

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

**Die Rolle des Sec61-Komplexes
in der Ca^{2+} -Homöostase von Plasmazellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von: Tillman Pick

geb. am: 05.03.1987 in Zweibrücken

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	IV
<i>Liste der Abbildungen, Tabellen und Gleichungen</i>	VIII
<i>1. Zusammenfassung/Abstract</i>	1
<i>2. Einleitung</i>	3
2.1 <i>Das endoplasmatische Retikulum (ER)</i>	3
2.2 <i>Proteintransport in das ER</i>	5
2.3 <i>Der Sec61-Komplex</i>	7
2.4 <i>Akzessorische Proteine der Proteintranslokase</i>	9
2.4.1 <i>Sec62</i>	10
2.4.2 <i>BiP</i>	10
2.4.3 <i>GRP94</i>	11
2.4.4 <i>Proteindisulfidisomerase (PDI)</i>	12
2.4.5 <i>Hsp40-Co-Chaperone (ERj1-7)</i>	12
2.5 <i>UPR und ERAD</i>	14
2.6 <i>Ca²⁺-Homöostase</i>	18
2.6.1 <i>Ca²⁺-Pumpen und -Austauscher für die „Ca²⁺-Clearance“</i>	19
2.6.2 <i>Ca²⁺-bindende Proteine</i>	21
2.6.3 <i>Ca²⁺- Kanäle in der ER-Membran</i>	22
2.6.4 <i>Speicher-vermittelter Ca²⁺-Einstrom (SOCE)</i>	27
2.6.5 <i>Rolle der Mitochondrien in der Ca²⁺-Homöostase</i>	29
2.6.6 <i>BCR-Aktivierung und Ca²⁺-Homöostase in Immunzellen</i>	33
2.7 <i>Defekte und Krankheiten in der Translokations-Maschinerie</i>	36
2.8 <i>Ziele der Arbeit</i>	41
<i>3. Material und Methoden</i>	42
3.1 <i>Material</i>	42
3.1.1 <i>Geräte und Software</i>	42
3.1.2 <i>Chemikalien und Substanzen</i>	45
3.1.3 <i>Antikörper</i>	47
3.1.4 <i>Plasmide</i>	48
3.1.5 <i>Raue Mikrosomen (RM)</i>	49
3.1.6 <i>Zelllinien</i>	49
3.2 <i>Methoden</i>	52

3.2.1 Methoden der Proteinbiochemie.....	52
3.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
3.2.1.2 Elektrotransfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)	53
3.2.1.3 Immunologische Detektion von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf PDVF-Membranen	55
3.2.1.4 Densitometrie – quantitative Bestimmung der Bandenintensität	56
3.2.1.5 Herstellung von RPMI 8226 und NALM-6 Zelllysaten und deren Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test	56
3.2.2 Methoden der Zellkultivierung.....	58
3.2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen	59
3.2.2.2 Zellzählmethode – Neubauer Zählkammer.....	61
3.2.2.3 Plasmidgestützte Transfektion humaner Zelllinien	61
3.2.2.4 Bestimmung der Proliferation mit Countess®Automated Cell Counter	63
3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels Durchflusszytometrie.....	63
3.2.4 Behandlung der Zellen mit Pharmaka	64
3.2.5 Mikroskopische Charakterisierung des ERs in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	65
3.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	65
3.2.5.2 Elektronenmikroskopie	66
3.2.6 Messung von intrazellulärem Calcium mittels Calcium-Imaging	69
3.2.6.1 Cytosolische Ca ²⁺ Messungen	71
3.2.6.2 Umrechnung der Fura-2 Ratio-Werte in Ca ²⁺ -Konzentrationen	75
3.2.7 Statistische Auswertung	79
4. Ergebnisse.....	81
4.1 Morphologie des ERs in RPMI 8226 Zellen und NALM-6 Zellen.....	82
4.2 Charakterisierung der Ca ²⁺ -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen.....	86
4.2.1 Analyse des “store operated calcium entry” (SOCE) in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	89
4.3 Modulierung des Sec61 α -vermittelten Ca ²⁺ -Efflux durch die Translations- inhibitoren Cycloheximid und Emetin	93
4.4 Effekt von Faltungsantagonisten und CaM-Inhibitoren auf den Ca ²⁺ -Efflux in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	96
4.5 Effekte von Faltungsantagonisten und CaM-Inhibitoren auf die Ca ²⁺ - Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Langzeitinkubation	102

<i>4.6 Untersuchung der Viabilität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit Xenobiotika</i>	106
4.6.1 Untersuchung der Sensitivität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen gegenüber veränderter Ca^{2+} -Mobilisierung	110
4.6.2 Untersuchung der Sensitivität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen gegenüber ER-Stress	111
4.6.3 Untersuchung der Viabilität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Störung des mitochondrialen Energiehaushaltes	114
4.6.4 Effekt von Emetin auf die Viabilität von ER-Stressoren-behandelten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	117
4.6.5 Untersuchung protektiver Proteine gegen ER-Stress in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	120
4.6.6 Untersuchung der Viabilität verschiedener Zelllinien nach Behandlung mit Eeyarestatin	125
<i>4.7 Untersuchungen der Ca^{2+}-Homöostase in ER-Subkompartimenten mittels GcAMP</i>	129
5. Diskussion	140
5.1 Anpassung von Immunzellen an eine hohe Proteinsyntheserate	140
5.2 Anpassung der Ca^{2+} -Homöostase an die hohe Proteinsyntheserate in Immunzellen	144
5.2.1 Erhöhte Ca^{2+} -Mobilisierung in Zellen mit expandiertem ER	144
5.2.2 Sec61 α -vermittelter Ca^{2+} -Efflux in Zellen mit viel ER	149
5.2.3 Mögliche Ca^{2+} -Efflux-Kandidaten neben Sec61 α	151
5.3 Ca^{2+} -abhängiger Zelltod in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	155
5.4 Protektive Rolle der Bcl-2-Familie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	159
5.5 Unterschiedlicher Energiestatus in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	164
5.6 Wirksame Konzentrationsbereiche der verwendeten Substanzen	167
5.7 RPMI 8226 Zellen als Modell für eine Umgestaltung der Ca^{2+} -Homöostase	172
6. Anhang	176
7. Literaturverzeichnis	184
8. Publikationen	257
9. Danksagung	258

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
Å	Ångström
A-11	A-1155463 (selektiver BCL-X _L Inhibitor)
A-12	A-1210477 (MCL-1 Inhibitor)
aa	Aminosäure (engl. amino acid)
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AM	Acetylmethylester
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF6	engl. activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	Absolutmessung (engl. arbitrary unit)
BAPTA	1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N' Tetraessigsäure
Bcl-2	engl. B-cell lymphoma 2
BCR	B-Zell Rezeptor (engl. B cell receptor)
BG	Hintergrundfluoreszenz (engl. Background)
BI-1	Bax-Inhibitor-1
bidest.	bidestilliert
BiP	engl. immunoglobulin heavy chain binding protein, auch GRP78
BSA	bovines Serumalbumin
BTZ	Bortezomib
Ca ²⁺	Calciumion
[Ca ²⁺] _{cyt/ext/ER/mito}	Ca ²⁺ -Konzentration im Cytosol/Extrazellularraum/endoplasmatisches Retikulum/Mitochondrium
C-ATR	Carboxyatractyloside
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCB	Coomassie Brilliant Blue G-250
CCCP	Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CHOP	engl. C/EBP-homologous protein
CHX	Cycloheximide
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
CNX	Calnexin
CRT	Calreticulin
Δ[Ca ²⁺] _{cyt}	Anstieg der cytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration ausgehend von der basalen cytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration
DAG	Diacylglycerol
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
ECFP	verstärktes cyan-fluoreszierendes Protein (engl. enhanced cyan fluorescent protein)
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (engl. enhanced chemiluminescence)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

EM	Elektronenmikroskop
EME	Emetine
eq	Äquivalent
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
ERES	ER-Austrittstellen (engl. ER exit site)
ERQC	ER Qualitäts-Kontrollbereich (engl. ER quality compartment)
F	Fluoreszenzintensität
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (engl. fluorescence-activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum (engl. fetal calve serum)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter)
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCaMP	Einzel-Fluorophor-Sensor für Ca^{2+}
GECI	genetisch kodierte Ca^{2+} -Indikatoren (engl. genetically encoded calcium indicators)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
Gl.	Gleichung
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GRP94	Glukose-reguliertes Protein 94 (engl. glucose-regulated protein 94)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEK-293	humane embryonische Niere-293 (engl. human embryonic kidney-293)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPF	Hochdruckgefrieren (engl. high pressure freezing)
HPV-18	humanes Papilloma Virus 18
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
Hsp	Hitzeschock-Protein (engl. heat shock protein)
Ig(G)	Immunglobulin (Gammaglobulin)
IL	Interleukin
IONO	Ionomycin
$\text{IP}_3(\text{R})$	Inositol-1,4,5-trisphosphat (Rezeptor)
IRE1	engl. inositol requiring element
Kana	Kanamycin
K_d	Dissoziationskonstante
K'_d	Dissoziationskonstante des Fura-2 Ca^{2+} -Imaging Kalibrierungskits
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LSM	Laser-Scanning-Mikroskope
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
M	Mol
mA	Milliampere
MAM	Mitochondrien-assozierte Membran
MCU	mitochondrialer Calcium-Uniporter
MEM	minimum essentiell medium

MERC	Mitochondrien und ER Kontaktstellen (engl. mitochondria and ER contact sites)
MIC19	engl. MICOS complex subunit MIC19
MICOS	engl. mitochondrial contact site and cristae organizing system
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mPTP	engl. mitochondrial permeability transition pore
ms	Millisekunde
Nav	Navitoclax (Inhibitor von Bcl-2, Bcl-X _L und Bcl-w)
NCX	Natrium (Na ⁺)/Calcium (Ca ²⁺)-Austauscher
NE	äußere Kernmembran (engl. nuclear envelope)
NEF	Nukleotidaustauschfaktoren (engl. nucleotide exchange factor)
Neo	Neomycin
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OD	optische Dichte
Oligo	Oligomycin
Ophio A	Ophiobolin A
OST	Oligosacharyltransferase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PDI	Proteindisulfidisomerase
PERK	engl. PKR-like ER kinase
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PLAC	Protease-Inhibitor-Mix (Pepstatin A, Leupeptin, Antipain, Chymostatin)
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion
R	Ratio
rER	raues ER (engl. rough ER)
(m)RFP	(monomerisch) rot fluoreszierendes Protein [engl. (monomeric) red fluorescent protein]
RM	(canine) raue Mikrosomen
(m)RNA	(Boten-)Ribonukleinsäure [engl. (messenger) ribonucleic acid]
RNC	Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (engl. ribosome-nascent chain complex)
ROI	Region von Interesse (engl. region of interest)
rpm	Rotation pro Minute
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
sER	glattes ER (engl. smooth ER)
S.D.	Varianz (engl. standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
S.E.M	Standardfehler einer Stichprobenmenge (engl. standard error of the mean)

SERCA	sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
SOCE	Speicher vermittelter Calciumeinstrom (engl. store operated calcium entry)
SPase	Signalpeptidase
SR	SRP-Rezeptor
SRP	Signalerkennungspartikel
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter)
STIM	engl. stromal interaction molecule
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. tris buffered saline)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tER	Übergang-ER (engl. transitional ER)
TFP	Trifluoperazine
TG	Thapsigargin
TMCO1	engl. transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1
TMD	Transmembrandomäne
TUNI	Tunicamycin
TRAM	engl. translocating chain-associated membrane protein
TRAP	engl. translocon-associated protein complex
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	engl. transient receptor potential
t-RNA	transfer-RNA
UdS	Universität des Saarlandes
UPR	engl. unfolded protein response
UV/Vis	ultraviolett/sichtbar (engl. ultraviolet/visible)
v/v	Volumenprozent (engl. voulme per volume)
VDAC	Spannungsabhängiger Anionenkanal (engl. voltage-dependent anion channel)
Ven	Venetoclax (selektiver Bcl-2 Inhibitor)
w/v	Gewichtprozent (engl. weight per volume)
XBP-1	engl. X-box binding protein-1
zero $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$	Konzentration von 0,5mM EGTA in extrazellulärer Lösung

Buchstabencode für Aminosäuren

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

Auflistung der Abbildungen

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Topologie der Sec61 α -, β - und γ -Untereinheiten	8
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der „unfolded protein response“ (UPR)	16
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung von ERAD	18
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der in die zur Aufrechterhaltung der Ca ²⁺ -Homöostase involvierten Proteine in der Plasma- und ER-Membran	24
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des SOCE	28
Abbildung 2.6: Schematische Membran-Kompartimentierung in Mitochondrien	30
Abbildung 3.1: Schematische Seitenansicht des Aufbaus eines Wet-Blots	54
Abbildung 3.2: Validierung der Beladung der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit Fura-2 AM	73
Abbildung 3.3: Analyse der Ca ²⁺ -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bei unterschiedlicher Passagenanzahl	74
Abbildung 3.4: Exemplarische Kalibrierungsgerade von Fura-2 für Ca ²⁺	76
Abbildung 3.5: Bestimmung der minimalen (R _{min}) und maximalen (R _{max}) Ratiowerte von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zur Kalibrierung von Fura-2 Messwerten	78
Abbildung 4.1: ER-Morphologie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	83
Abbildung 4.2: Zusätzliche statistische Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	84
Abbildung 4.3: Bestimmung des Proteingehalts von ER-residenten, mitochondrialen, nukleären und cytosolischen Proteinen in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	85
Abbildung 4.4: Charakterisierung der Ca ²⁺ -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	87
Abbildung 4.5: „Ca ²⁺ -Clearance“ in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	88
Abbildung 4.6: SOCE in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	91
Abbildung 4.7: Quantitative real-time PCR von Orai und STIM mRNA aus RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	92
Abbildung 4.8: Modulation des Sec61 α -vermittelten Ca ²⁺ -Efflux mittels den Translationsinhibitoren Cycloheximide oder Emetine in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen ..	94
Abbildung 4.9: Effekt von Faltungsantagonisten auf den Ca ²⁺ -Efflux in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Vorbehandlung mit EME	97
Abbildung 4.10: Effekt von Faltungsantagonisten auf den Ca ²⁺ -Gehalt in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	98
Abbildung 4.11: Effekt von CaM-Inhibitoren auf den Ca ²⁺ -Efflux in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Vorbehandlung mit EME	100
Abbildung 4.12: Effekt von CaM-Inhibitoren auf den Ca ²⁺ -Gehalt in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	101

