMMER, T. & WOLF, D. H. 1997. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, 388, 891-5.
- PLUMB, R., ZHANG, Z. R., APPATHURAI, S. & MARIAPPAN, M. 2015. A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR. *Elife*, 4.
- POHLSCHRODER, M., PRINZ, W. A., HARTMANN, E. & BECKWITH, J. 1997. Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell*, 91, 563-6.
- PONSERO, A. J., IGBARIA, A., DARCH, M. A., MILED, S., OUTTEN, C. E., WINTHER, J. R., PALAIS, G., D'AUTREAU, B., DELAUNAY-MOISAN, A. & TOLEDANO, M. B. 2017. Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip. *Mol Cell*, 67, 962-973 e5.
- POSTON, C. N., KRISHNAN, S. C. & BAZEMORE-WALKER, C. R. 2013. In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *J Proteomics*, 79, 219-30.
- POTTER, M. D. & NICCHITTA, C. V. 2002. Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J Biol Chem*, 277, 23314-20.
- POTTER, M. D., SEISER, R. M. & NICCHITTA, C. V. 2001. Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol*, 11, 112-5.

- POWERS, E. T., MORIMOTO, R. I., DILLIN, A., KELLY, J. W. & BALCH, W. E. 2009. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem*, 78, 959-91.
- PRAKRIYA, M., FESKE, S., GWACK, Y., SRIKANTH, S., RAO, A. & HOGAN, P. G. 2006. Orail is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443, 230-3.
- PRAMOD, A. B., FOSTER, J., CARVELLI, L. & HENRY, L. K. 2013. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Mol Aspects Med*, 34, 197-219.
- PREISSLER, S., CHAMBERS, J. E., CRESPILO-CASADO, A., AVEZOV, E., MIRANDA, E., PEREZ, J., HENDERSHOT, L. M., HARDING, H. P. & RON, D. 2015a. Physiological modulation of BiP activity by trans-protomer engagement of the interdomain linker. *Elife*, 4, e08961.
- PREISSLER, S., RATO, C., CHEN, R., ANTROBUS, R., DING, S., FEARNLEY, I. M. & RON, D. 2015b. AMPylation matches BiP activity to client protein load in the endoplasmic reticulum. *Elife*, 4, e12621.
- PRESTON, A. M. & HENDERSHOT, L. M. 2013. Examination of a second node of translational control in the unfolded protein response. *J Cell Sci*, 126, 4253-61.
- PRIMEAU, J. O., ARMANIOUS, G. P., FISHER, M. E. & YOUNG, H. S. 2018. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Subcell Biochem*, 87, 229-258.
- PRINS, D. & MICHALAK, M. 2011. Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- PUTNEY, J. W., JR. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7, 1-12.
- PUTNEY, J. W., JR. 1990. Receptor-regulated calcium entry. *Pharmacol Ther*, 48, 427-34.
- PUTNEY, J. W., JR., BROAD, L. M., BRAUN, F. J., LIEVREMONT, J. P. & BIRD, G. S. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci*, 114, 2223-9.
- QIU, X. B., SHAO, Y. M., MIAO, S. & WANG, L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2560-70.
- RABU, C., SCHMID, V., SCHWAPPACH, B. & HIGH, S. 2009. Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *J Cell Sci*, 122, 3605-12.
- 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, 1035-1049.
- RAO, A., LUO, C. & HOGAN, P. G. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, 15, 707-47.
- RAPOPORT, T. A. 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450, 663-9.
- RAPOPORT, T. A., LI, L. & PARK, E. 2017. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 33, 369-390.
- RASMUSSEN, U., BROOGER CHRISTENSEN, S. & SANDBERG, F. 1978. Thapsigargin and thapsigarginic acid, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm Suec*, 15, 133-40.
- RATURI, A., GUTIERREZ, T., ORTIZ-SANDOVAL, C., RUANGKITTISAKUL, A., HERRERA-CRUZ, M. S., ROCKLEY, J. P., GESSON, K., OURDEV, D., LOU, P. H., LUCCHINETTI, E., TAHBAZ, N., ZAUGG, M., BAKSH, S., BALLANYI, K. & SIMMEN, T. 2016. TMX1 determines cancer cell metabolism as a thiol-based modulator of ER-mitochondria Ca²⁺ flux. *J Cell Biol*, 214, 433-44.
- RAYCHAUDHURY, B., GUPTA, S., BANERJEE, S. & DATTA, S. C. 2006. Peroxisome is a reservoir of intracellular calcium. *Biochim Biophys Acta*, 1760, 989-92.
- REIMOLD, A. M., IWAKOSHI, N. N., MANIS, J., VALLABHAJOSYULA, P., SZOMOLANYI-TSUDA, E., GRAVALLESE, E. M., FRIEND, D., GRUSBY, M. J., ALT, F. & GLIMCHER, L. H. 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412, 300-7.
- REYES, F., MARCHANT, L., NORAMBUENA, L., NILO, R., SILVA, H. & ORELLANA, A. 2006. AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose transporter from *Arabidopsis thaliana*, is located in the endoplasmic reticulum and up-regulated by the unfolded protein response. *J Biol Chem*, 281, 9145-51.