Abbildung 4.13: Effekt der Langzeitinkubation von TUNI und TFP auf die Ca^{2+} -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	103
Abbildung 4.14: Effekt der Langzeitinkubation von TUNI und TFP auf den Ca^{2+} -Gehalt in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen.....	105
Abbildung 4.15: Kinetik der Viabilität und Proliferation von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit Xenobiotika.....	107
Abbildung 4.16: Die Zunahme des Netto-Wertes der toten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit Xenobiotika.....	109
Abbildung 4.17: Die Zunahme des Netto-Wertes der toten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit TG oder IONO	110
Abbildung 4.18: Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven Zellen nach Behandlung mit ER-Stressoren	113
Abbildung 4.19: Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Beeinflussung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase und des Energiehaushaltes	116
Abbildung 4.20: Effekt einer einstündigen prä-Inkubation von EME auf die Viabilität und Proliferation in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen	118
Abbildung 4.21: Zunahme der PI-positiven Zellen nach Subtraktion der Kontroll-Werte (Netto-Werte) nach Behandlung mit ER Stressoren.....	119
Abbildung 4.22: Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Inhibition der anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie	122
Abbildung 4.23: Normalisierte Darstellung der Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach pharmakologisch-induzierten ER-Stress und additionaler Inhibition der anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie	124
Abbildung 4.24: Untersuchung der Viabilität verschiedener Zelllinien nach Störung der ER- Ca^{2+} -Homöostase	127
Abbildung 4.25: Untersuchung der Viabilität von verschiedenen Zelllinien nach Behandlung mit ES1, ES24 und ESR35.....	128
Abbildung 4.26: Dokumentation der Transfektion und Lokalisation von H2a-GFP transfizierten HEK-293 Zellen.....	131
Abbildung 4.27: Dokumentation der ER-GCaMP-150 transfizierten HEK-293 Zellen.....	132
Abbildung 4.28: 150-GCaMP-H2a transfizierte HEK-293 Zellen	134
Abbildung 4.29: TG- und IONO-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in 150-GCaMP-H2a transfizierten HEK-293 Zellen.....	136
Abbildung 4.30: Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in 150-GCaMP-H2a transfizierten HEK-293 Zellen	138
Abbildung 4.31: CCH- und TG-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in 150-GCaMP-H2a transfizierten HEK-293 Zellen.....	139
Abbildung 5.1: . Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen bei einer ER-Expansion und der damit einhergehenden Erhöhung der Proteinsynthese.....	174
Abbildung 6.1: Viabilität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach pharmakologischer Manipulation der Ca^{2+} -Homöostase	176

Abbildung 6.2: Untersuchung der Sensitivität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Induzierung von ER-Stress 177

Abbildung 6.3: Detektion der Viabilität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Beeinträchtigung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase und Energiehaushalt 178

Abbildung 6.4: Viabilität und Proliferation von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach prä-Inkubation mit EME und induziertem ER-Stress 179

Abbildung 6.5: Effekt von Inhibitoren der anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen 180

Abbildung 6.6: Inhibition anti-apoptischer Proteine aus der Bcl-2-Familie nach pharmakologisch-induziertem ER-Stress in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen 181

Abbildung 6.7: Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach pharmakologisch-induziertem ER-Stress und additionaler Inhibition der anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie 182

Abbildung 6.8: SOCE in HEK-293 Zellen 183

Auflistung der Tabellen

Tabelle 3.1: Liste der verwendeten primären Antikörper für die immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-Blot 47

Tabelle 3.2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper zur Visualisierung der Proteinbanden auf einer PVDF-Membran..... 48

Tabelle 3.3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide 48

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen..... 53

Tabelle 3.5: Pipettierschema zur Herstellung unterschiedlicher BSA-Konzentrationen 57

Tabelle 3.6: Pipettierschema von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels Bradford-Test..... 58

Tabelle 3.7: Lösungen des Kalibrierungskits zur Detektion der systemspezifischen K'_d 75

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der in Abbildung 4.23 gezeigten Graphen..... 161

Tabelle 5.2: Auflistung der wirksamen Konzentrationsbereiche der Substanzen, welche in dieser Arbeit für die Ca^{2+} -Imaging- und Viabilitätsversuche verwendet wurden..... 167

Tabelle 5.3: Auflistung der wirksamen Konzentrationsbereiche der Substanzen, welche in dieser Arbeit nur für die Viabilitätsversuche verwendet wurden 170

Tabelle 5.4: Vergleich der Zell-Morphologie, Expressionsniveau des Translokationsapparates und der Ca^{2+} -Homöostase in RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen 173

Auflistung der Gleichungen

Gleichung 3.1: Berechnung der freien Calcium-Konzentration.....	76
Gleichung 3.2: Berechnung der Ratio-Werte	76
Gleichung 3.3: Berechnung des Korrekturfaktors α	76
Gleichung 3.4: Berechnung der korrigierten K_d -Werte (K'_d)	76
Gleichung 3.5: Berechnung der Varianz (S.D., engl. standard deviation)	80
Gleichung 3.6: Berechnung des Standardfehlers (S.E.M., engl. standard error of the mean). 80	

1. Zusammenfassung

Das endoplasmatische Retikulum (ER) repräsentiert in vielen eukaryotischen Zelltypen das volumenreichste Organell und dient als Hauptcalciumspeicher. Der ER-membranständige Sec61-Komplex ist für den Proteintransport am ER essentiell, wobei die Sec61 α -Untereinheit zugleich als Ca²⁺-permeabler Kanal fungiert und durch mehrere ER-lumenale und cytosolische Proteine reguliert wird. Das ER erfährt während der Differenzierung einer B-Zelle eine massive Umstrukturierung. Bisher ist jedoch die Ca²⁺-Homöostase und die damit verbundene Rolle von Sec61 α in B- und Plasmazellen unzureichend untersucht worden. Ziel dieser Arbeit war es die wichtigsten Komponenten in der Regulierung der Ca²⁺-Homöostase in diesen Zellen vergleichend und funktionell zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte pharmakologisch die Modulierbarkeit des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux, Sensitivität gegenüber ER-Stress und der Ca²⁺-abhängige Zelltod untersucht werden. Aus diesem Grund wurde zum einen die Plasmazelllinie RPMI 8226 ausgewählt, welche große Mengen Immunglobuline sezernieren und zum anderen die prä-B-Zelllinie NALM-6, welche als Modell für Zellen mit geringer Proteinsyntheserate dient. Zunächst wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie durch fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Verfahren und die Ca²⁺-Homöostase durch Ca²⁺-Imaging-Experimente mittels des cytosolischen Ca²⁺-Indikators Fura-2 charakterisiert. Hierbei wiesen im Vergleich zu NALM-6 Zellen die RPMI 8226 Zelllinie eine ~7-fache höhere ER-Fläche und eine ~3-fache Anzahl der Mitochondrien auf. Zusätzlich war der Proteingehalt von Chaperonen, sowie von Sec61 α um das ~5-fache erhöht. Gleichzeitig zeigten die RPMI 8226 Zellen eine 6-10-fach größeren Ca²⁺-Efflux über die ER-Membran und Speicher-vermittelter Ca²⁺-Einstrom, was mit dem höheren Sec61 α -Proteingehalt korreliert. Mit dieser Korrelation ging auch eine direkte pharmakologische Modulierbarkeit des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux einher. Beide Zelllinien zeigten eine vergleichbare Sensitivität gegenüber pharmakologisch-induziertem Ca²⁺-abhängigem Zelltod und ER-Stress auf, was aus der protektiven Rolle von Bcl-2 und Bcl-X_L resultiert. Die RPMI 8226 Zellen wiesen zugleich eine höhere Sensitivität gegenüber Störungen der mitochondrialen Energiebereitstellung auf, was ein Umschalten von einer ER-abhängigen auf eine Mitochondrien-abhängigen Überlebensfähigkeit während der Differenzierung suggeriert. Diese Ergebnisse spiegeln die generelle Umstrukturierung während der Differenzierung einer B- in eine Plasmazelle wider und stellt Sec61 α im Hinblick auf die Ca²⁺-Homöostase in Plasmazellen in den Vordergrund.

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) represents in many eukaryotic cell types the most abundant organelle and serves as the main intracellular Ca^{2+} store. The ER-membrane-resident Sec61 complex is essential for the protein transport at the ER, whereby the Sec61 α subunit functions at the same time as a Ca^{2+} -permeable channel, which is regulated by multiple ER luminal and cytosolic proteins. The ER experiences a massive structural reorganization during the differentiation of a B- into a plasma-cell. However, the Ca^{2+} homeostasis and the role of Sec61 α are not well understood in B- and plasma cells so far. The aim of this work was to characterize comparatively and functionally the most important components in the Ca^{2+} homeostasis in these cells. Furthermore the pharmacological modulation of the Sec61 α mediated Ca^{2+} -efflux, the sensitivity to ER stress and the Ca^{2+} -dependent cell death was also analyzed. For this reason the plasma cell line RPMI 8226 was selected, which secrete large amounts of immunoglobulins. As a counterpart, the pre-B-cell line NALM-6 served as a model of cells with low protein synthesis rate. Initially, the cells were characterized regarding their morphology by fluorescence and electron microscopic techniques and, thereafter, the Ca^{2+} homeostasis was studied in Ca^{2+} -imaging experiments with the cytosolic Ca^{2+} -indicator Fura-2. This analysis revealed that the RPMI 8226 cells exhibited a ~7-fold larger ER area and ~3-fold higher number of mitochondria compared to NALM-6 cells. In addition, the protein content of chaperones and Sec61 α as well was ~5 times higher in RPMI 8226 cells. Concurrently, the RPMI 8226 cells showed an 6-10-fold higher Ca^{2+} -efflux from the ER and store-operated Ca^{2+} entry, which correlates with the larger protein content of Sec61 α in these cells. This correlation was paralleled by the pharmacological modulation of the Sec61 α mediated Ca^{2+} -efflux. Both cell lines showed a comparable sensitivity to pharmacological induced Ca^{2+} -dependent cell death and ER stress, which resulted from a protective role of Bcl-2 and Bcl-X_L. The RPMI 8226 cells exhibit at the same time a higher sensitivity towards disturbances of the mitochondrial energy supply, which suggests a switch from ER-dependent to mitochondria-dependent survival. These results mirror the structural reorganization during the differentiation of a B- into a plasma-cell and strengthen the role of Sec61 α in the Ca^{2+} homeostasis of plasma-cells.

2. Einleitung

Der menschliche Körper besteht je nach Alter und Gewicht aus 10^{12} - 10^{16} Zellen (Sender *et al.*, 2016; Bianconi *et al.*, 2013), welche schon im 19. Jahrhundert als elementarer Baustein des Lebens beschrieben wurden und die kleinste Einheit eines Organismus bildet (Vasil, 2008; Schwann, 1839; Schleiden, 1838). Das Cytosol von Prokaryoten und Eukaryoten ist von einer Plasmamembran umgeben, die die Zelle vor extrazellulären Einwirkungen schützt. Die Idee der Endosymbiontentheorie, nach der die Entstehung der Eukaryoten aus der Symbiose von Archaeen und Bakterien hervorgeht, war bereits Ende des 19. Jahrhunderts vorhanden (Schimper, 1883), wurde jedoch erst 1967 durch Lynn Margulis bekannter (Martin *et al.*, 2015; Witzany, 2006; Sagan, 1967). Somit entstanden im Laufe der Evolution innerhalb der Zelle weitere Reaktionsräume, die durch Membranen getrennt sind, aber in stetigem Austausch mit dem Cytosol stehen. Zu diesen Organellen gehören die Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen, Lysosomen und die beiden zum sekretorischen Weg zählenden Organellen Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum. Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist nicht nur für die Proteinsynthese wichtig, sondern spielt auch eine zentrale Rolle in der zellulären Ca^{2+} -Homöostase. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Ca^{2+} -Homöostase des ERs während der Differenzierung von B-Zellen untersucht werden. Durch eine pharmakologische Modulation, soll darüber hinaus die Rolle des Ca^{2+} -permeablen, ER-membranständigen Sec61 α -Kanals dahingehend analysiert werden.

2.1 Das endoplasmatische Retikulum (ER)

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein großes, kontinuierliches, dynamisches Organell, welches eine hoch komplexe 3D-Struktur aufweist und das komplette Cytoplasma durchzieht (Friedman und Voeltz, 2011). Dabei nimmt das ER in einer aus dem Pankreas entnommener Zelle (Volumen $1000 \mu\text{m}^3$, Membranfläche $13000 \mu\text{m}^2$), rund 10 % des Volumens und 60 % der gesamten Membranfläche ein (Alberts *et al.*, 2002). Solche Parameter sind am besten in RBL Zellen (engl. rat basophilic leukemia) untersucht (Means *et al.*, 2006). Das ER ist der Ort der Synthese und Translokation von naszierenden Polypeptiden in das ER-Lumen für fast 33 % des eukaryotischen Proteoms (Olzmann *et al.*, 2013; Guerriero und Brodsky, 2012), was die Bedeutsamkeit dieses Organells weiter konkretisiert. Prinzipiell wird zwischen zwei Unterteilungen des ERs unterschieden. Zum einen sind die flächendeckenden Strukturen, sogenannte „sheets“, vornehmlich in der Nähe des Nukleus vorzufinden, wohingegen

2. Einleitung

netzartige (tubuläre) Strukturen das periphere ER bilden (Schwarz und Blower, 2016; English und Voeltz, 2013; Puhka *et al.*, 2012). Der lumenale Abstand zwischen den „sheets“, welcher durch die Climp-63 Proteine aufrecht erhalten wird, beträgt in der Regel ~50 nm und variiert vor allem bei ER-Stress (Schwarz und Blower, 2016; Barlowe, 2010; Shibata *et al.*, 2010; Bernales *et al.*, 2006). Jedoch hat eine neue Studie gezeigt, dass diese „sheets“ wohl Folgen einer mangelnder mikroskopischen Auflösung sind und vermutlich Matrices aus dicht beieinander liegenden Tubuli repräsentieren (Lang *et al.*, 2017; Nixon-Abell *et al.*, 2016). Die strukturgebenden Proteine des peripheren ERs setzen sich hauptsächlich aus dem integralen ER-Membranprotein Reticulon und den Proteinen aus der Familie DP1/REEP/Yop1 zusammen (Schwarz und Blower, 2016; English und Voeltz, 2013; Pendin *et al.*, 2011). Das periphere ER steht durch interorganellare Kontakte in stetigem Austausch mit Endosomen, Lipidtropfen, Lysosomen, Mitochondrien, Peroxisomen, sowie mit der Plasmamembran (Saheki und De Camilli, 2017; Phillips und Voeltz, 2016; English und Voeltz, 2013). Dies setzt eine hohe Dynamik des ERs voraus, was sich in dem Abschnüren bzw. Fusion von Vesikeln mit der ER-Membran oder Entstehung neuer peripheren Strukturen äußert (Pendin *et al.*, 2011). Diese Dynamik ist bei der Differenzierung einer B-Zelle in eine Plasmazelle entscheidend, bei der das ER eine starke morphologische Änderung durchlebt, was mit einer Volumenzunahme einhergeht (Kirk *et al.*, 2010; van Anken *et al.*, 2003; Wiest *et al.*, 1990).

Betrachtet man die historische Einteilung des ERs, so wird das ER in die drei strukturell unterschiedlichen Bereiche der äußeren Kernmembran (NE, engl. nuclear envelope), raues ER (rER, engl. rough ER) und glattes ER (sER, engl. smooth ER) unterteilt (Voeltz *et al.*, 2002; Sitia und Meldolesi, 1992), wobei nur die NE und das rER mit Ribosomen besetzt sind. Die NE umhüllt den Nukleus und dient zur Regulierung des Transports von Molekülen in und aus dem Nukleus (English und Voeltz, 2013; Hetzer, 2010). Das sER ist in Zellen abundant, die auf Steroid-, Hormon- oder, wie im Falle von Hepatozyten, auf Lipidsynthese spezialisiert sind (Alberts *et al.*, 2002). Darüber hinaus wird das sER auch Übergang-ER (tER, engl. transitional ER) genannt, da hier die ER-Austrittsstellen (ERES, engl. ER exit site) lokalisiert sind und sich dort die Polypeptid-beladenen Vesikel abschnüren und zum Golgi-Apparat transportiert werden (Langhans *et al.*, 2012; Budnik und Stephens, 2009; Alberts *et al.*, 2002). Das rER stellt mit den membrangebundenen Ribosomen den Ort der Proteinbiogenese und -translokation in das ER-Lumen dar. Im ER-Lumen werden die eingeschleusten Proteine mit Hilfe von Chaperonen gefaltet und posttranslational modifiziert (Ellgaard *et al.*, 2016; Saibil, 2013; Hartl *et al.*, 2011; Kaufman, 1999). Sekretorische Proteine werden nach

korrekter Faltung sezerniert, was durch den Kontakt zwischen ER und Golgi-Apparat reguliert wird (English und Voeltz, 2013; Glick und Nakano, 2009). Neben dem Eintrittspunkt für Proteine in den Sekretionsweg und der Proteinmodifikation, dient der Zelle das ER als größter Speicher für Calciumionen (Ca^{2+}) (Raffaello *et al.*, 2016; Lam und Galione, 2013), wodurch das ER maßgeblich in die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase involviert ist (Bagur und Hajnoczky, 2017; Torres *et al.*, 2011; Pinton *et al.*, 2008). Hierbei dient das sER in spezialisierten Zellen wie Muskelzellen, vor allem Herzmuskelzellen, als Ca^{2+} -Speicher und moduliert maßgeblich die Ca^{2+} -Mobilisierung (Bers, 2014; Shibata *et al.*, 2006). In den folgenden Kapiteln wird näher auf die Funktion des ERs und ausgewählten ER-residenten Proteine eingegangen.

2.2 Proteintransport in das ER

Ein Großteil der neu synthetisierten Proteine werden in Membranen integriert, in andere Organellen eingeschleust oder in den Extrazellularraum sezerniert. Zuvor wurden jedoch die meisten solcher Proteine (33 %) über die ER-Membran transloziert oder in diese integriert, wodurch diese Art der Biogenese einen essentiellen Schritt in der Proteinsynthese darstellt (Zimmermann *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2006; Rapoport, 1991; Palade, 1975). Diese Zielsteuerung zur ER-Membran, auch „targeting“ genannt, nutzen viele Transportsubstrate mit einer Signalsequenz an deren N-Terminus (Nyathi *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011; Ng *et al.*, 1996; Blobel und Dobberstein, 1975a, b), welche ~20 % aller humanen Proteine besitzen (Kanapin *et al.*, 2003), wobei dieser Wert in dem Bakterium *Escherichia coli* nur ~10 % beträgt (Ivankov *et al.*, 2013). Diese Signalsequenz besteht in der Regel aus 15-30 Aminosäuren (aa, engl. amino acids) und ist in eine basische, polare und hydrophobe Region unterteilt (Zimmermann *et al.*, 2011; Futatsumori-Sugai und Tsumoto, 2010; Hiss und Schneider, 2009; Gierasch, 1989; von Heijne, 1984). Das „targeting“ von naszierenden Polypeptiden wird grundsätzlich in drei Schritte unterteilt (Dudek *et al.*, 2015; Rapoport, 2008; Zimmermann *et al.*, 2006):

- I. Start der Proteinsynthese im Cytosol und Erkennung der Signalsequenz
- II. Transport zur ER-Membran mit Hilfe von löslichen und membrangebunden Proteinen
- III. Translokation in das ER-Lumen oder Integration in die Membran

2. Einleitung

Generell wird zwischen zwei Transport-Modi, der co- und posttranslationale Proteintransport, unterschieden. Jedoch hängt die Wahl der Transportroute von der Größe des Proteins und der Hydrophobizität der Signalsequenz ab (Vermeire *et al.*, 2014; Lakkaraju *et al.*, 2012; Hatsuzawa *et al.*, 1997). So werden z.B. Proteine mit einer Größe von >160 aa bevorzugt cotranslational zur ER-Membran transportiert (Lakkaraju *et al.*, 2012). Losgelöst von der jeweiligen Route wird der Sec61-Komplex für die Translokation der naszierenden Polypeptidkette in das ER-Lumen benötigt (Mandon *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011; Kalies *et al.*, 1998). Für Sec61 werden in der Literatur unter anderem Synonyme wie Translokator oder Proteintranslokase verwendet. Bei dem cotranslationalen Proteintransport wird das naszierende Polypeptid mit dem translatierenden Ribosom, der sogenannte Ribosom-naszierende-Kette-Komplex (RNC, engl. ribosome-nascent chain complex), zunächst von dem Signalerkennungspartikel (SRP, engl. signal recognition particle) gebunden und zum ER-membranständigen SRP-Rezeptor (SR) transportiert (Lang *et al.*, 2017; Nyathi *et al.*, 2013; Park und Rapoport, 2012). Durch die Interaktion mit dem SR, wird der RNC zum Translokationskomplex, der als Kernkomponente den Sec61-Komplex enthält, manövriert (Kalies und Römisch, 2015; Park und Rapoport, 2012; Rapoport, 2007; Kalies *et al.*, 1998). Sobald das synthetisierte Polypeptid in das ER-Lumen ragt, bindet das lumenale Chaperon BiP und verhindert somit ein Zurückrutschen der Polypeptidkette (Dudek *et al.*, 2015; Zimmermann *et al.*, 2011; Tyedmers *et al.*, 2003; Nicchitta und Blobel, 1993). Bei dem posttranslationalen Proteintransport zur ER-Membran wird das Polypeptid vollständig im Cytosol an freien Ribosomen synthetisiert. Dieser Transport wird durch cytosolische Hsp70-Chaperone und dessen Hsp40-Co-Chaperone bewerkstelligt, die das Polypeptid durch Bindung an hydrophobe Regionen vor Aggregationen schützen und das Polypeptid weiterhin löslich und in einer kompetenten Form halten, um mit dem Translokationsapparat zu interagieren (Cloutier und Coulombe, 2013; Zimmermann *et al.*, 2011; Ngosuwana *et al.*, 2003; Frydman *et al.*, 1994; Langer *et al.*, 1992). Zusätzlich bindet der Sec62/Sec63-Komplex an die Translokase, und rekrutiert BiP über eine J-Domäne zum Sec61-Komplex um somit ein Zurückrutschen des synthetisierten Polypeptides zu verhindern (Linxweiler *et al.*, 2017; Dudek *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2013b; Lang *et al.*, 2012; Zimmermann *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2010; Tyedmers *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2000; Misselwitz *et al.*, 1999).

Neben BiP und dessen Nukleotidaustauschfaktoren (NEF, engl. nucleotide exchange factor) GRP170 und Sil1 existieren weitere Faktoren, die die Effizienz des Proteinimports in das ER-Lumen erhöhen. Hierzu zählt unter anderem TRAM (engl. translocating chain-associated

membrane protein), das für die Translokation vieler Proteine benötigt, wobei die Ladung des N-Terminus, sowie die Hydrophobizität der Signalsequenz bestimmt, ob der Transport TRAM-abhängig verläuft oder nicht (Ott und Lingappa, 2002; Voigt *et al.*, 1996; Görlich und Rapoport, 1993; High *et al.*, 1993; Görlich *et al.*, 1992b). Daneben scheint TRAM bei manchen Proteinen in der Integration in die ER-Membran eine Rolle zu spielen (Heinrich *et al.*, 2000; Do *et al.*, 1996). TRAP (engl. translocon-associated protein complex) wird ebenso für eine effiziente Translokation benötigt, was durch dessen Stöchiometrie von 1:1 mit Sec61 untermauert wird (Pfeffer *et al.*, 2012; Ménétret *et al.*, 2008; Fons *et al.*, 2003; Wang und Dobberstein, 1999; Hartmann *et al.*, 1993). Sobald eine naszierende Polypeptidkette in das ER-Lumen ragt, wird diese weiter prozessiert oder modifiziert, was nach Abschluss oder schon während der Translokation erfolgen kann. Solche Modifikationen beinhalten unter anderem die Abspaltung der Signalsequenz von dem naszierenden Polypeptid durch die Signalpeptidase (SPase) (Auclair *et al.*, 2012; Tuteja, 2005; Paetzel *et al.*, 2002), die Glykosylierung von Asparaginresten durch die Oligosacharyltransferase (OST) (Breitling und Aebi, 2013; Mohorko *et al.*, 2011; Imperiali und Hendrickson, 1995) oder die Assemblierung von Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit Proteinen durch die GPI-Transamidase (Ashida *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2003; Benghezal *et al.*, 1996).

2.3 Der Sec61-Komplex

Der ER-membranresidente Sec61-Komplex (engl. secretion 61 complex) stellt die zentrale Komponente des Translokationsapparates dar, welcher für die Translokation von naszierenden Polypeptiden in das ER-Lumen und die Integration in die Membran von essentieller Bedeutung ist (Lang *et al.*, 2017; Zimmermann, 2016; Dudek *et al.*, 2015; Mandon *et al.*, 2013; Park und Rapoport, 2012; Schuck *et al.*, 2009). Dieser heterotrimere Komplex besteht aus den Sec61 α -, Sec61 β - und Sec61 γ -Untereinheiten (Lang *et al.*, 2017; Zimmermann *et al.*, 2011; Görlich und Rapoport, 1993; Görlich *et al.*, 1992a; Görlich *et al.*, 1991). Hierbei weisen die Sec61 α - und die Sec61 γ -Untereinheiten eine hohe Homologie zwischen verschiedenen Spezies auf (Mandon *et al.*, 2013; Broughton *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1994; Görlich *et al.*, 1992a), wobei die Sec61 β -Untereinheit einen geringen Homologiegrad aufweist und zumindest im Bakterium und in der Hefe für die Translokation und das Überleben nicht essentiell zu sein scheint (Zhu *et al.*, 2018; Rapoport, 2008; Finke *et al.*, 1996; Brundage *et al.*, 1990). Jedoch führt eine Depletion von Sec61 β in humanen Zellen zu ER-Stress, welcher normalerweise durch die Interaktion von Mikrotubuli mit der

2. Einleitung

cytosolisch gelegenen Bindestelle von Sec61 β reduziert wird (Zhu *et al.*, 2018). In Säugerzellen sind die β - und γ -Untereinheiten kleine „tail-anchored“-Membranproteine, wohingegen die Sec61 α -Untereinheit 10 TMD (Transmembrandomänen) umfasst, welche durch sogenannten „loops“ miteinander verbunden sind und sowohl der N-, als auch der C-Terminus cytosolisch lokalisiert ist (Abb. 2.1). Damit liegt es nahe, dass die große Sec61 α -Untereinheit die porenbildende Einheit des Sec61-Komplexes bildet, was durch elektrophysiologische und biochemische Experimente bestätigt werden konnte (Zimmermann *et al.*, 2011; Le Gall *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2003; Hamman *et al.*, 1997; Crowley *et al.*, 1994; Simon und Blobel, 1991).

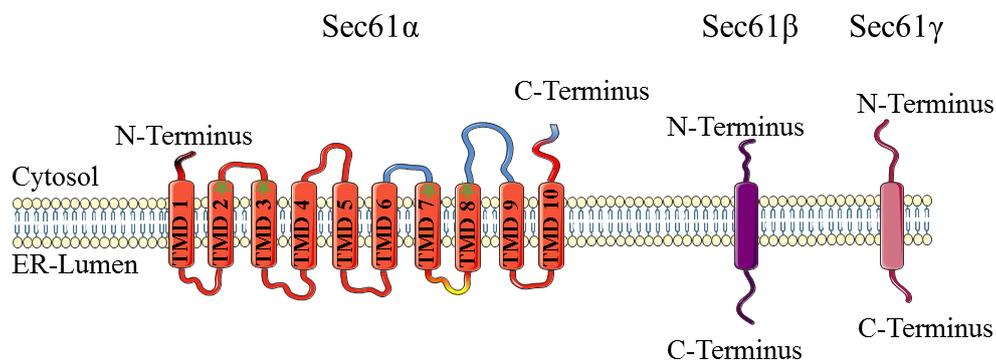


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Topologie der Sec61 α -, β - und γ -Untereinheiten. Die Sec61 α -Untereinheit besteht aus 10 Transmembrandomänen (TMD). Auf cytosolischer Seite befindet sich am N-Terminus das IQ-Motif, welche eine CaM-Bindestelle darstellt (dunkelrot). Außerdem befindet sich die Ribosomenbindestelle an dem Loop 6 und 8, sowie am Ende des C-Terminus (blau). Der ER-lumennale Loop 7 enthält die BiP-Bindestelle (gelb). Das „lateral gate“ wird durch die TMD 2/3 und 7/8 gebildet (grüner Stern). Die Sec61 β - und γ -Untereinheiten sind jeweils „tail anchored“-Membranprotein mit jeweils einem cytosolisch lokalisierten N- und ER-luminalen C-Terminus.

Die TMD 1-5 mit deren Loops der Sec61 α -Untereinheit stellt das Spiegelbild der TMD 6-10 dar. In der zuletzt genannten Hälfte bilden die Loops 6 und 8, sowie ein Teil des C-Terminus die Ribosom-Bindestelle (Becker *et al.*, 2009; Ménétret *et al.*, 2008; Van den Berg *et al.*, 2004) (Abb. 2.1). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Calmodulin (CaM)-Bindestelle am N-Terminus und eine BiP-Bindestelle am Loop 7 lokalisiert ist (Schorr *et al.*, 2015; Schäuble *et al.*, 2012; Erdmann *et al.*, 2011). In der bisher einzigen Kristallstruktur von Sec61 α von dem Archaeon *Methanococcus jannaschii*, welche dann für Modelle von Säugern interpoliert wurde, zeigt die Sec61 α -Untereinheit einen Durchmesser von 20-25 Å am trichterförmigen Kanaleingang (Van den Berg *et al.*, 2004). Das hydrophile Innere der Pore besitzt einen theoretischen Durchmesser von 10-24 Å (Bonardi *et al.*, 2011; Gumbart und Schulten, 2007; Hanein *et al.*, 1996), was deutlich von anderen Studien abweicht, die einen Durchmesser von 6-60 Å postulierten (Van den Berg *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2003; Hamman

et al., 1997). Ein Durchmesser von 10-20 Å wäre für eine schlaufenartige Translokation eines naszierenden Polypeptides jedoch ausreichend (Van den Berg *et al.*, 2004), was für diese Größenordnung sprechen würde, da gezeigt werden konnte, dass die naszierende Polypeptidkette nicht nur im Kanal selbst, sondern auch auf der cytosolischen Seite während der Translokation Schlaufen bildet (Park *et al.*, 2014; Park und Rapoport, 2012; Shaw *et al.*, 1988). Diese Flexibilität der Pore könnte mit einer Verlagerung der TMDs erfolgen, die die Pore flankieren, was durch Bewegung des Loop 4 unterstützt werden kann (Van den Berg *et al.*, 2004). Im Inneren sind 6 Isoleucine (hydrophob) lokalisiert, welche den sogenannten „pore-ring“ bilden, der eine dichtungsartige Struktur um das naszierende Polypeptid formt und somit das Passieren von kleinen Molekülen verhindert (Van den Berg *et al.*, 2004). Unterhalb davon befindet sich der durch die TMD 2a gebildete „plug“, welcher den Kanal im nativen Zustand verschließt (Park und Rapoport, 2011; Saparov *et al.*, 2007). Das sogenannte „lateral gate“ erlaubt die Insertion von Polypeptiden in die ER-Membran, welches durch die TMD 2/3 und 7/8 gebildet wird (Van den Berg *et al.*, 2004) (Abb. 2.1). Die Öffnung des „lateral gate“ erfolgt durch eine Aufhebung der hydrophoben Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beteiligten TMDs. Die Sec61 α -Pore wird zum einen durch die Bindung von dem Ribosom und zum anderen durch die Interkalation der Signalsequenz im „lateral gate“ geöffnet (Voorhees und Hegde, 2016; Voorhees *et al.*, 2014; Knyazev *et al.*, 2013; Van den Berg *et al.*, 2004). Die Bindestelle ist sogar im geschlossenen Zustand für die Signalsequenz erreichbar und kann somit zwischen TMD 2 und 7 interkalieren, was eine Destabilisierung des „plug“ bewirkt und somit den Kanal für das naszierende Polypeptid öffnet (Voorhees und Hegde, 2016; Saparov *et al.*, 2007; Van den Berg *et al.*, 2004). Sec61 α spielt nicht nur in der Translokation eine wichtige Rolle, sondern auch im Ca²⁺-Efflux über die ER-Membran, was ausführlich in Kapitel 2.6.3 erläutert wird. Darüber hinaus steht die Sec61 α -Untereinheit in Verbindung mit anderen Proteinen, die sowohl für die Translokation eines naszierenden Polypeptides, als auch für die Regulierung des Ca²⁺-Efflux entscheidend sind.