- RIEDER, B. & NEUHAUS, H. E. 2011. Identification of an Arabidopsis plasma membrane-located ATP transporter important for anther development. *Plant Cell*, 23, 1932-44.
- RIZZUTO, R., DE STEFANI, D., RAFFAELLO, A. & MAMMUCARI, C. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 566-78.
- RIZZUTO, R., MARCHI, S., BONORA, M., AGUIARI, P., BONONI, A., DE STEFANI, D., GIORGI, C., LEO, S., RIMESSI, A., SIVIERO, R., ZECCHINI, E. & PINTON, P. 2009. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1342-51.
- RIZZUTO, R., SIMPSON, A. W., BRINI, M. & POZZAN, T. 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358, 325-7.
- ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, A. B., INC. *RTCA MP Instrument Operator's Manual* [Online]. [Accessed 16.12.2018 2018].
- RODERICK, H. L., LECHLEITER, J. D. & CAMACHO, P. 2000. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol*, 149, 1235-48.
- RODRIGUEZ, D., ROJAS-RIVERA, D. & HETZ, C. 2011. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 564-74.
- ROJAS-RIVERA, D., ARMISEN, R., COLOMBO, A., MARTINEZ, G., EGUIGUREN, A. L., DIAZ, A., KIVILUOTO, S., RODRIGUEZ, D., PATRON, M., RIZZUTO, R., BULTYNCK, G., CONCHA, M. L., SIERRALTA, J., STUTZIN, A. & HETZ, C. 2012. TM6SF3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell Death Differ*, 19, 1013-26.
- ROJAS-RIVERA, D. & HETZ, C. 2015. TM6SF3 protein family: ancestral regulators of cell death. *Oncogene*, 34, 269-80.
- RON, D. & HARDING, H. P. 2012. Protein-folding homeostasis in the endoplasmic reticulum and nutritional regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4.
- RON, D. & HUBBARD, S. R. 2008. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell*, 132, 24-6.
- RON, D. & WALTER, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 519-29.
- ROOS, J., DIGREGORIO, P. J., YEROMIN, A. V., OHLSEN, K., LIUDYNO, M., ZHANG, S., SAFRINA, O., KOZAK, J. A., WAGNER, S. L., CAHALAN, M. D., VELICELEBI, G. & STAUDERMAN, K. A. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*, 169, 435-45.
- ROUT, M. P. & FIELD, M. C. 2017. The Evolution of Organellar Coat Complexes and Organization of the Eukaryotic Cell. *Annu Rev Biochem*, 86, 637-657.
- ROWLAND, A. A. & VOELTZ, G. K. 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 607-25.
- ROY, A. & WONDERLIN, W. F. 2003. The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis. *J Biol Chem*, 278, 4397-403.
- RUSH, J. S., SWEITZER, T., KENT, C., DECKER, G. L. & WAECHTER, C. J. 1991. Biogenesis of the endoplasmic reticulum in activated B lymphocytes: temporal relationships between the induction of protein N-glycosylation activity and the biosynthesis of membrane protein and phospholipid. *Arch Biochem Biophys*, 284, 63-70.
- RUSINOL, A. E., CUI, Z., CHEN, M. H. & VANCE, J. E. 1994. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem*, 269, 27494-502.
- SAPAROV, S. M., ERLANDSON, K., CANNON, K., SCHALETZKY, J., SCHULMAN, S., RAPOPORT, T. A. & POHL, P. 2007. Determining the conductance of the SecY protein translocation channel for small molecules. *Mol Cell*, 26, 501-9.
- SARASTE, M. & WALKER, J. E. 1982. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett*, 144, 250-4.
- SAWKAR, A. R., CHENG, W. C., BEUTLER, E., WONG, C. H., BALCH, W. E. & KELLY, J. W. 2002. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15428-33.

- SCHARENBERG, A. M., HUMPHRIES, L. A. & RAWLINGS, D. J. 2007. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nat Rev Immunol*, 7, 778-89.
- SCHATZ, G. & DOBBERSTEIN, B. 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271, 1519-26.
- SCHÄUBLE, N., LANG, S., JUNG, M., CAPPEL, S., SCHORR, S., ULUCAN, O., LINXWEILER, J., DUDEK, J., BLUM, R., HELMS, V., PATON, A. W., PATON, J. C., CAVALIE, A. & ZIMMERMANN, R. 2012. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J*, 31, 3282-96.
- SCHEUNER, D., SONG, B., MCEWEN, E., LIU, C., LAYBUTT, R., GILLESPIE, P., SAUNDERS, T., BONNER-WEIR, S. & KAUFMAN, R. J. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 7, 1165-76.
- SCHLENSTEDT, G., GUDMUNDSSON, G. H., BOMAN, H. G. & ZIMMERMANN, R. 1990. A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem*, 265, 13960-8.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHORR, S., KLEIN, M. C., GAMAYUN, I., MELNYK, A., JUNG, M., SCHAUBLE, N., WANG, Q., HEMMIS, B., BOCHEN, F., GREINER, M., LAMPEL, P., URBAN, S. K., HASSDENTEUFEL, S., DUDEK, J., CHEN, X. Z., WAGNER, R., CAVALIE, A. & ZIMMERMANN, R. 2015. Co-chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*, 290, 18621-35.
- SCHRODER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005a. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 569, 29-63.
- SCHRODER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005b. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-89.
- SCHRUL, B. & KOPITO, R. R. 2016. Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to ER subdomains. *Nat Cell Biol*, 18, 740-51.
- SCHUBERT, D., KLEIN, M. C., HASSDENTEUFEL, S., CABALLERO-OTEYZA, A., YANG, L., PROIETTI, M., BULASHEVSKA, A., KEMMING, J., KUHN, J., WINZER, S., RUSCH, S., FLIEGAUF, M., SCHAFFER, A. A., PFEFFER, S., GEIGER, R., CAVALIE, A., CAO, H., YANG, F., LI, Y., RIZZI, M., EIBEL, H., KOBBE, R., MARKS, A. L., PEPPERS, B. P., HOSTOFFER, R. W., PUCK, J. M., ZIMMERMANN, R. & GRIMBACHER, B. 2018. Plasma cell deficiency in human subjects with heterozygous mutations in Sec61 translocon alpha 1 subunit (SEC61A1). *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1427-1438.
- SCHUCK, S., PRINZ, W. A., THORN, K. S., VOSS, C. & WALTER, P. 2009. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol*, 187, 525-36.
- SCHULMANN, K., BRASCH, F. E., KUNSTMANN, E., ENGEL, C., PAGENSTECHE, C., VOGELSANG, H., KRUGER, S., VOGEL, T., KNAEBEL, H. P., RUSCHOFF, J., HAHN, S. A., KNEBEL-DOEBERITZ, M. V., MOESLEIN, G., MELTZER, S. J., SCHACKERT, H. K., TYMPNER, C., MANGOLD, E., SCHMIEGEL, W. & GERMAN, H. C. 2005. HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology*, 128, 590-9.
- SCHWALLER, B. 2009. The continuing disappearance of "pure" Ca²⁺ buffers. *Cell Mol Life Sci*, 66, 275-300.
- SCHWANHAUSSER, B., BUSSE, D., LI, N., DITTMAR, G., SCHUCHHARDT, J., WOLF, J., CHEN, W. & SELBACH, M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473, 337-42.
- SCHWARZ, D. S. & BLOWER, M. D. 2016. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*, 73, 79-94.
- SCORRANO, L. 2003. Divide et impera: Ca²⁺ signals, mitochondrial fission and sensitization to apoptosis. *Cell Death Differ*, 10, 1287-9.