2.4 Akzessorische Proteine der Proteintranslokase

Wie oben beschrieben enthält der Translokationsapparat als zentrale Komponente den Sec61-Komplex, welcher mit verschiedenen Proteinen interagiert, um einen effizienten Proteintransport in das ER-Lumen zu gewährleisten. Im Folgenden wird näher auf die wichtigsten Komponenten dieses Apparates eingegangen.

2.4.1 Sec62

Das ER-membranständige Protein Sec62 besitzt 2 TMD und sowohl der C-, als auch der N-Terminus sind cytosolisch lokalisiert (Jung *et al.*, 2014; Deshaies und Schekman, 1990, 1989). Sec62 kommt in einer Konzentration von $\sim 2 \mu\text{M}$ in caninen rauen Mikrosomen (RM) vor und bildet einen Komplex mit Sec63, sowie Sec61 α in Säugerzellen und ist für den posttranslationalen Proteintransport essentiell (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012; Guth *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000; Panzner *et al.*, 1995; Deshaies *et al.*, 1991). Zusätzlich besitzt Sec62 zwei konservierte Peptid-Domänen im N-Terminus, welche die Bindung an Ribosomen ermöglicht (Lang *et al.*, 2012), weshalb angenommen wird, dass Sec62 möglicherweise auch an dem cotranslationalen Proteintransport beteiligt ist (Conti *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2000). Des Weiteren limitiert Sec62 den Sec61 α -induzierten Ca^{2+} -Efflux (Linxweiler *et al.*, 2013; Greiner *et al.*, 2011a).

2.4.2 BiP

BiP (engl. immunoglobulin heavy chain binding protein) oder auch GRP78 (engl. glucose regulated protein, 78 kDa) ist ein Hsp (engl. heat shock protein)70-Chaperon und ist das abundanteste Chaperon im ER ($\sim 5 \mu\text{M}$ in RM) und übernimmt somit vermutlich die zentrale Funktion der Proteinfaltung (Wieteska *et al.*, 2017; Araki und Nagata, 2012; Weitzmann *et al.*, 2007; Paton *et al.*, 2006; Guth *et al.*, 2004; Bies *et al.*, 1999; Hendershot *et al.*, 1995). BiP spielt allerdings nicht nur eine Rolle in der Proteinfaltung, sondern ist zusätzlich wichtig für die Translokation von naszierenden Polypeptiden in das ER-Lumen. Es erkennt sowohl un-, als auch fehlgefaltete Proteine, ist an der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase des ERs beteiligt und dient als Indikator für ER-Stress (Schorr *et al.*, 2015; Schäuble *et al.*, 2012; Awe *et al.*, 2008; Hegde *et al.*, 2006; Kabani *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2000; Kaufman, 1999; Lièvremonet *et al.*, 1997; Brodsky *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1991). BiP hat mit seiner N-terminalen Nukleotid-Bindedomäne (NBD) und der über einen Linker verbundenen C-terminale Substrat-Bindedomäne (SBD) die typische Hsp70-Struktur inne (Yang *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 1996). Die SBD wird selbst nochmals in die SBD α -Domäne und SBD β -Domäne unterteilt. SBD α ist hierbei wichtig für die Interaktion mit Hsp40-Co-Chaperonen und für die Substratspezifität und dient als Deckel, um die Peptidbindetasche zu verschließen (Yang *et al.*, 2015; Marcinowski *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2005; Mayer und Bukau, 2005). Die allosterische Bindung von BiP an ein Substrat wird erst durch den Austausch und die Hydrolyse von ATP in der NBD ermöglicht (Preissler *et al.*,

2015; Yang *et al.*, 2015). Hierbei zeigt die ADP-gebundene Form eine hohe Bindeaffinität zu Substraten mit einer langsamen Binde- und Dissoziationsrate, wohingegen die ATP-gebundene Form eine niedrige Affinität und schnelle Binde- und Dissoziationsrate aufweist (Yang *et al.*, 2015; Schmid *et al.*, 1994; Flynn *et al.*, 1989; Kassenbrock und Kelly, 1989). Dieser ATP-Zyklus wird aufgrund der geringen intrinsischen ATPase-Aktivität von BiP durch die NEFs stimuliert (Fujimori *et al.*, 2017; Preissler *et al.*, 2017; Wei und Hendershot, 1995; Liberek *et al.*, 1991). In der ATP-gebundenen Form ist die Peptidbindetasche der NBD geöffnet, wohingegen der Austausch von ATP zu ADP diese Bindetasche schließt und BiP das Substrat bindet. Dies wird so lange wiederholt bis das Polypeptid korrekt gefaltet wurde oder als fehlgefaltet erkannt wird und für ERAD vorbereitet wird (Brodsky und Skach, 2011; Kampinga und Craig, 2010; Young, 2010; Kabani *et al.*, 2003). Da BiP die Translokation von naszierenden Polypeptiden unterstützt, muss eine räumliche Nähe zu Sec61 α vorhanden sein, was letztlich durch eine Bindestelle im Loop 7 der Sec61 α -Untereinheit gezeigt werden konnte (Schorr *et al.*, 2015; Schäuble *et al.*, 2012; Tyedmers *et al.*, 2003). Hierbei verschließt BiP den Sec61 α -Kanal kurz nach Beginn und zwischen Translokationszyklen und dient somit als Barriere für kleine Moleküle und Ca²⁺ (Schorr *et al.*, 2015; Schäuble *et al.*, 2012; Alder *et al.*, 2005; Haigh und Johnson, 2002; Hamman *et al.*, 1998). Darüber hinaus bindet BiP an die 3 Hauptregulatoren der sogenannten „unfolded protein response“ (UPR) PERK (engl. PKR-like ER kinase), Ire1 (engl. inositol requiring element) und ATF6 (engl. activating transcription factor 6), welche durch Dissoziation von BiP aktiviert werden, was durch unterschiedliche Faktoren wie z.B. Akkumulierung von fehlgefalteten Proteinen ausgelöst werden kann (Lewy *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2008; Lee, 2005; Bertolotti *et al.*, 2000). BiP wird des Weiteren durch Hsp40-Co-Chaperone mit Hilfe deren J-Domäne (siehe Kapitel 2.4.5) zum Sec61-Komplex rekrutiert, unter die auch ERj4 fällt, welches wichtig für die Differenzierung von B-Zellen zu sein scheint (Fritz und Weaver, 2014). Da ein Fehlen von ERj4 zu einer Induktion der UPR und anschließender Apoptose führen kann, wird das Aufheben des Zusammenspiels von ERj4 und BiP als mögliche Ursache der gestörten Differenzierung in Betracht gezogen, da die cytoprotektive Rolle von BiP unter anderem von der ERj4 J-Domäne abhängt (Fritz *et al.*, 2014; Fritz und Weaver, 2014; Puthalakath *et al.*, 2007; Kurisu *et al.*, 2003).

2.4.3 GRP94

GRP94 ist ein ER-luminales Chaperon der Hsp90-Familie und besteht prinzipiell aus den folgenden 4 Domänen: N-terminale Domäne (NTD), saure Linker-Domäne (LD), mittlere

Domäne (MD) und eine C-terminale Domäne (CTD) (Eletto *et al.*, 2010; Krukenberg *et al.*, 2009; Dollins *et al.*, 2007; Immormino *et al.*, 2004). GRP94 ist wie BiP eine ATPase, wobei die Nukleotid-Bindestelle innerhalb der NTD liegt und diese Aktivität durch die LD und MD unterstützt wird (Eletto *et al.*, 2010; Ostrovsky *et al.*, 2009). GRP94 wird ubiquitär exprimiert und unterstützt die Faltung von Polypeptiden und wird bei ER-Stress hochreguliert (Huck *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2013a; Eletto *et al.*, 2010; Rutkowski *et al.*, 2007). Außerdem bewirkt eine Depletion von GRP94 in Mäusen eine Störung der B-Zell-Differenzierung, was mit einer verminderten Antikörpersynthese einhergeht, weshalb GRP94 eine Rolle in der Faltung von Antikörpern und Entwicklung von B-Zellen zugesprochen wird (Rosenbaum *et al.*, 2014; Liu und Li, 2008; Gass *et al.*, 2002).

2.4.4 Proteindisulfidisomerase (PDI)

PDI ist ein abundantes Chaperon und Faltungskatalysator im ER-Lumen, wo es Disulfide in Proteinen ausbildet (Oxidase-Aktivität) und die Umstrukturierung von inkorrekten Disulfiden katalysiert (Isomerase-Aktivität) (Wilkinson und Gilbert, 2004; Freedman *et al.*, 1998; Gilbert, 1998; Laboissiere *et al.*, 1995; LaMantia und Lennarz, 1993). PDI wird in die 5 a-, b-, b^c-, a^c- und c-Domänen unterteilt, wobei die a- und a^c-Domäne jeweils eine unabhängige aktive Seite aufweisen, welche 2 Cysteinreste enthalten, die die PDI-Aktivität bestimmen (Wilkinson und Gilbert, 2004; Darby *et al.*, 1996; Edman *et al.*, 1985). Außerdem verhindert PDI eine Aggregation von misgefalteten Proteinen und wird aufgrund der Anwesenheit von UPR-Elementen in dem Promoter bei ER-Stress hochreguliert (Wilkinson und Gilbert, 2004; Mori *et al.*, 1998; Quan *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1994). Zusätzlich wird PDI für die Bildung von Disulfidbrücken während der Antikörpersynthese benötigt und nimmt somit eine wichtige Aufgabe am Ende der B-Zell-Differenzierung wahr (Mezghrani *et al.*, 2001; Markus und Benezra, 1999; Paver *et al.*, 1989).

2.4.5 Hsp40-Co-Chaperone (ERj1-7)

Alle Hsp40-Co-Chaperone besitzen die typische J-Domäne (meist N-terminal), welche aus vier insgesamt ~70 aa langen α -Helices bestehen, mit der diese Proteine mit Hsp70-Chaperonen durch deren NBD interagieren können (Bascos *et al.*, 2017; Hennessy *et al.*, 2005; Wittung-Stafshede *et al.*, 2003; Greene *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1996). Diese J-Domäne enthält ein konserviertes Tripeptid-Motiv (HPD-Motiv), welches wichtig für die ATPase-Aktivität der Hsp70-Chaperone ist (Hennessy *et al.*, 2000; Cheetham und Caplan, 1998). Die

Nomenklatur der in Säugerzellen vorkommenden Hsp40-Co-Chaperone lautet ERj1-7. Davon sind ERj1, ERj2, ERj4 und ERj7 integrale ER-Membranproteine (Linxweiler *et al.*, 2017; Zahedi *et al.*, 2009; Kurisu *et al.*, 2003; Dudek *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002b; Chevalier *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000) und ERj3, ERj5 und ERj6 lösliche Proteine im ER-Lumen (Schorr *et al.*, 2015; Braakman und Hebert, 2013; Araki und Nagata, 2012; Ushioda *et al.*, 2008; Shen und Hendershot, 2005). Im Folgenden wird jedoch nur näher auf ERj2, ERj3 und ERj6 eingegangen.

ERj2 (Sec63)

Das integrale ER-Membranprotein ERj2 (Sec63) besitzt 3 TMD, sowie ein cytosolisch lokalisierter C- und ER-luminaler N-Terminus, wobei die J-Domäne zwischen der TMD 2 und TMD 3 lokalisiert ist, welche BiP zum Sec61-Komplex rekrutiert (Linxweiler *et al.*, 2017; Ampofo *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2000; Misselwitz *et al.*, 1999; Skowronek *et al.*, 1999; Feldheim *et al.*, 1992). Sec63 liegt wie Sec61 α und Sec62 mit einer Konzentration von $\sim 2 \mu\text{M}$ in RM vor, was die Komplexbildung mit diesen Proteinen untermauert (Lang *et al.*, 2012; Guth *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass der Sec62/Sec63-Komplex durch die Interaktion des positiv geladenen N-Terminus von Sec62 mit dem negativ geladenen C-Terminus von Sec63 stabilisiert wird (Jung *et al.*, 2014; Willer *et al.*, 2003; Wittke *et al.*, 2000). Sec63 ist somit an dem Transport naszierender Polypeptiden in das ER-Lumen beteiligt, wobei hier eine gewisse Substratspezifität vorliegt (Lang *et al.*, 2012; Schäuble *et al.*, 2012; Görlich und Rapoport, 1993; Blobel und Dobberstein, 1975a). Eine Studie mit Sec63-defizienten (Sec63^{-/-}) Zellen hat gezeigt, dass Sec63 für das Überleben und Wachstum der Zellen nicht notwendig zu sein scheint (Lang *et al.*, 2012).

ERj3

ERj3 ist ein lösliches Hsp40-Co-Chaperon im ER-Lumen und ist das Homolog zu Scj1 in der Hefe. ERj3 liegt mit einer Konzentration von $\sim 0,3 \mu\text{M}$ in RM vor und kann selbst als Oligomere an naszierende Polypeptide binden, wobei eine Rekrutierung von BiP über die J-Domäne an das Polypeptid den ERj3-Peptid-Komplex wieder aufhebt (Melnik *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2009; Vembar *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2008; Nicoll *et al.*, 2007; Weitzmann *et al.*, 2007; Shen und Hendershot, 2005; Bies *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2000; Bies *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass ERj3 an der Entfaltung von bestimmten Substraten als

Vorbereitung für ERAD beteiligt ist, was sich in dem erhöhten ERj3-Gehalt bei ER-Stress widerspiegelt (Ichhaporia *et al.*, 2015; Shen und Hendershot, 2005; Yu und Haslam, 2005). Zusätzlich liegt ERj3 in einem Komplex mit Sec61 α , TRAP α und Ribosomen vor (Guo und Snapp, 2013; Dejgaard *et al.*, 2010). Durch die räumliche Nähe zu Sec61 α konnte gezeigt werden, dass ERj3 den Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux limitiert (Schorr *et al.*, 2015).