- SEIDLER, N. W., JONA, I., VEGH, M. & MARTONOSI, A. 1989. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 264, 17816-23.
- SEIFERT, E. L., LIGETI, E., MAYR, J. A., SONDEHEIMER, N. & HAJNOCZKY, G. 2015. The mitochondrial phosphate carrier: Role in oxidative metabolism, calcium handling and mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 464, 369-75.
- SENDEREK, J., KRIEGER, M., STENDEL, C., BERGMANN, C., MOSER, M., BREITBACH-FALLER, N., RUDNIK-SCHONEBORN, S., BLASCHEK, A., WOLF, N. I., HARTING, I., NORTH, K., SMITH, J., MUNTONI, F., BROCKINGTON, M., QUIJANO-ROY, S., RENAULT, F., HERRMANN, R., HENDERSHOT, L. M., SCHRODER, J. M., LOCHMULLER, H., TOPALOGLU, H., VOIT, T., WEIS, J., EBINGER, F. & ZERRES, K. 2005. Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet*, 37, 1312-4.
- SHAFFER, A. L., SHAPIRO-SHELEF, M., IWAKOSHI, N. N., LEE, A. H., QIAN, S. B., ZHAO, H., YU, X., YANG, L., TAN, B. K., ROSENWALD, A., HURT, E. M., PETROULAKIS, E., SONENBERG, N., YEWDELL, J. W., CALAME, K., GLIMCHER, L. H. & STAUDT, L. M. 2004. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 21, 81-93.
- SHAO, S. & HEGDE, R. S. 2011. A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell*, 147, 1576-88.
- SHAW, P. J. & FESKE, S. 2012. Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 2253-68.
- SHAW, R. J., KOSMATKA, M., BARDEESY, N., HURLEY, R. L., WITTERS, L. A., DEPINHO, R. A. & CANTLEY, L. C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3329-35.
- SHEN, X., ELLIS, R. E., SAKAKI, K. & KAUFMAN, R. J. 2005. Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet*, 1, e37.
- SHESTOV, A. A., LIU, X., SER, Z., CLUNTUN, A. A., HUNG, Y. P., HUANG, L., KIM, D., LE, A., YELLEN, G., ALBECK, J. G. & LOCASALE, J. W. 2014. Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step. *Elife*, 3.
- SHIBATA, Y., SHEMESH, T., PRINZ, W. A., PALAZZO, A. F., KOZLOV, M. M. & RAPOPORT, T. A. 2010. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*, 143, 774-88.
- SHIBATA, Y., VOELTZ, G. K. & RAPOPORT, T. A. 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell*, 126, 435-9.
- SHILLING, D., MAK, D. O., KANG, D. E. & FOSKETT, J. K. 2012. Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca²⁺ leak channels. *J Biol Chem*, 287, 10933-44.
- SHIN, S. J., LEE, W. K., LIM, H. W. & PARK, J. 2000. Characterization of the ATP transporter in the reconstituted rough endoplasmic reticulum proteoliposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1468, 55-62.
- SHORE, G. C., PAPA, F. R. & OAKES, S. A. 2011. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 143-9.
- SHOSHAN-BARMATZ, V. & ISRAELSON, A. 2005. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membr Biol*, 204, 57-66.
- SHOULDERS, M. D., RYNO, L. M., GENEREUX, J. C., MORESCO, J. J., TU, P. G., WU, C., YATES, J. R., 3RD, SU, A. I., KELLY, J. W. & WISEMAN, R. L. 2013. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep*, 3, 1279-92.
- SIEKEVITZ, P. & PALADE, G. E. 1960. A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. 5. In vivo incorporation of leucine-1-C¹⁴ into the chymotrypsinogen of various cell fractions. *J Biophys Biochem Cytol*, 7, 619-30.
- SIENAERT, I., HUYGHE, S., PARYS, J. B., MALFAIT, M., KUNZELMANN, K., DE SMEDT, H., VERLEDEN, G. M. & MISSIAEN, L. 1998. ATP-induced Ca²⁺ signals in bronchial epithelial cells. *Pflugers Arch*, 436, 40-8.

- SILVER, P. A. & WAY, J. C. 1993. Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell*, 74, 5-6.
- SIMON, H. U., MILLS, G. B., HASHIMOTO, S. & SIMINOVITCH, K. A. 1992. Evidence for defective transmembrane signaling in B cells from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Clin Invest*, 90, 1396-405.
- SIMON, S. M. & BLOBEL, G. 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell*, 65, 371-80.
- SIMON, S. M., BLOBEL, G. & ZIMMERBERG, J. 1989. Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6176-80.
- SIOMI, H. & SIOMI, M. C. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457, 396-404.
- SKELTON, N. J., KORDEL, J., AKKE, M., FORSEN, S. & CHAZIN, W. J. 1994. Signal transduction versus buffering activity in Ca(2+)-binding proteins. *Nat Struct Biol*, 1, 239-45.
- SMITH, J. A., KHAN, M., MAGNANI, D. D., HARMS, J. S., DURWARD, M., RADHAKRISHNAN, G. K., LIU, Y. P. & SPLITTER, G. A. 2013. *Brucella* induces an unfolded protein response via TcpB that supports intracellular replication in macrophages. *PLoS Pathog*, 9, e1003785.
- SMITH, M. A., CLEMONS, W. M., JR., DEMARS, C. J. & FLOWER, A. M. 2005. Modeling the effects of prl mutations on the *Escherichia coli* SecY complex. *J Bacteriol*, 187, 6454-65.
- SNAPP, E. L., REINHART, G. A., BOGERT, B. A., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & HEGDE, R. S. 2004. The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Biol*, 164, 997-1007.
- SOBOLOFF, J., ROTHBERG, B. S., MADESH, M. & GILL, D. L. 2012. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 549-65.
- SOLOVYOVA, N. & VERKHRATSKY, A. 2010. Measurement of free Ca²⁺ concentration in the lumen of neuronal endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, pdb prot4783.
- SOMMER, N., JUNNE, T., KALIES, K. U., SPIESS, M. & HARTMANN, E. 2013. TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3104-3111.
- STAMMERS, A. N., SUSSER, S. E., HAMM, N. C., HLYNSKY, M. W., KIMBER, D. E., KEHLER, D. S. & DUHAMEL, T. A. 2015. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol*, 93, 843-54.
- STIBER, J. A., ZHANG, Z. S., BURCH, J., EU, J. P., ZHANG, S., TRUSKEY, G. A., SETH, M., YAMAGUCHI, N., MEISSNER, G., SHAH, R., WORLEY, P. F., WILLIAMS, R. S. & ROSENBERG, P. B. 2008. Mice lacking Homer 1 exhibit a skeletal myopathy characterized by abnormal transient receptor potential channel activity. *Mol Cell Biol*, 28, 2637-47.
- STOLARCZYK, E. I., REILING, C. J. & PAUMI, C. M. 2011. Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Curr Pharm Biotechnol*, 12, 621-35.
- STOLZ, A. & WOLF, D. H. 2010. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 694-705.
- STOLZ, J. F. 1998. *Bacterial intracellular membranes.*, Wiley, Chichester, UK.
- STREB, H., IRVINE, R. F., BERRIDGE, M. J. & SCHULZ, I. 1983. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306, 67-9.
- SUH, W. C., BURKHOLDER, W. F., LU, C. Z., ZHAO, X., GOTTESMAN, M. E. & GROSS, C. A. 1998. Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15223-8.
- SUNDARAM, A., PLUMB, R., APPATHURAI, S. & MARIAPPAN, M. 2017. The Sec61 translocon limits IRE1α signaling during the unfolded protein response. *Elife*, 6.
- SYNOFZIK, M., HAACK, T. B., KOPAJTICH, R., GORZA, M., RAPAPORT, D., GREINER, M., SCHONFELD, C., FREIBERG, C., SCHORR, S., HOLL, R. W., GONZALEZ, M. A., FRITSCH, A., FALLIER-BECKER, P., ZIMMERMANN, R., STROM, T. M., MEITINGER, T., ZUCHNER, S., SCHULE, R., SCHOLS, L. & PROKISCH, H. 2014.

- Absence of BiP co-chaperone DNAJC3 causes diabetes mellitus and multisystemic neurodegeneration. *Am J Hum Genet*, 95, 689-97.
- SZABADKAI, G., BIANCHI, K., VARNAI, P., DE STEFANI, D., WIECKOWSKI, M. R., CAVAGNA, D., NAGY, A. I., BALLA, T. & RIZZUTO, R. 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*, 175, 901-11.
- SZEGEZDI, E., LOGUE, S. E., GORMAN, A. M. & SAMALI, A. 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, 7, 880-5.
- SZKLARCZYK, D., FRANCESCHINI, A., WYDER, S., FORSLUND, K., HELLER, D., HUERTA-CEPAS, J., SIMONOVIC, M., ROTH, A., SANTOS, A., TSAFOU, K. P., KUHN, M., BORK, P., JENSEN, L. J. & VON MERING, C. 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 43, D447-52.
- TABAS, I. & RON, D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13, 184-90.
- TADINI-BUONINSEGNI, F., SMEAZZETTO, S., GUALDANI, R. & MONCELLI, M. R. 2018. Drug Interactions With the Ca(2+)-ATPase From Sarco(Endo)Plasmic Reticulum (SERCA). *Front Mol Biosci*, 5, 36.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 621-32.
- TARTAGLIONE, T. A., PEPINE, C. J. & PIEPER, J. A. 1982. Diltiazem: a review of its clinical efficacy and use. *Drug Intell Clin Pharm*, 16, 371-9.
- TAUFIK, I., KEDROV, A., EXTERKATE, M. & DRIESSEN, A. J. 2013. Monitoring the activity of single translocons. *J Mol Biol*, 425, 4145-53.
- TAURA, T., BABA, T., AKIYAMA, Y. & ITO, K. 1993. Determinants of the quantity of the stable SecY complex in the Escherichia coli cell. *J Bacteriol*, 175, 7771-5.
- TERASAKI, M., SHEMESH, T., KASTHURI, N., KLEMM, R. W., SCHALEK, R., HAYWORTH, K. J., HAND, A. R., YANKOVA, M., HUBER, G., LICHTMAN, J. W., RAPOPORT, T. A. & KOZLOV, M. M. 2013. Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs. *Cell*, 154, 285-96.
- THASTRUP, O. 1990. Role of Ca²⁺-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions*, 29, 8-15.
- THEYSSEN, H., SCHUSTER, H. P., PACKSCHIES, L., BUKAU, B. & REINSTEIN, J. 1996. The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J Mol Biol*, 263, 657-70.
- TSIEN, R. Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290, 527-8.
- TSIEN, R. Y., POZZAN, T. & RINK, T. J. 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*, 94, 325-34.
- TSIEN, R. Y., RINK, T. J. & POENIE, M. 1985. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, 6, 145-57.
- TSUCHIYA, H., DOKI, S., TAKEMOTO, M., IKUTA, T., HIGUCHI, T., FUKUI, K., USUDA, Y., TABUCHI, E., NAGATOISHI, S., TSUMOTO, K., NISHIZAWA, T., ITO, K., DOHMAE, N., ISHITANI, R. & NUREKI, O. 2016. Structural basis for amino acid export by DMT superfamily transporter YddG. *Nature*, 534, 417-20.
- TU, H., NELSON, O., BEZPROZVANNY, A., WANG, Z., LEE, S. F., HAO, Y. H., SERNEELS, L., DE STROOPER, B., YU, G. & BEZPROZVANNY, I. 2006. Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*, 126, 981-93.
- TYEDMERS, J., LERNER, M., WIEDMANN, M., VOLKMER, J. & ZIMMERMANN, R. 2003. Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, 4, 505-10.