ERj6 (p58^{IPK})

ERj6 wurde zuerst als ER-Membranprotein beschrieben, dessen Funktion in der negativen Regulierung des UPR-Aktivators PERK liegt, wobei jedoch im Jahr 2007 ERj6 als lösliches ER-luminales Protein nachgewiesen wurde, was bis heute Bestand hat (Rutkowski *et al.*, 2007; van Huizen *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass ERj6 ein ER-Retentionssignal besitzt und selbst Substrate bindet und darüber hinaus BiP an diese rekrutiert, was von ATP und der Interaktion der J-Domäne abhängig ist (Petrova *et al.*, 2008; Rutkowski *et al.*, 2007). Die J-Domäne von ERj6 ist in der Nähe des C-Terminus lokalisiert und der N-Terminus besteht aus 9 Tetratricopeptiden (TPR-Domäne), wobei beide Domänen durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind (Svärd *et al.*, 2011). Die Eigenschaft selbst Substrate binden zu können, geht mit einer Assoziierung mit Sec61 α konform (Oyadomari *et al.*, 2006). Durch diese Assoziierung konnte gezeigt werden, dass sowohl ERj3, als auch ERj6 den Ca²⁺-Efflux regulieren (Schorr *et al.*, 2015). Darüber hinaus wird ERj6 während der Differenzierung von B- zu Plasmazellen bereits ~36 h nach LPS-Stimulierung hochreguliert, was vermutlich XBP1-abhängig ist (Goldfinger *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2010).

2.5 UPR und ERAD

Das ER ist für die Prozessierung und Faltung von naszierenden Polypeptiden essentiell. Da es im Zuge dieses Prozesses zu einer Akkumulation von fehl- oder misgefalteten Proteinen kommen kann, reagiert die Zelle mit der sogenannten UPR. Dieser Mechanismus dient zur Erniedrigung der Proteinsynthese, Hochregulierung von Proteinen, welche die Faltung von misgefalteten Polypeptiden unterstützen, sowie die Aktivierung der ER-assoziierten Degradation (ERAD) (Chakrabarti *et al.*, 2011; Vembar und Brodsky, 2008; Ron und Walter, 2007; Harding *et al.*, 1999). Prinzipiell wird durch die Aktivierung der UPR versucht die ER-Homöostase wieder herzustellen. Wird der ER-Stress jedoch unüberwindbar, werden pro-

apoptotische Signalwege eingeleitet (Hiramatsu *et al.*, 2015; Demay *et al.*, 2014; Sano und Reed, 2013; Urra *et al.*, 2013; Tabas und Ron, 2011; Kim *et al.*, 2006). Die 3 Signalwege der UPR werden durch die integralen ER-Membranproteine IRE1 α , PERK, sowie ATF6 α induziert (Yoshida *et al.*, 2000; Harding *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1998) (Abb. 2.2). Es konnte gezeigt werden, dass BiP an diese Proteine bindet und somit den inaktiven Zustand aufrecht erhält, wobei eine Dissoziation, ausgelöst durch eine Akkumulation von misgefalteten Proteinen, die 3 Signalkaskaden aktivieren kann (Carrara *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2002a; Bertolotti *et al.*, 2000). Eine neuere Studie hat jedoch gezeigt, dass zumindest PERK in der Lage ist fehlgefaltete Proteine zu binden und somit die UPR zu aktivieren (Wang *et al.*, 2018b).

Durch die Dimerisierung und Phosphorylierung von PERK wird die Proteinsynthese durch die Phosphorylierung von eIF2 α (engl. eukaryotic translation initiation factor-2 α) gestoppt. Diese Inaktivierung von eIF2 α induziert daraufhin die Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP (engl. C/EBP-homologous protein), welche den programmierten Zelltod auslösen (Ron und Walter, 2007; Lu *et al.*, 2004; Harding *et al.*, 2000). ATF6 α wird nach dessen Aktivierung im Golgi-Apparat gespalten und kann somit als Transkriptionsfaktor die Hochregulierung von Proteinen zur Reduzierung des ER-Stresses steuern (Ron und Walter, 2007; Haze *et al.*, 1999). Die Aktivierung von IRE1 α hat eine Dimerisierung zur Folge und durch Autophosphorylierung wird seine Endonucleasefunktion induziert, welche die mRNA von XBP-1u (engl. X-box binding protein-1 unspliced) spaltet, wodurch der aktive Transkriptionsfaktor XBP-1s (engl. X-box binding protein-1 spliced) gebildet wird, welcher wiederum eine Hochregulierung von faltungsunterstützenden Proteinen und ERAD bewirkt (Sha *et al.*, 2009; Ron und Walter, 2007).

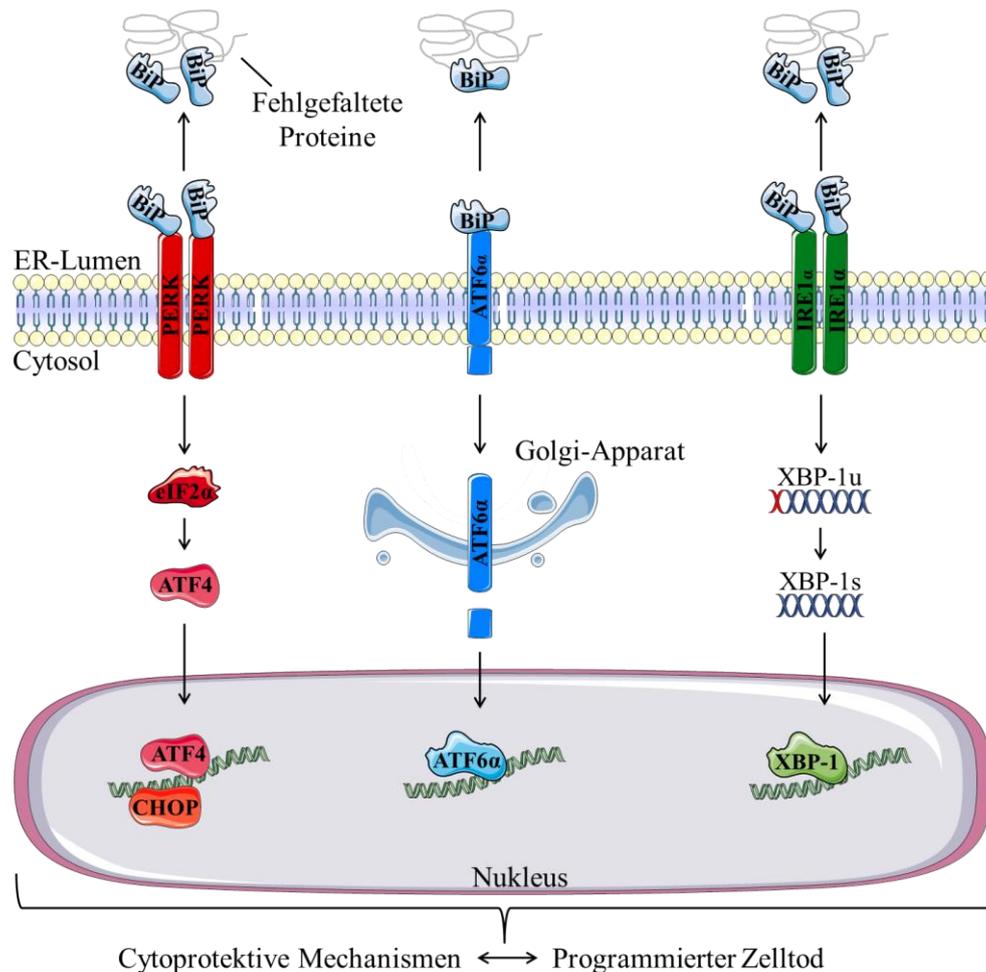


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung der „unfolded protein response“ (UPR). Die 3 Signalwege PERK, ATF6 α und IRE1 α werden durch die Bindung von BiP im inaktiven Zustand gehalten. Bei Akkumulation von fehl- oder misgefalteten Proteinen dissoziiert BiP und aktiviert somit die jeweiligen Signalkaskaden. PERK dimerisiert und aktiviert durch Phosphorylierung eIF2 α , was einen Stopp der Translation zur Folge hat. eIF2 α aktiviert wiederum die pro-apoptotischen Transkriptionsfaktoren ATF4 und CHOP. ATF6 α wird durch dessen Aktivierung im Golgi-Apparat gespalten und liegt danach als löslicher Transkriptionsfaktor vor. Die Dimerisierung und Autophosphorylierung von IRE1 α bewirkt eine Spaltung von XBP-1u in den aktiven Transkriptionsfaktor XBP-1s. Dieser Transkriptionsfaktor dient zur Hochregulierung von Proteinen, die zu einer Verminderung des ER-Stresses dienen. Wird der ER-Stress jedoch unüberwindbar, so werden pro-apoptotische Signalwege eingeleitet.

Die UPR hat eine wichtige physiologische Relevanz in der Differenzierung der B- zu Plasmazellen. Hierbei scheint der IRE1 α -Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen, da XBP-1 für eine Expansion des ERs und für die Adaption an die hohe Proteinsynthese der Immunglobuline (Ig) benötigt wird (Grootjans *et al.*, 2016; Shaffer *et al.*, 2004; Reimold *et al.*, 2001). Die wichtige Rolle von XBP-1 wird durch die Tatsache unterstützt, dass aus XBP-1^{-/-}-B-Zellen keine Plasmazellen hervorgehen können und somit die Synthese von Ig und Interleukinen (IL) gestört ist, welche zur Differenzierung benötigt werden (Benhamron *et al.*, 2015; Benhamron *et al.*, 2014; Todd *et al.*, 2009; Iwakoshi *et al.*, 2003). Die entscheidende Rolle der IRE1 α -Signalkaskade in der Differenzierung wurde weiterhin untermauert, da

PERK und ATF6 α vermutlich nicht für die Differenzierung benötigt werden (Aragon *et al.*, 2012; Gass *et al.*, 2008). Eine nicht-physiologische Aktivierung der UPR ist jedoch durch die Zugabe verschiedener Substanzen möglich, welche auf unterschiedliche Weisen ER-Stress auslösen können. Dazu gehören unter anderem der *N*-Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin (TUNI), das Detergens Dithiothreitol (DTT), der Inhibitor der sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) Thapsigargin (TG) oder der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (BTZ) (Yoo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2008; DuRose *et al.*, 2006; Obeng *et al.*, 2006; Marciniak *et al.*, 2004; Kaufman, 1999).

Die Eliminierung der akkumulierten fehl- oder misgefalteten Proteine erfolgt durch ERAD (Abb. 2.3). Hierbei werden die zu degradierenden Proteine durch unterschiedliche Chaperone erkannt und zur ER-Membran transportiert (Dong *et al.*, 2008; Denic *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2001; Knittler *et al.*, 1995). Die misgefalteten Proteine müssen über die ER-Membran in das Cytosol transportiert werden, wo sie durch die Klasse der E3-Ligasen polyubiquitiniert werden (Lemus und Goder, 2014; Hirsch *et al.*, 2009; Vembar und Brodsky, 2008). Hierbei ist allerdings noch nicht ganz klar, welches Protein bzw. welche Proteine die retrograde Translokation der Polypeptide erlauben. Jedoch wurde diese Fähigkeit, oder zumindest eine sekundäre Rolle, unter anderem dem Sec61-Kanal zugeschrieben (Vembar und Brodsky, 2008; Kalies *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2000; Pilon *et al.*, 1997; Plemper *et al.*, 1997; Wiertz *et al.*, 1996). Jedoch konnte in Hefe gezeigt werden, dass die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Hrd1 zusammen mit anderen Ligasen den Retrotranslokator bildet (Baldrige und Rapoport, 2016). Diese Retrotranslokation wird durch weitere Faktoren wie Cdc48, auch p97 genannt (Protein des Ubiquitin-Systems), unterstützt (Jentsch und Rumpf, 2007; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2001). Die p97-abhängige Degradierung kann durch die Substanz Eeyarestatin (ES) inhibiert werden, wobei ES zusätzlich die Sec61 α -induzierte Translokation inhibiert (Wang *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). Zusätzlich erhöht ES den Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux, wodurch die wichtige Rolle von Sec61 innerhalb des Degradationsprozesses nochmals hervorgehoben wird (Gamayun *et al.*, 2018). ERAD endet mit dem unter ATP-Verbrauch stattfindenden proteolytischen Abbau der polyubiquitinierten Proteine durch das Proteasom (Kaiser und Römisch, 2015; Husnjak *et al.*, 2008; Vembar und Brodsky, 2008; Ng *et al.*, 2007; Kalies *et al.*, 2005).

2. Einleitung

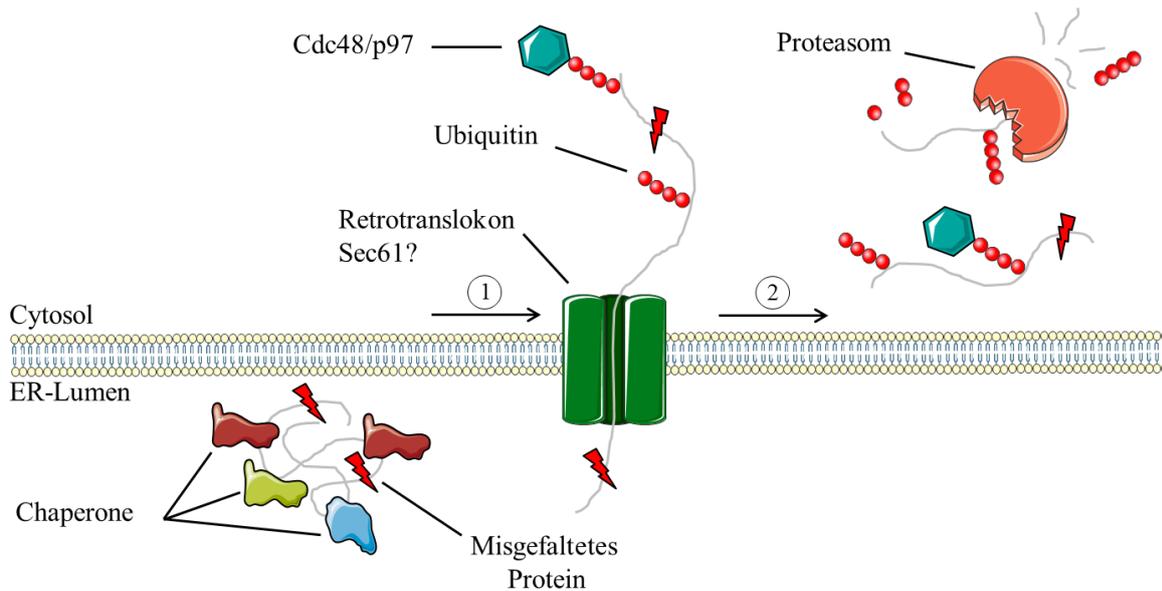


Abbildung 2.3. Schematische Darstellung von ERAD. 1) Misgefaltete Proteine (roter Blitz) werden von unterschiedlichen Chaperonen erkannt und gebunden. Diese werden dann zur Retrotranslokase (grün) rekrutiert, um über die ER-Membran ins Cytosol transportiert zu werden. Ein möglicher Kandidat für den retrograden Transport ist der Sec61-Kanal (siehe Text). Cdc48/p97 (türkis) unterstützt nicht nur die Retrotranslokation, sondern auch die Polyubiquitinierung (rote Kugel) des misgefalteten Proteins. 2) Nach erfolgreicher Retrotranslokation und ausreichender Polyubiquitinierung wird das Protein zum cytosolisch lokalisierten Proteasom transportiert, um unter ATP-Verbrauch proteolytisch abgebaut zu werden.