- UNDERWOOD, W. & SOMERVILLE, S. C. 2017. Phosphorylation is required for the pathogen defense function of the Arabidopsis PEN3 ABC transporter. *Plant Signal Behav*, 12, e1379644.
- URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H. P. & RON, D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664-6.
- URRA, H., DUFEY, E., LISBONA, F., ROJAS-RIVERA, D. & HETZ, C. 2013. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3507-3517.
- USHIODA, R., MIYAMOTO, A., INOUE, M., WATANABE, S., OKUMURA, M., MAEGAWA, K. I., UEGAKI, K., FUJII, S., FUKUDA, Y., UMITSU, M., TAKAGI, J., INABA, K., MIKOSHIBA, K. & NAGATA, K. 2016. Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E6055-E6063.
- VAETH, M., MAUS, M., KLEIN-HESSLING, S., FREINKMAN, E., YANG, J., ECKSTEIN, M., CAMERON, S., TURVEY, S. E., SERFLING, E., BERBERICH-SIEBELT, F., POSSEMATO, R. & FESKE, S. 2017. Store-Operated Ca(2+) Entry Controls Clonal Expansion of T Cells through Metabolic Reprogramming. *Immunity*, 47, 664-679 e6.
- VALCARCEL, R., WEBER, U., JACKSON, D. B., BENES, V., ANSORGE, W., BOHMANN, D. & MLODZIK, M. 1999. Sec61beta, a subunit of the protein translocation channel, is required during Drosophila development. *J Cell Sci*, 112 (Pt 23), 4389-96.
- VAN ANKEN, E. & BRAAKMAN, I. 2005. Endoplasmic reticulum stress and the making of a professional secretory cell. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40, 269-83.
- VAN ANKEN, E., ROMIJN, E. P., MAGGIONI, C., MEZGHRANI, A., SITIA, R., BRAAKMAN, I. & HECK, A. J. 2003. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity*, 18, 243-53.
- VAN ANKEN, E., SANDERS, R. W., LISCALJET, I. M., LAND, A., BONTJER, I., TILLEMANS, S., NABATOV, A. A., PAXTON, W. A., BERKHOUT, B. & BRAAKMAN, I. 2008. Only five of 10 strictly conserved disulfide bonds are essential for folding and eight for function of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Mol Biol Cell*, 19, 4298-309.
- VAN ANKEN E., S. R. 2016. *Encyclopedia of Cell Biology*, Academic Press.
- VAN COPPENOLLE, F., VANDEN ABEELE, F., SLOMIANNY, C., FLOURAKIS, M., HESKETH, J., DEWAILLY, E. & PREVARSKAYA, N. 2004. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci*, 117, 4135-42.
- VAN DE VEN, A. A., COMPEER, E. B., VAN MONTFRANS, J. M. & BOES, M. 2011. B-cell defects in common variable immunodeficiency: BCR signaling, protein clustering and hardwired gene mutations. *Crit Rev Immunol*, 31, 85-98.
- VAN DEN BERG, B., CLEMONS, W. M., JR., COLLINSON, I., MODIS, Y., HARTMANN, E., HARRISON, S. C. & RAPOPORT, T. A. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427, 36-44.
- VAN, P. N., PETER, F. & SOLING, H. D. 1989. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles. *J Biol Chem*, 264, 17494-501.
- VAN ZELM, M. C., REISLI, I., VAN DER BURG, M., CASTANO, D., VAN NOESEL, C. J., VAN TOL, M. J., WOELLNER, C., GRIMBACHER, B., PATINO, P. J., VAN DONGEN, J. J. & FRANCO, J. L. 2006. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med*, 354, 1901-12.
- VANCE, J. E. 1991. Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 266, 89-97.
- VANCE, J. E. 2014. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 595-609.
- VANDECAETSBECK, I., VANGHELUWE, P., RAEYMAEKERS, L., WUYTACK, F. & VANOEVELEN, J. 2011. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.

- VANDEN ABEELE, B., SALIOU, G., LEHMANN, P., THEAUDIN, M., KOCHEIDA, E. M., BONNAIRE, B. & VALLEE, J. N. 2007. Recanalization of cerebral venous thrombosis within 24 hours: a case report. *Neurology*, 69, 221.
- VANDER HEIDEN, M. G. 2013. Exploiting tumor metabolism: challenges for clinical translation. *J Clin Invest*, 123, 3648-51.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C. & THOMPSON, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- VANDERHEYDEN, V., DEVOGELAERE, B., MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., BULTYNCK, G. & PARYS, J. B. 2009. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 959-70.
- VANGHELuwe, P., RAEYMAEKERS, L., DODE, L. & WUYTACK, F. 2005. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium*, 38, 291-302.
- VENTURA, J. J., HUBNER, A., ZHANG, C., FLAVELL, R. A., SHOKAT, K. M. & DAVIS, R. J. 2006. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell*, 21, 701-10.
- VERMA, N., GRIMBACHER, B. & HURST, J. R. 2015. Lung disease in primary antibody deficiency. *Lancet Respir Med*, 3, 651-60.
- VIALE, A., PETTAZZONI, P., LYSSIoTIS, C. A., YING, H., SANCHEZ, N., MARCHESINI, M., CARUGO, A., GREEN, T., SETH, S., GIULIANI, V., KOST-ALIMOVA, M., MULLER, F., COLLA, S., NEZI, L., GENOVESE, G., DEEM, A. K., KAPOOR, A., YAO, W., BRUNETTO, E., KANG, Y., YUAN, M., ASARA, J. M., WANG, Y. A., HEFFERNAN, T. P., KIMMELMAN, A. C., WANG, H., FLEMING, J. B., CANTLEY, L. C., DEPINHO, R. A. & DRAETTA, G. F. 2014. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514, 628-32.
- VICRE, M., SANTAELLA, C., BLANCHET, S., GATEAU, A. & DRIOUICH, A. 2005. Root border-like cells of Arabidopsis. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria. *Plant Physiol*, 138, 998-1008.
- VILLIERS, C., MICHEJDA, J. W., BLOCK, M., LAUQUIN, G. J. & VIGNAIS, P. V. 1979. The electrogenic nature of ADP/ATP transport in inside-out submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta*, 546, 157-70.
- VINCENT, M. J., MARTIN, A. S. & COMPANS, R. W. 1998. Function of the KKXX motif in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 273, 950-6.
- VISHNU, N., JADOON KHAN, M., KARSTEN, F., GROSCHNER, L. N., WALDECK-WEIERMAIR, M., ROST, R., HALLSTROM, S., IMAMURA, H., GRAIER, W. F. & MALLI, R. 2014. ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca²⁺ release. *Mol Biol Cell*, 25, 368-79.
- VISSER, W. F., VAN ROERMUND, C. W., WATERHAM, H. R. & WANDERS, R. J. 2002. Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. *Biochem Biophys Res Commun*, 299, 494-7.
- VOELTZ, G. K. & PRINZ, W. A. 2007. Sheets, ribbons and tubules - how organelles get their shape. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 258-64.
- VOELTZ, G. K., ROLLS, M. M. & RAPOPORT, T. A. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, 3, 944-50.
- VOIGT, S., JUNGNICHEL, B., HARTMANN, E. & RAPOPORT, T. A. 1996. Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, 134, 25-35.
- VOORHEES, R. M., FERNANDEZ, I. S., SCHERES, S. H. & HEGDE, R. S. 2014. Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell*, 157, 1632-43.
- VOORHEES, R. M. & HEGDE, R. S. 2016a. Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science*, 351, 88-91.
- VOORHEES, R. M. & HEGDE, R. S. 2016b. Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Curr Opin Cell Biol*, 41, 91-9.