2.6 Ca^{2+} -Homöostase

In der Zelle existieren unzählige, weit verzweigte Signalwege, welche verschiedene Funktionen ausüben. Diese Signalkaskaden werden mitunter durch sogenannte „second messenger“ induziert, deren Vorhandensein und Aktivität wiederum durch primäre Signale beeinflusst wird. Zu solchen „second messenger“ zählen z.B. cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), aber auch Ca^{2+} . Die durch Ca^{2+} aktivierten, breit gefächerten Signalwege sind für mehrere intrazelluläre Prozesse wie Proliferation, Differentiation, Sekretion, Kontraktion, Transport, Transkription, Apoptose, Entwicklung und Lernen essentiell (Vilborg *et al.*, 2016; Kuo und Ehrlich, 2015; Pinto *et al.*, 2015; Ambudkar, 2012; Kawamoto *et al.*, 2012; Rosenberg und Spitzer, 2011; Berridge *et al.*, 2003; Rizzuto *et al.*, 2003; Carafoli, 2002; Berridge *et al.*, 2000; Pillai *et al.*, 1990). Aufgrund dessen müssen die Ca^{2+} -Fluktuationen streng kontrolliert werden, was die Zelle durch eine intrazelluläre Kompartimentierung reguliert, wodurch enorme Gradienten aufrechterhalten werden. Das ER hat als intrazellulärer Hauptspeicher eine Konzentration an freiem Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) von $\sim 500 \mu\text{M}$, wobei durch Ca^{2+} -puffernde Proteine eine Gesamtkonzentration von 1-2 mM möglich sein kann, was wiederum der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration entspricht

($[Ca^{2+}]_{ext}$) (Henderson *et al.*, 2015; Bianchi *et al.*, 2004; Dvorak *et al.*, 2004; Yu und Hinkle, 2000; Pepperell *et al.*, 1999; Bygrave und Benedetti, 1996; Hofer und Schulz, 1996). Im Gegensatz dazu herrscht im Cytosol eine bis zu 10.000-mal geringere Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) von 50-100 nM (Berridge *et al.*, 2000). Die hohe $[Ca^{2+}]_{ER}$ dient nicht nur als Reserve für die Aktivierung von Signalwegen, sondern ist darüber hinaus für die Funktion des ERs essentiell, was vor allem die Prozessierung von Proteinen betrifft (Peters und Raghavan, 2011; Stevens und Argon, 1999; Lièvreumont *et al.*, 1997; Sambrook, 1990). In den folgenden Unterkapiteln wird näher auf die wichtigsten Vertreter und Mechanismen zur Aufrechterhaltung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase eingegangen.

2.6.1 Ca^{2+} -Pumpen und -Austauscher für die „ Ca^{2+} -Clearance“

Wie oben beschrieben sind durch die zelluläre Kompartimentierung unterschiedliche Reaktionsräume mit unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen entstanden. Diese großen Gradienten erfordern eine strikte Regulierung und Aufrechterhaltung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase, da eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ zur Aktivierung verschiedener Prozesse führen kann (Jung und Akkus, 2016; Ermakov *et al.*, 2012; Nunes und Demaurex, 2010). Der Mechanismus des Ca^{2+} -Transports aus dem Cytosol, aufgrund eines transienten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{cyt}$, wird prinzipiell als „ Ca^{2+} -Clearance“ bezeichnet. Hierfür sind hauptsächlich in der ER-Membran die SERCA und in der Plasmamembran die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der Natrium (Na^+)/Calcium (Ca^{2+})-Austauscher (NCX, engl. Na^+/Ca^{2+} exchanger) verantwortlich. Die beiden P-Typ ATPasen (SERCA und PMCA), sind durch eine Formierung eines hoch energetischen Intermediates während dem Transport von Ca^{2+} über die Membran charakterisiert. Hierbei transportiert die PMCA ein Ca^{2+} im Austausch für ein Wasserstoffion (H^+) pro hydrolysiertes ATP und die SERCA zwei Ca^{2+} im Austausch für 2-3 H^+ pro hydrolysiertes ATP (Di Leva *et al.*, 2008; Toyoshima und Inesi, 2004; Yu *et al.*, 1993; Niggli *et al.*, 1982). Die Topologie beider ATPasen scheint auch identisch zu sein. Sie besitzen 10 TMD und insgesamt 3 cytosolische Domänen: A-(engl. actuator binding), N-(Nukleotid-bindende) und P-(Phosphorylierung) Domäne (Di Leva *et al.*, 2008; Carafoli, 2002; Toyoshima und Nomura, 2002; Toyoshima *et al.*, 2000). Die P-Domäne stellt hierbei die katalytische Einheit dar, wohingegen die ATP-Bindestelle in der N-Domäne lokalisiert ist. Zusammen bilden diese Domänen also die aktive Domäne für die ATP-Hydrolyse. Die Bindung und Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung, was den Ca^{2+} -

2. Einleitung

Transport über die Membran ermöglicht (Di Leva *et al.*, 2008; Martonosi und Pikula, 2003; Carafoli, 2002).

Allerdings unterscheiden sich die beiden ATPasen deutlich in deren Regulation. Eine Regulation der SERCA wurde in Herzmuskelzellen ausführlich untersucht. Hier bindet Phospholamban (PLN) an die SERCA und reduziert dessen Affinität für Ca^{2+} , was erst durch die Phosphorylierung von PLN durch die Proteinkinase A oder C (PKA, PKC) rückgängig gemacht wird (Soller *et al.*, 2015; Gustavsson *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2001; Simmerman und Jones, 1998; Kirchberger *et al.*, 1974; Tada *et al.*, 1974). Zusätzlich wird wahrscheinlich die Aktivität der SERCA thermodynamisch reduziert, wenn die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ einen bestimmten Wert erreicht, sodass die Energie durch die ATP-Hydrolyse nicht mehr für den Ca^{2+} -Transport ausreicht (Lervik *et al.*, 2012). Eine ältere Studie hat gezeigt, dass die Aktivität der SERCA auch direkt von der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ abhängig sein könnte (Takenaka *et al.*, 1982). Eine weitere Studie hat dies indirekt bestätigt, da die Aktivität der SERCA in einer $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ -abhängigen Weise durch ERj5 reguliert wird (Ushioda *et al.*, 2016). Jedoch kann die Aktivität der SERCA in jeder Zelle effizient, spezifisch und irreversibel durch Zugabe von TG inhibiert werden (Kijima *et al.*, 1991; Lytton *et al.*, 1991; Thastrup *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu haben verschiedene Studien gezeigt, dass die PMCA durch CaM, saure Phospholipide, Phosphorylierung durch PKA oder PKC, Proteolyse durch Calpain und Oligomerisierung reguliert wird (Dalghi *et al.*, 2013; Zylinska *et al.*, 1998; Enyedi *et al.*, 1989; James *et al.*, 1989; James *et al.*, 1988; Kosk-Kosicka und Bzdega, 1988; Neyses *et al.*, 1985; Niggli *et al.*, 1981a; Niggli *et al.*, 1981b). Die nicht aktivierte PMCA besitzt eine geringe Affinität für Ca^{2+} ($K_D = 20\text{-}10\ \mu\text{M}$), wohingegen die Bindung von CaM oder Phospholipiden diese Affinität um das 100-fache senken kann (Di Leva *et al.*, 2008; Falchetto *et al.*, 1992; Falchetto *et al.*, 1991; James *et al.*, 1988; Enyedi *et al.*, 1987).

Der NCX dient ebenso zur Aufrechterhaltung und Kontrolle der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ und besitzt ebenfalls wie die ATPasen 10 TMD und einen großen cytosolischen f-Loop (Liao *et al.*, 2012). Der N-Terminus enthält hierbei die ersten 5 TMD und der C-Terminus die restlichen 5 TMD. In diesen beiden Teilen ist jeweils ein $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Segment lokalisiert, welche in die Ionenbindung und den -transport involviert sind (Brini und Carafoli, 2011; Hilge *et al.*, 2006; Nicoll *et al.*, 2006). In dem N- und C-Terminus trennenden f-Loop sind die zwei Ca^{2+} -Bindestellen CBD1 und CBD2 (engl. calcium binding domain) lokalisiert, wobei CBD1 eine hohe Affinität für Ca^{2+} ($K_D = \sim 0,2\ \mu\text{M}$) und CBD2 eine 100-1000-fache Erniedrigung der

Affinität aufweist (Verkhatsky *et al.*, 2018; Brini und Carafoli, 2011; Hilge *et al.*, 2006; Nicoll *et al.*, 2006). CBD1 bindet somit im Gegensatz zu CBD2 Ca^{2+} bei geringen Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, was zu einer Konformationsänderung führt und eine Erhöhung der Aktivität um das 25-fache zur Folge hat (Verkhatsky *et al.*, 2018; Giladi *et al.*, 2012; Boyman *et al.*, 2011; Boyman *et al.*, 2009). Der NCX benutzt den elektrochemischen Na^+ -Gradienten, um drei Na^+ in und ein Ca^{2+} aus dem Cytosol zu transportieren (Verkhatsky *et al.*, 2018; Brini und Carafoli, 2011). Dieser Modus kann jedoch auch reziprok ablaufen, was durch eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration und Membrandepolarisation begünstigt wird, während eine Hyperpolarisation oder Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ den gängigen Modus aktiviert (Verkhatsky *et al.*, 2018; Bers, 2002; Blaustein und Lederer, 1999; Kirischuk *et al.*, 1997).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass durch die entsprechenden Eigenschaften, Affinitäten und Regulationsmechanismen die PMCA zwar eine hohe Affinität, aber gleichzeitig eine niedrige Pumpleistung besitzen, wohingegen der umgekehrte Fall bei NCX vorherrscht. Somit sind die PMCA für die Aufrechterhaltung der niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ im Ruhezustand verantwortlich, wobei der NCX für die Ca^{2+} -Clearance nach einer stimulierten intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung eine wichtige Rolle spielt.

2.6.2 Ca^{2+} -bindende Proteine

Die strikte Kontrolle und Aufrechterhaltung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ erfolgt nicht nur durch die ATPasen und Austauscher, sondern auch zum Teil über Ca^{2+} -bindende Proteine. Die Bindung von Ca^{2+} erfolgt über sogenannte EF-Hände oder eine C2-Domäne, wie sie alle konventionellen PKC oder Synaptotagmin enthalten (Corbalan-Garcia und Gomez-Fernandez, 2014; Cho und Stahelin, 2006; Corbalan-Garcia und Gomez-Fernandez, 2006; Nalefski und Falke, 1996). EF-Hände besitzen unter anderem das cytosolisch lokalisierte Protein Parvalbumin, Calbindin-D9K, Calbindin-D28K, Calretinin und CaM (Chazin, 2011; Schwaller, 2010). Jedoch wird von diesen Proteinen zumindest CaM als Ca^{2+} -Sensor beschrieben, welcher erst in hohen Konzentrationen als Ca^{2+} -Puffer dient (Schwaller, 2010; Chin und Means, 2000). Die Rolle Ca^{2+} -bindender Proteine im ER scheint jedoch weitaus wichtiger zu sein, da dadurch nicht nur die Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER beeinflusst wird, sondern ebenso die Funktion unterschiedlicher Faltungs- und Modifizierungsproteine (Coe und Michalak, 2009; Schröder, 2008; Michalak *et al.*, 2002). Zu den Ca^{2+} -bindenden Proteinen im ER zählen vor

allem Calreticulin (CRT), BiP, GRP94, PDI und ERp72. CRT besitzt insgesamt 2 Ca^{2+} -Bindedomänen, wobei eine Domäne eine hohe Affinität ($K_D = 1\mu\text{M}$) und niedrige Kapazität (1 mol Ca^{2+} pro 1 mol CRT) und im Gegensatz dazu die zweite Domäne eine niedrige Affinität ($K_D = 2\text{ M}$) und hohe Kapazität (25 mol Ca^{2+} pro 1 mol CRT) aufweist (Coe und Michalak, 2009; Nakamura *et al.*, 2001; Baksh und Michalak, 1991). Außerdem ist CRT in der Lage 50 % des ER-luminalen Ca^{2+} zu binden (Nakamura *et al.*, 2001). BiP bindet weitere 25 % mit einer niedrigen Kapazität (1-2 mol Ca^{2+} pro mol BiP) und stellt somit ebenfalls ein wichtiges Ca^{2+} -bindendes Protein des ERs dar (Coe und Michalak, 2009; Lièvremont *et al.*, 1997). GRP94 repräsentiert das abundanteste Ca^{2+} -bindende Protein des ERs aus der Hsp-90-Familie (Marzec *et al.*, 2012; Lee, 2001). GRP94 besitzt 15 moderate Affinitätsdomänen ($K_D = \sim 2\mu\text{M}$) mit niedriger Kapazität (1 mol Ca^{2+} pro mol GRP94) und 11 niedrige Affinitätsdomänen ($K_D = \sim 600\mu\text{M}$) mit hoher Kapazität (10 mol Ca^{2+} pro mol GRP94) (Coe und Michalak, 2009; Argon und Simen, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PDI ebenfalls mit einer niedrigen Affinität ($K_D = 2\text{-}5\text{ M}$) und hohen Kapazität (19 mol Ca^{2+} pro mol PDI) in der Lage ist Ca^{2+} zu binden (Coe und Michalak, 2009; Lebeche *et al.*, 1994). ERp72, ein Protein aus der PDI-Familie, kann wie PDI mit niedriger Affinität und hoher Kapazität (12 mol Ca^{2+} pro mol ERp72) Ca^{2+} binden (Coe und Michalak, 2009; Lucero *et al.*, 1998). Bei einer geschätzten totalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ von $\sim 2\text{ mM}$ und einer freien Konzentration von $\sim 500\mu\text{M}$ ist demnach 60-80 % des gesamten ER-luminalen Ca^{2+} durch Proteine gebunden (Carreras-Sureda *et al.*, 2018; Coe und Michalak, 2009; Meldolesi und Pozzan, 1998).