- WAKASA, Y., HAYASHI, S. & TAKAIWA, F. 2012. Expression of OsBiP4 and OsBiP5 is highly correlated with the endoplasmic reticulum stress response in rice. *Planta*, 236, 1519-27.
- WALTER, P. & BLOBEL, G. 1981a. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*, 91, 557-61.
- WALTER, P. & BLOBEL, G. 1981b. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, 91, 551-6.
- WALTER, P., IBRAHIMI, I. & BLOBEL, G. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, 91, 545-50.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-6.
- WANG, F., CHOU, A. & SEGATORI, L. 2011. Lacidipine remodels protein folding and Ca²⁺ homeostasis in Gaucher's disease fibroblasts: a mechanism to rescue mutant glucocerebrosidase. *Chem Biol*, 18, 766-76.
- WANG, M. & KAUFMAN, R. J. 2016. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529, 326-35.
- WANG, P. T., GARCIN, P. O., FU, M., MASOUDI, M., ST-PIERRE, P., PANTE, N. & NABI, I. R. 2015. Distinct mechanisms controlling rough and smooth endoplasmic reticulum contacts with mitochondria. *J Cell Sci*, 128, 2759-65.
- WARBURG, O. 1956a. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- WARBURG, O. 1956b. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.
- WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. 1927. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8, 519-30.
- WEI, J. & HENDERSHOT, L. M. 1995. Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. *J Biol Chem*, 270, 26670-6.
- WEITZMANN, A., VOLKMER, J. & ZIMMERMANN, R. 2006. The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of S11 function in man and mouse. *FEBS Lett*, 580, 5237-40.
- WEST, M., ZUREK, N., HOENGER, A. & VOELTZ, G. K. 2011. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol*, 193, 333-46.
- WESTRATE, L. M., LEE, J. E., PRINZ, W. A. & VOELTZ, G. K. 2015. Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu Rev Biochem*, 84, 791-811.
- WHITE, C., LI, C., YANG, J., PETRENKO, N. B., MADESH, M., THOMPSON, C. B. & FOSKETT, J. K. 2005. The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol*, 7, 1021-8.
- WIEST, D. L., BURKHARDT, J. K., HESTER, S., HORTSCH, M., MEYER, D. I. & ARGON, Y. 1990. Membrane biogenesis during B cell differentiation: most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately. *J Cell Biol*, 110, 1501-11.
- WILLIAMS, R. T., MANJI, S. S., PARKER, N. J., HANCOCK, M. S., VAN STEKELENBURG, L., EID, J. P., SENIOR, P. V., KAZENWADEL, J. S., SHANDALA, T., SAINT, R., SMITH, P. J. & DZIADEK, M. A. 2001. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J*, 357, 673-85.
- WILSON, R., ALLEN, A. J., OLIVER, J., BROOKMAN, J. L., HIGH, S. & BULLEID, N. J. 1995. The translocation, folding, assembly and redox-dependent degradation of secretory and membrane proteins in semi-permeabilized mammalian cells. *Biochem J*, 307 (Pt 3), 679-87.
- WINKLER, H. H. & NEUHAUS, H. E. 1999. Non-mitochondrial ATP transport. *Trends Biochem Sci*, 24, 64-8.
- WIRTH, A., JUNG, M., BIES, C., FRIEN, M., TYEDMERS, J., ZIMMERMANN, R. & WAGNER, R. 2003. The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol Cell*, 12, 261-8.