2.6.3 Ca^{2+} -permeable Kanäle in der ER-Membran

Grundsätzlich wird zwischen dem liganden-gesteuerten Ca^{2+} -Efflux und dem Ca^{2+} -Ausstrom durch Ca^{2+} -permeable Kanäle aus dem ER unterschieden. Zu den aktiven Ca^{2+} -Kanälen in der ER-Membran zählen die IP_3 - (IP_3R) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Der IP_3R -induzierte Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER wird durch deren Agonisten IP_3 ausgelöst, welcher an den N-Terminus bindet und eine C-terminale Kanalöffnung zur Folge hat (Bosanac *et al.*, 2004). Hierbei steigt die Sensitivität gegenüber IP_3 mit der Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ (Missiaen *et al.*, 1992; Irvine, 1990). Jedoch wird der IP_3R des Weiteren biphasisch durch cytosolisches Ca^{2+} reguliert, da im Ruhezustand ($\sim 50\text{ nM}$ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) der Kanal eine niedrige Aktivität aufweist, bei submikromolaren Konzentration ($<1\mu\text{M}$) die maximale Aktivität erreicht und ab Konzentrationen von $>10\mu\text{M}$ inhibiert wird (Foskett *et al.*, 2007; Ionescu *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2004; Boehning *et al.*, 2001; Mak *et al.*, 2001, 1998). Die RyR hingegen

können pharmakologisch durch Caffein aktiviert werden (Kong *et al.*, 2008; Trafford *et al.*, 2000; McPherson *et al.*, 1991). Die RyR werden über viele physiologische Modulatoren reguliert, darunter Ca^{2+} und ATP. Der Kanal wird bei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von $\sim 1 \mu\text{M}$ aktiviert, wohingegen höhere Konzentrationen (1 mM) den Kanal inhibieren (Lanner *et al.*, 2010; Meissner *et al.*, 1997; Meissner, 1994; Meissner *et al.*, 1986). Die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ scheint ebenfalls die Aktivität der RyR zu beeinflussen, da Einzelkanalmessungen gezeigt haben, dass mit einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ der Ca^{2+} -Ausstrom in Anwesenheit von ATP oder Caffein erhöht wird (Lanner *et al.*, 2010; Laver *et al.*, 2004; Györke und Györke, 1998; Xu *et al.*, 1998; Sitsapesan und Williams, 1995; Smith *et al.*, 1986).

Aufgrund des hohen Ca^{2+} -Gradienten zwischen ER und Cytosol, kommt es zu einem Ca^{2+} -Leckstrom aus dem ER, der lediglich dem elektrochemischen Gradienten folgt, was durch Ca^{2+} -permeable Kanäle in der ER-Membran ermöglicht wird. Die Aufrechterhaltung dieses dynamischen Gleichgewichts wird durch die Aktivität der SERCA ermöglicht. Der Ca^{2+} -Efflux kann durch eine Inhibierung der SERCA mit TG demaskiert werden, was mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ einhergeht, wobei sich ein neues Gleichgewicht innerhalb von Minuten wieder einstellt (Lam und Galione, 2013; Camello *et al.*, 2002; Wissing *et al.*, 2002; Beecroft und Taylor, 1998; Hofer *et al.*, 1996; Hofer und Schulz, 1996). Jedoch ist die physiologische Relevanz dieses Ca^{2+} -Efflux noch ungeklärt. Dennoch wurden mehrere Kandidaten als Ca^{2+} -permeable Kanäle beschrieben. Eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (engl. B-cell lymphoma 2) hat eine Erniedrigung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ zur Folge, was einerseits durch einen erhöhten Ca^{2+} -Efflux und andererseits durch eine Runterregulierung von SERCA erklärt wurde (Bonneau *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2004; Vanden Abeele *et al.*, 2002; Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2000; Minn *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997). Das Protein Bax-Inhibitor 1 (BI-1) verhindert eine ER-Stress-induzierte Apoptose (Kiviluoto *et al.*, 2013; Chae *et al.*, 2004; Xu und Reed, 1998). Des Weiteren formt der C-Terminus von BI-1 einen Ca^{2+} -permeablen Kanal in der ER-Membran, dessen Aktivität pH-abhängig ist, und interagiert mit dem IP_3R , um diesen für geringere IP_3 -Konzentrationen zu sensitivieren (Bultynck *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014; Kiviluoto *et al.*, 2013; Bultynck *et al.*, 2012; Kiviluoto *et al.*, 2012; Sano *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurden die Preseniline 1 und 2 in Verbindung mit der familiären Alzheimer Erkrankung als Ca^{2+} -permeable Kanäle beschrieben, wobei die TMD 7 und TMD 9 für die Bildung einer hydrophilen Pore wichtig sind (Nelson *et al.*, 2011; Supnet und Bezprozvanny, 2011; Nelson *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a; Nelson *et al.*, 2007; Kasri *et al.*, 2006; Tu *et*

2. Einleitung

al., 2006). Eine Überexpression von Pannexin 1 oder 3 hat ein interzellulärer Ca^{2+} -Austausch über „gap-junctions“ zur Folge und aus dieser Überexpression resultiert additional eine Reduzierung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, woraus geschlossen wurde, dass Pannexine ebenfalls Ca^{2+} -permeable Kanäle bilden können (Ishikawa *et al.*, 2011; Vanden Abeele *et al.*, 2006). Eine Überexpression von TRPC1 (engl. transient receptor potential canonical type 1) in Skelettmuskelzellen bewirkt einen erhöhten Ca^{2+} -Efflux nach Zugabe des reversiblen SERCA-Inhibitors Cyclopiazonsäure (CPA, engl. cyclopiazonic acid) (Berbey *et al.*, 2009). In anderen Studien wurde gezeigt, dass C-terminal trunkeerte Isoformen von SERCA1 homodimere Ca^{2+} -permeable Kanäle bilden und somit die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ verringern und zusätzlich den Ca^{2+} -Transfer vom ER zu den Mitochondrien erhöhen, was schließlich in eine Ca^{2+} -abhängige Apoptose mündet (Chami *et al.*, 2008; Chami *et al.*, 2001). Kürzlich wurde der TMCO1 (engl. transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1) als potentieller Ca^{2+} -Efflux-Kanal beschrieben (Wang *et al.*, 2016). In dieser Studie wurde beobachtet, dass nach einer Ethanol-induzierten Überladung des ERs mit Ca^{2+} der TMCO1 oligomerisiert und als Ca^{2+} -Kanal die physiologische $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ wiederherstellt. Da aber auch im Ruhezustand Dimere und Trimere in der ER-Membran lokalisiert waren, wurde angenommen, dass TMCO1 auch als Ca^{2+} -permeabler Kanal fungieren könnte (Wang *et al.*, 2016).

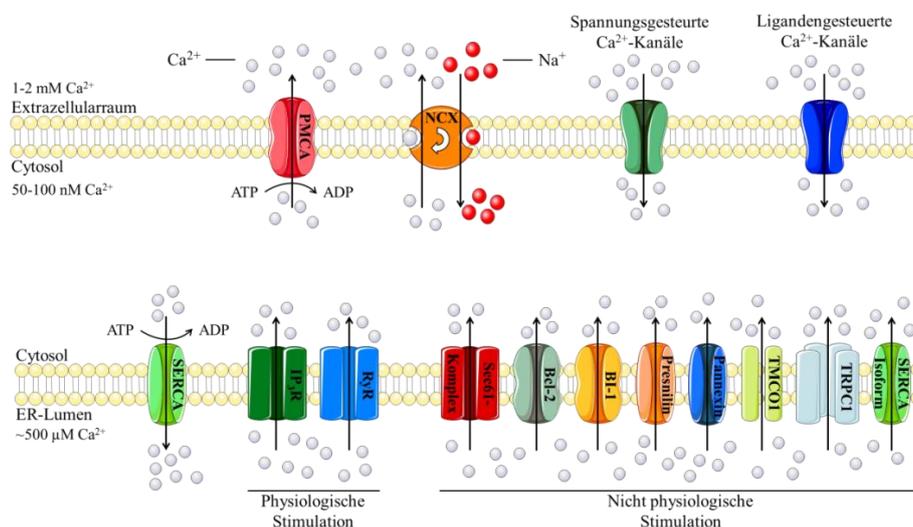


Abbildung 2.4. Schematische Darstellung der in die zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase involvierten Proteine in der Plasma- und ER-Membran. Die $[\text{Ca}^{2+}]$ beträgt im Extrazellulärraum 1-2 mM, im Cytosol 50-100 nM und im ER $\sim 500 \mu\text{M}$. In der Plasmamembran ist die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) für den Ca^{2+} -Transport aus dem Cytosol in den Extrazellulärraum verantwortlich („ Ca^{2+} -Clearance“). Daneben sind verschiedene spannungs- und ligandengesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran lokalisiert, die einen Ca^{2+} -Einstrom erlauben. Die in der ER-Membran befindliche sarkoplasmatische/endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) füllt gegen den Gradienten den Speicher mit Ca^{2+} auf. Der Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor (IP_3R) und der Ryanodin-Rezeptor (RyR) werden jeweils physiologisch durch IP_3 und Caffein aktiviert. Daneben existieren Ca^{2+} -permeable Kanäle, welche keine physiologische Stimulation benötigen, um einen Ca^{2+} -Efflux aus dem ER zu ermöglichen. Zu diesen Proteinen zählen der Sec61-Komplex, Bcl-2 (engl. B-cell lymphoma 2), Bax Inhibitor 1 (BI-1), Presenilin, Pannexin, TMCO1, TRPC1 (engl. transient receptor potential canonical type 1) und eine trunkeerte Isoform der SERCA (SERCA-Isoform).

Der in dieser Arbeit relevante Sec61-Komplex spielt ebenfalls eine Rolle in dem Ca^{2+} -Efflux über die ER-Membran. Während des Translokationsprozesses hält der „pore-ring“ die Barriere für kleine Moleküle aufrecht (Van den Berg *et al.*, 2004). Diese Barriere ist insofern wichtig, da die Sec61 α -Untereinheit zuerst von Simon und Blobel als ionenpermeabler Kanal beschrieben wurde und hierbei eine Einzelkanal-Leitfähigkeit von 220 pS detektiert werden konnte (Simon und Blobel, 1991). Diese Permeabilität für kleine Moleküle konnte später in weiteren elektrophysiologischen Experimenten bestätigt werden (Erdmann *et al.*, 2009; Saparov *et al.*, 2007). Vor allem aber war es die Arbeit von Roy und Wonderlin, die durch Ca^{2+} -Imaging-Versuche gezeigt haben, dass der Sec61-Kanal permeabel für Ca^{2+} ist und dieser Ausstrom direkt an die Translokation gekoppelt ist, da eine naszierende Polypeptidkette den Kanal verschließt, aber dieser nach vollständigem Eintreten des Polypeptides in das ER-Lumen permeabel für Ca^{2+} wird (Roy und Wonderlin, 2003). Dass der Sec61-Komplex, genauer die Sec61 α -Untereinheit, an dem Ca^{2+} -Efflux aus dem ER beteiligt ist, konnte durch weitere elektrophysiologische Experimente und Ca^{2+} -Imaging-Versuche bestätigt werden (Lang *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2009; Giunti *et al.*, 2007; Flourakis *et al.*, 2006; Van Coppenolle *et al.*, 2004; Lomax *et al.*, 2002). Hierbei spielt es keine Rolle, ob das Ribosom nach der Translokation noch mit dem Sec61-Komplex assoziiert ist oder nicht, da die Bindestelle des Ribosoms an der Sec61 α -Untereinheit 10-20 Å von der Membran entfernt ist (Van den Berg *et al.*, 2004), was zum Passieren von Ca^{2+} ausreicht. Allerdings muss dieser Ca^{2+} -Efflux streng kontrolliert werden, da Ca^{2+} als sogenannter „second messenger“ viele Signalwege innerhalb der Zelle aktivieren kann (siehe Kapitel 2.6). Durch biochemische Versuche und Ca^{2+} -Imaging-Experimente konnte gezeigt werden, dass der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Efflux sowohl durch cytosolische Proteine, als auch durch ER-lumenale Proteine limitiert wird, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird. Darüber hinaus ist Sec61 α ein wichtiger Regulator der UPR, da Sec61 α ein Komplex mit IRE1 α bildet, wodurch die UPR mit dem cotranslationalen Transport gekoppelt ist und eine Störung dieses Sec61 α -IRE1 α -Komplexes die Aktivität des Stresssensors beeinflusst (Sundaram *et al.*, 2017; Plumb *et al.*, 2015).

Die Sec61 α -Untereinheit enthält am N-Terminus ein IQ-Motif (Abb. 2.1), welches die Bindung von Ca^{2+} -CaM ermöglicht (Erdmann *et al.*, 2011). Diese Bindung ist abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration, wobei die Affinität von CaM für Ca^{2+} zwischen 10-100 μM liegt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Bindung von Ca^{2+} -CaM an die Ribosomen besetzte Sec61 α -Untereinheit während der Translokation möglich ist. Durch die Verwendung von den

2. Einleitung

CaM-Inhibitoren Ophiobolin A (Ophio A) und Trifluoperazine (TFP) konnte mittels Ca^{2+} -Imaging ein signifikanter Anstieg des Ca^{2+} -Efflux beobachtet werden. Durch einen Sec61 α -spezifischen siRNA-vermittelten Knockdown wurde gezeigt, dass dieser Anstieg des Ca^{2+} -Efflux auf die Sec61 α -Untereinheit zurückzuführen ist (Erdmann *et al.*, 2011). Das ER-membranständige Protein Sec62 spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Reduzierung von ER-Stress, indem es für die Direktion von ER-abstammigen Komponenten zum autolysosomalen System als Autophagie-Rezeptor fungiert (Fumagalli *et al.*, 2016), sondern reguliert den Ca^{2+} -Efflux durch eine direkte Interaktion des C-Terminus mit dem N-Terminus von Sec61 α (Linxweiler *et al.*, 2013; Greiner *et al.*, 2011a). Eine Überexpression von Wildtyp-Sec62 hat keinen Effekt auf den Ca^{2+} -Efflux, wobei eine Mutation in der C-terminal, also cytosolisch lokalisierten Ca^{2+} -Bindestelle einen erhöhten Ca^{2+} -Efflux zur Folge hat, welcher vergleichbar mit einem Verlust des Proteins oder dem Einsatz von CaM-Antagonisten ist (Linxweiler *et al.*, 2013). Die BiP-Co-Chaperone ERj3 und ERj6 sind in der Lage mit BiP zu interagieren und besitzen jeweils eine BiP-Affinität (aus Hamster) von 0,57 μM und 5 μM (Schorr *et al.*, 2015; Petrova *et al.*, 2008; Rutkowski *et al.*, 2007; Shen und Hendershot, 2005). Zusätzlich konnte in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten gezeigt werden, dass beide Co-Chaperone nach einer siRNA-vermittelten Depletion den Sec61 α -induzierten Ca^{2+} -Efflux erhöhen (Schorr *et al.*, 2015). Aufgrund der Interaktion der Co-Chaperone mit BiP war es möglich zu zeigen, dass eine siRNA-vermittelte Depletion von ERj3, ERj6 und BiP einen weiteren Anstieg des Sec61 α -induzierten Ca^{2+} -Efflux bewirkt. In einer vorrangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine alleinige siRNA-induzierte Depletion von BiP den Ca^{2+} -Efflux auf der Ebene von Sec61 α erhöht, eine Überexpression von BiP jedoch den Efflux nicht verringert (Schäuble *et al.*, 2012). Dieser Phänotyp des erhöhten Ca^{2+} -Efflux konnte durch die Behandlung mit den Faltung antagonistischen Tunicamycin (TUNI) und Dithiothreitol (DTT) imitiert werden. Hierbei war die Idee, dass durch eine pharmakologisch-induzierte Erhöhung der fehlgefalteten Proteine, BiP von Sec61 α dissoziiert, um die Faltungskapazität zu erhöhen und somit der Kanal mehr für Ca^{2+} durchlässig wird. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass BiP vermutlich an den Loop 7 der Sec61 α -Untereinheit bindet (Abb. 2.1), da die Y344H-Mutation (Austausch der aa Tyrosin (Y) zu Histidin (H) an der Stelle 344) in Sec61 α in diesen Zellen ebenfalls den Phänotyp der BiP-Depletion kopiert und die weitere Behandlung mit TUNI oder DTT keinen weiteren Effekt zeigte. Des Weiteren erhöht eine Überexpression einer Sec61-Mutante, bei der im „pore-ring“ die aa an der Stelle 85 von Valin (V) zu Asparaginsäure (D) ausgetauscht sind (V85D), dominant-negativ den Ca^{2+} -Efflux (Schubert *et al.*, 2018).