- WIRTZ, K. W. & ZILVERSMIT, D. B. 1968. Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes in vitro. *J Biol Chem*, 243, 3596-602.
- WONDERLIN, W. F. 2009. Constitutive, translation-independent opening of the protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Pflugers Arch*, 457, 917-30.
- WOODS, A., DICKERSON, K., HEATH, R., HONG, S. P., MOMCILOVIC, M., JOHNSTONE, S. R., CARLSON, M. & CARLING, D. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2, 21-33.
- WOODS, A., JOHNSTONE, S. R., DICKERSON, K., LEIPER, F. C., FRYER, L. G., NEUMANN, D., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLSON, M. & CARLING, D. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, 13, 2004-8.
- WU, Y., SONG, P., XU, J., ZHANG, M. & ZOU, M. H. 2007. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 282, 9777-88.
- XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R. J. & GREENBERG, M. E. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-31.
- XIAO, C., GIACCA, A. & LEWIS, G. F. 2011. Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes*, 60, 918-24.
- XU, C., XU, W., PALMER, A. E. & REED, J. C. 2008. BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins. *J Biol Chem*, 283, 11477-84.
- YAMAMOTO, Y. & SAKISAKA, T. 2012. Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Mol Cell*, 48, 387-97.
- YAN, Z., BAI, X., YAN, C., WU, J., LI, Z., XIE, T., PENG, W., YIN, C., LI, X., SCHERES, S. H. W., SHI, Y. & YAN, N. 2015. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature*, 517, 50-55.
- YING, M., SANNERUD, R., FLATMARK, T. & SARASTE, J. 2002. Colocalization of Ca²⁺-ATPase and GRP94 with p58 and the effects of thapsigargin on protein recycling suggest the participation of the pre-Golgi intermediate compartment in intracellular Ca²⁺ storage. *Eur J Cell Biol*, 81, 469-83.
- YOBOUE, E. D., RIMESSI, A., ANELLI, T., PINTON, P. & SITIA, R. 2017. Regulation of Calcium Fluxes by GPX8, a Type-II Transmembrane Peroxidase Enriched at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane. *Antioxid Redox Signal*, 27, 583-595.
- YOSHIDA, Y., CHIBA, T., TOKUNAGA, F., KAWASAKI, H., IWAI, K., SUZUKI, T., ITO, Y., MATSUOKA, K., YOSHIDA, M., TANAKA, K. & TAI, T. 2002. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature*, 418, 438-42.
- ZALK, R., CLARKE, O. B., DES GEORGES, A., GRASSUCCI, R. A., REIKEN, S., MANCIA, F., HENDRICKSON, W. A., FRANK, J. & MARKS, A. R. 2015. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, 517, 44-9.
- ZAPUN, A., JAKOB, C. A., THOMAS, D. Y. & BERGERON, J. J. 1999. Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure*, 7, R173-82.
- ZHANG, A., WILLIAMSON, C. D., WONG, D. S., BULLOUGH, M. D., BROWN, K. J., HATHOUT, Y. & COLBERG-POLEY, A. M. 2011. Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection. *Mol Cell Proteomics*, 10, M111 009936.
- ZHANG, C., BROWNE, A., KIM, D. Y. & TANZI, R. E. 2010. Familial Alzheimer's disease mutations in presenilin 1 do not alter levels of the secreted amyloid-beta protein precursor generated by beta-secretase cleavage. *Curr Alzheimer Res*, 7, 21-6.
- ZHANG, K., WONG, H. N., SONG, B., MILLER, C. N., SCHEUNER, D. & KAUFMAN, R. J. 2005. The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J Clin Invest*, 115, 268-81.
- ZHANG, M., TANAKA, T. & IKURA, M. 1995. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat Struct Biol*, 2, 758-67.
- ZHANG, P., MCGRATH, B., LI, S., FRANK, A., ZAMBITO, F., REINERT, J., GANNON, M., MA, K., MCNAUGHTON, K. & CAVENER, D. R. 2002. The PERK eukaryotic initiation factor 2

- alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol Cell Biol*, 22, 3864-74.
- ZHANG, X., ZHENG, X., KE, S., ZHU, H., LIU, F., ZHANG, Z., PENG, X., GUO, L., ZENG, R., HOU, P., LIU, Z., WU, S., SONG, M., YANG, J. & ZHANG, G. 2016. ER-localized adenine nucleotide transporter ER-ANT1: an integrator of energy and stress signaling in rice. *Plant Mol Biol*, 92, 701-715.
- ZHAO, B., LUCAS, K. J., SAHA, T. T., HA, J., LING, L., KOKOZA, V. A., ROY, S. & RAIKHEL, A. S. 2017. MicroRNA-275 targets sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase (SERCA) to control key functions in the mosquito gut. *PLoS Genet*, 13, e1006943.
- ZHAO, X. & JANTTI, J. 2009. Functional characterization of the trans-membrane domain interactions of the Sec61 protein translocation complex beta-subunit. *BMC Cell Biol*, 10, 76.
- ZHU, X., ZHAO, X., BURKHOLDER, W. F., GRAGEROV, A., OGATA, C. M., GOTTESMAN, M. E. & HENDRICKSON, W. A. 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272, 1606-14.
- ZHU, Y., ZHANG, G., LIN, S., SHI, J., ZHANG, H. & HU, J. 2018. Sec61beta facilitates the maintenance of endoplasmic reticulum homeostasis by associating microtubules. *Protein Cell*, 9, 616-628.
- ZIMMERMANN, R. 2016. Components and Mechanisms of Import, Modification, Folding, and Assembly of Immunoglobulins in the Endoplasmic Reticulum. *J Clin Immunol*, 36 Suppl 1, 5-11.
- ZIMMERMANN, R., EYRISCH, S., AHMAD, M. & HELMS, V. 2011. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 912-24.
- ZIMMERMANN, R., SAGSTETTER, M., LEWIS, M. J. & PELHAM, H. R. 1988. Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J*, 7, 2875-80.
- ZODE, G. S., KUEHN, M. H., NISHIMURA, D. Y., SEARBY, C. C., MOHAN, K., GROZDANIC, S. D., BUGGE, K., ANDERSON, M. G., CLARK, A. F., STONE, E. M. & SHEFFIELD, V. C. 2011. Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma. *J Clin Invest*, 121, 3542-53.
- ZONG, W. X., LI, C., HATZIVASSILIOU, G., LINDSTEN, T., YU, Q. C., YUAN, J. & THOMPSON, C. B. 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol*, 162, 59-69.

7. Publikationen

Publikationen

Klein MC, Zimmermann K, Schorr S, Landini M, Klemens PAW, Altensell J, Jung M, Krause E, Nguyen D, Helms V, Rettig J, Fecher-Trost C, Cavalie A, Hoth M, Bogeski I, Neuhaus HE, Zimmermann R, Lang S, Haferkamp I (2018) AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum. *Nature communications* **9**: 3489

Schubert D, **Klein MC**, Hassdenteufel S, Caballero-Oteyza A, Yang L, Proietti M, Bulashevskaya A, Kemming J, Kuhn J, Winzer S, Rusch S, Fliegau M, Schaffer AA, Pfeffer S, Geiger R, Cavalie A, Cao H, Yang F, Li Y, Rizzi M, Eibel H, Kobbe R, Marks AL, Peppers BP, Hostoffer RW, Puck JM, Zimmermann R, Grimbacher B (2018) Plasma cell deficiency in human subjects with heterozygous mutations in Sec61 translocon alpha 1 subunit (SEC61A1). *The Journal of allergy and clinical immunology* **141**: 1427-1438

Schorr S, **Klein MC**, Gamayun I, Melnyk A, Jung M, Schauble N, Wang Q, Hemmis B, Bochen F, Greiner M, Lampel P, Urban SK, Hassdenteufel S, Dudek J, Chen XZ, Wagner R, Cavalie A, Zimmermann R (2015) Co-chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum. *The Journal of biological chemistry* **290**: 18621-18635

Hassdenteufel S, **Klein MC**, Melnyk A, Zimmermann R (2014) Protein transport into the human ER and related diseases, Sec61-channelopathies. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **92**: 499-509

Akzeptiert

Gamayun I, O'Keefe S, Pick T, **Klein MC**, Nguyen D, McKibbin C, Piacenti M, Williams H, Flitsch S, Whitehead R, Swanton E, Helms V, High S, Zimmermann R, Cavalie A (2018?) Eeyarestatin compounds selectively enhance Sec61-mediated Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *Cell Chemical Biology*

Poster

Jung M, **Klein MC**, Zimmermann K, Lang S, Bogeski I, Cavalie A, Krause E, Neuhaus E, Zimmermann R, Haferkamp I (2017). AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum. *EMBO Workshop: Endoplasmic reticulum in health and disease*; October 21-25; Lucca, Italy.

Klein MC, Zimmermann K, Krause E, Lang S., Bogeski I., Jung M., Cavalie A., Neuhaus E., Klemens P., Zimmermann R., Haferkamp I. (2017). Characterization of ERAC as an ATP carrier in the human ER membrane. *13th ER & Redox Club meeting*; April 26-29; Homburg Saar, Germany.

Klein MC, Schubert D, Grimbacher B., Cavalie A., Zimmermann R. (2015). Functional characterization of a common variable immunodeficiency-related *SEC61A1* mutation in humans. *ER Stress & Inflammation Meeting 2015*; November 27; Ghent, Belgium.

Melnyk A, **Klein MC**, Schorr S., Schäuble N., Jung M., Cavalie A., Zimmermann R. (2014). Maintenance of cellular calcium homeostasis by sealing of the Sec61 translocation channel. *Membrane Proteins in Health and Disease*; April 9-13; Banff, Alberta, Canada.

Klein MC, Schorr S, Schäuble N, Pfeffer S, Förster F, Cavalié A, Zimmermann R (2013). The role of the human Sec61 complex and its associated components in cellular calcium homeostasis. *4th ECS Workshop Ca²⁺ and cell death*; September 11-13.

8. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Richard Zimmermann, der mir die Möglichkeit und das Vertrauen gab an meinen wissenschaftlichen Fragestellungen zu arbeiten, an denen ich beruflich und persönlich sehr gewachsen bin und für seine herausragende Betreuung. Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Zweitgutachter Prof. Dr. Adolfo Cavalié für seine stete Hilfsbereitschaft und die Begleitung der Ca^{2+} -Imaging Experimente.

Auch den vielen Kooperationspartnern möchte ich besonders danken, da sie eine Multidisziplinarität erlaubten, die maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat; deshalb bedanke ich mich bei Dr. Ilka Haferkamp und Katharina Zimmermann für die ATP-Messungen, bei PD Dr. Elmar Krause und Dr. Claudia Schirra für die mikroskopischen Aufnahmen, bei Dr. Claudia Fecher-Trost für die Massenspektrometrie und bei Dr. Desirée Schubert für die gemeinsame Arbeit am PAD-Projekt. Auch der ganzen AG Cavalié möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die technische Expertise danken.

Die Möglichkeit Stipendiatin der Graduiertenförderung zu sein ermöglichte erst den Einstieg in die Promotionsphase, weshalb ich dafür der UdS zu großem Dank verpflichtet bin, genau wie dem Graduiertenkolleg IRTG, das einen wertvollen Rahmen lieferte sich als junger Mensch auszutauschen, weiterzuentwickeln und Vorbilder kennenzulernen. Auch meinem IRTG-Comittee Prof. Dr. Niemeyer und Prof. Dr. Chen danke ich für wertvolle Diskussionen und Input.

Meiner Arbeitsgruppe, inklusive der ehemaligen Mitglieder und denen der AG Schlenstedt, gilt mit der herzlichste Dank, da jeder Einzelne von euch die letzten Jahre entscheidend geprägt und dazu beigetragen hat den Kopf immer über Wasser zu halten. Ich danke meinem „Office“ 1.0 bis 3.0 für zahlreiche Diskussionen und ungezählte Lacher, meinen großartigen wissenschaftlichen Lehrern und den Menschen, die technisch wie menschlich den „Laden schmeißen“. Ein großes Dankeschön geht an Stefan für die Beisteuerung der qRT-PCR-Experimente und dass er mein geduldiger Lehrer und Wegweiser in die Ca^{2+} -Imaging-Welt war. Insbesondere Dank gebührt denen, die mich in der Schreibphase mit vollem Einsatz beim Korrekturlesen, mit anregenden Diskussionen, unendlicher Hilfsbereitschaft und freundschaftlicher Motivation unterstützt haben, deshalb ein riesiges Dankeschön an Sven, Tillman, Sarah, Regine und Martin.

Zu tiefem Dank bin ich auch meinen Freunden verpflichtet, denn bildlich gesprochen seid ihr mein Glas Wein am Feierabend, meine Bilder an der Wand und mein Ohrensessel. Insbesondere danke ich Verena, die mir wie eine große Schwester ist, Angelika, die mich

besser und länger kennt als ich mich selbst und meiner Sarah, die hören kann was ich denke und für mich sogar Briefe an „Santa“ schreibt.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinem Freund Tillman, der mein unbeugsamer Fels in der Brandung ist, der genau weiß wo der Schuh drückt und was dann zu tun ist, der mein Leben bunter macht und mich selbst in meinen dunkelsten Stunden mit einem Augenzwinkern auf den rechten Weg zurückbringt. Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Familie, meinen unglaublichen Eltern Margit und Reinhold, die mich mit Liebe und Verständnis unterstützen wo, wie und wann sie nur können, meiner Tante Liane, die ein Herz hat, das so groß ist wie Hochhäuser und meinem Bruder Markus. Eure Unterstützung bedeutet die Welt für mich!