2.6.4 Speicher-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom (SOCE)

Der Mechanismus des Speicher-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms (SOCE, engl. store operated Ca^{2+} entry) wurde zuerst durch elektrophysiologische Messungen als Ca^{2+} -Ausstrom-aktivierter Ca^{2+} -Einstrom (CRAC, engl. Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} -current) beschrieben, welcher nach Reduzierung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ Ca^{2+} -permeable Kanäle in der Plasmamembran aktiviert und somit ein Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol erlaubt (Stathopoulos und Ikura, 2017; Hogan und Rao, 2015; Putney, 2011; Zhang und McCloskey, 1995; Partiseti *et al.*, 1994; Hoth und Penner, 1993; Zweifach und Lewis, 1993; Hoth und Penner, 1992; Lewis und Cahalan, 1989; Matthews *et al.*, 1989; Penner *et al.*, 1988; Putney, 1986; Parod und Putney, 1978; Putney, 1977). SOCE wird also einerseits für das Wiederauffüllen des Ca^{2+} -Speichers verwendet und zum anderen, um cytosolische Ca^{2+} -Signalwege zu verstärken (Hogan und Rao, 2015; Parekh und Putney, 2005; Lewis, 2001; Takemura und Putney, 1989). Die beiden Interaktionspartner bilden hierbei Proteine aus der STIM-(engl. stromal interaction molecule) und Orai-Familie. Im Menschen sind bisher STIM1-2 und Orai1-3 bekannt, wobei diese Proteinfamilien jeweils in der ER- und Plasmamembran lokalisiert sind (Abb. 2.5). STIM1 und 2 besitzen einen ER-luminalen N-Terminus, eine TMD und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne. Mit den N-terminalen EF-Händen ist STIM in der Lage Ca^{2+} zu binden und fungiert somit als Ca^{2+} -Sensor, wobei eine Dissoziation von Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung führt, woraufhin STIM oligomerisiert und eine Diffusions-getriebene Relokalisation von STIM in der ER-Membran zur Folge hat (Stathopoulos und Ikura, 2017; Hogan und Rao, 2015; Zheng *et al.*, 2011; Muik *et al.*, 2008; Stathopoulos *et al.*, 2008; Liou *et al.*, 2007; Ong *et al.*, 2007c; Mercer *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b). Diese Anreicherung von STIM-Molekülen in der ER-Membran bewirkt eine räumliche Nähe zur Plasmamembran. An dieser Grenzzone interagiert die C-terminale Domäne von STIM mit dem cytoplasmatisch lokalisierten N- und C-Terminus von Orai (Hogan und Rao, 2015; Gudlur *et al.*, 2014; Derler *et al.*, 2013; McNally *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013; Frischauf *et al.*, 2009; Muik *et al.*, 2008; Navarro-Borelly *et al.*, 2008). Diese Interaktion wurde weiterhin unterstützt, indem gezeigt werden konnte, dass nach einer Speicherentleerung Orai in der Plasmamembran zu den akkumulierten STIM-Proteinen diffundiert und dort reversibel durch diese Interaktion gehalten wird und somit einen Orai-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom erlaubt (Hogan und Rao, 2015; Wu *et al.*, 2014; Madl *et al.*, 2010; Luik *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006).

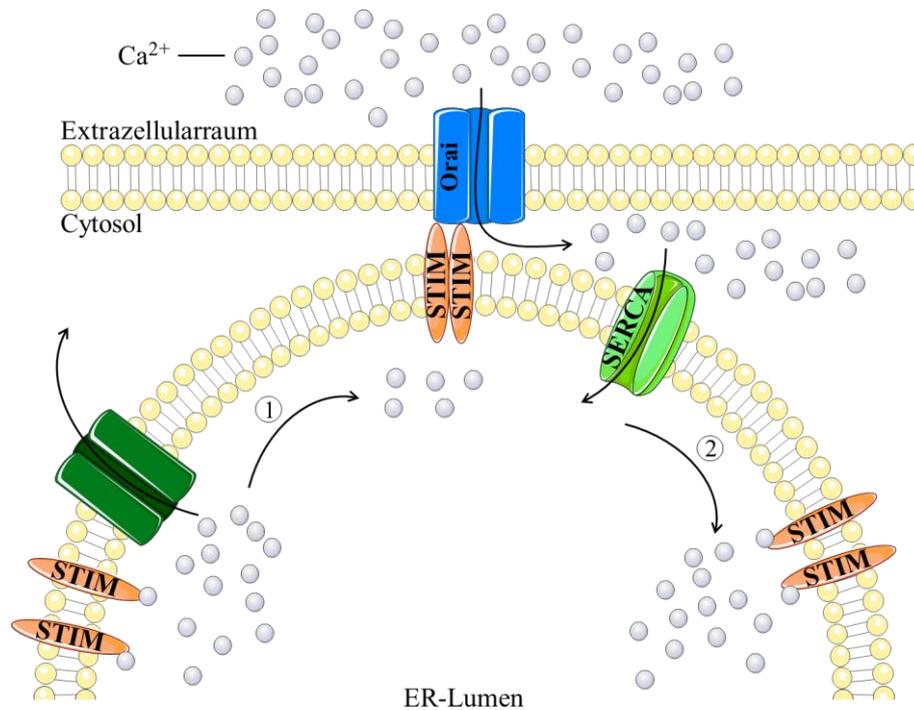


Abbildung 2.5. Schematische Darstellung des SOCE. Im Ruhezustand ist ER-luminales Ca^{2+} an die EF-Hände von STIM gebunden. 1) Nach einem Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ durch Agonist-stimulierte Ca^{2+} -Freisetzung (IP₃R, RyR) oder erhöhtem Ca^{2+} -Efflux (SERCA-Inhibition) sinkt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, sodass STIM oligomerisiert und mit der ER-Membran in die Nähe der Plasmamembran diffundiert. Dort werden die Plasmamembran-residenten Orai-Kanäle durch die Interaktion mit den STIM-Proteinen aktiviert. 2) Die Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ erlaubt das Wiederauffüllen des Speichers mit Hilfe der SERCA. Danach liegen die STIM-Proteine wieder als Monomer und gebundenem Ca^{2+} vor.

Die Relokalisation von STIM-Proteinen hängt jedoch stark von der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ab, wobei für STIM1 eine $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ von 100-300 μM und für STIM2 von 200-400 μM beschrieben wurde (Luik *et al.*, 2008; Brandman *et al.*, 2007). Somit ist STIM1 der Ca^{2+} -regulierte Aktivator für SOCE und STIM2 spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, was durch den geringeren STIM2-induzierten Ca^{2+} -Einstrom untermauert wird (Hogan und Rao, 2015; Wang *et al.*, 2014; Bird *et al.*, 2009; Brandman *et al.*, 2007). Es wurden von STIM2 zwei Splice-Varianten (STIM2.1 und STIM2.2) beschrieben, welche durch ein Vorhandensein oder Fehlen eines zusätzlichen Exons charakterisiert sind (Miederer *et al.*, 2015). In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass STIM2.1 den SOCE negativ beeinflusst, da die Interaktion mit Orai beeinflusst wird. Für eine Aktivierung von SOCE braucht es allein die Interaktion von Orai1 mit STIM1, wobei später gezeigt werden konnte, dass alle 3 Orai-Isoformen mit STIM1 interagieren können (Gudlur *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2009b; Schindl *et al.*, 2008; DeHaven *et al.*, 2007; Lis *et al.*, 2007; Mercer *et al.*, 2006). Die bisher einzige beschriebene Funktion von Orai2 liegt in der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose in Mastzellen und deren Degranulation (Tsvilovsky *et al.*, 2018; Ikeya *et al.*, 2014).

Ein Fehlen von STIM1 oder Orai1 in humanen und murinen T- und Mastzellen Zellen führt zu einem reduzierten SOCE, wobei eine Expression des Wildtyp-Proteins den physiologischen Mechanismus wiederherstellen konnte, was ebenfalls bei Mutationen in Orai1 gezeigt werden konnte (Baba *et al.*, 2008; Gwack *et al.*, 2008; Oh-Hora *et al.*, 2008; Vig *et al.*, 2008; Feske *et al.*, 2006). Die physiologische Rolle des SOCE in Immunzellen wird näher in Kapitel 2.6.6 beschrieben.

2.6.5 Rolle der Mitochondrien in der Ca²⁺-Homöostase

Ein weiteres wichtiges Organell neben dem ER stellt das tubuläre System der Mitochondrien dar, da diese für verschiedene zelluläre Prozesse wie ATP-Synthese, Apoptose und Ca²⁺-Signalwege essentiell sind (Kühlbrandt, 2015; Pellegrino und Haynes, 2015; Chandel, 2014; Lackner, 2014; Rizzuto *et al.*, 2012). Außerdem dient dieses Netzwerk neben dem ER als ein transients Ca²⁺-Speicher, da mit einer Zunahme der [Ca²⁺]_{cyt} die Mitochondrien als Puffer dienen (Hacker und Medler, 2008; Malli *et al.*, 2003; Duchon, 2000; Landolfi *et al.*, 1998). Die Abschirmung zum Cytosol erfolgt zum einen durch die äußere mitochondriale Membran (OMM, engl. outer mitochondrial membrane) und zum anderen durch die innere mitochondriale Membran (IMM), zwischen denen sich wiederum der intermembrane Raum befindet (Abb. 2.6). Im Gegensatz zur IMM wird die OMM oft als „porös“ beschrieben, da unselektiv Ionen und ungeladene Moleküle, sowie NADH, Malat und Succinat durch Porenformende Kanäle vom Cytosol in den intermembranen Raum gelangen können (Mazure, 2017; Kühlbrandt, 2015). Der wichtigste Kanal hierbei ist der VDAC (engl. voltage-dependent anion channel), welcher 10 % der totalen OMM-Proteine ausmacht (Mazure, 2017; Mannella und Bonner, 1975). Durch diesen Kanal wird eine Barriere für Moleküle mit einem Molekulargewicht weniger als 3-5 kDa aufrechterhalten (Mazure, 2017). Da ATP ständig zwischen Mitochondrien und Cytosol ausgetauscht werden muss, ist es auch nicht verwunderlich, dass der VDAC unter physiologischen Bedingungen in der Lage ist etwa 100.000 ATP-Moleküle pro Sekunde passieren zu lassen (Mazure, 2017; Rostovtseva und Colombini, 1997, 1996). Es konnte zudem gezeigt werden, dass VDAC permeabel für Ca²⁺ ist und dass eine Überexpression von VDAC zu einer vermehrten Ca²⁺-Aufnahme in den Mitochondrien führt, vor allem in den Kontaktstellen zwischen Mitochondrien und ER (MERCs, engl. mitochondria and ER contact sites) (Mazure, 2017; Rapizzi *et al.*, 2002). Auf die Rolle der MERCs, oder auch MAM (engl. mitochondria associated membrane) genannt, wird später im Detail erläutert.

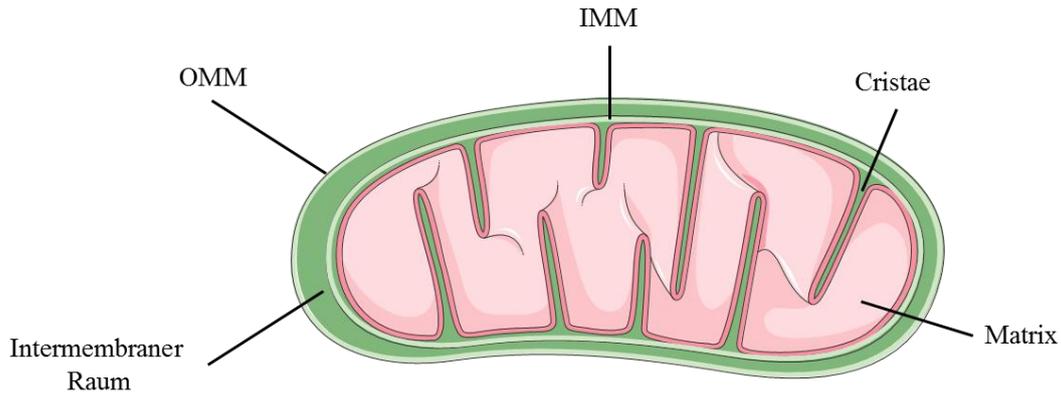


Abbildung 2.6. Schematische Membran-Kompartimentierung in Mitochondrien. Die Mitochondrien werden durch die äußere mitochondriale Membran (OMM, engl. outer mitochondrial membrane) vom Cytosol abgeschirmt. Der intermembrane Raum liegt zwischen der OMM und inneren mitochondrialen Membran (IMM). Die IMM bildet Invaginationen (Cristae) und grenzt die Matrix vom intermembranen Raum ab.

In der IMM ist der mPTP (engl. mitochondrial permeability transition pore) lokalisiert, welcher nach Öffnung Moleküle mit einer Masse von $<1,5$ kDa passieren lässt (Pérez und Quintanilla, 2017; Elrod und Molkentin, 2013). Die Aktivierung von mPTP verursacht ein Anschwellen der Mitochondrien, Reduzierung des mitochondrialen Membranpotentials, geringere ATP-Synthese, Cytochrom c-Ausschüttung und Apoptose (Aitken *et al.*, 2012; Halestrap und Pasdois, 2009; Lemasters *et al.*, 2009; Kroemer *et al.*, 2007; Brustovetsky *et al.*, 2002; Ichas und Mazat, 1998; Hunter und Haworth, 1979). Die IMM schirmt die Matrix von dem Intermembranraum ab. Hierbei bildet die IMM Invaginationen (Cristae), welche einen Durchmesser von ~ 25 nm haben und mehrere 100 nm lang werden können (Kühlbrandt, 2015; Gold *et al.*, 2014; Davies *et al.*, 2012). Die Cristae werden mit Hilfe des MICOS-Systems (engl. mitochondrial contact site and cristae organizing system) geformt, wobei MIC19 die Aktivität des Membran-formenden Proteins MIC60 reguliert (Schorr und van der Laan, 2018; Hessenberger *et al.*, 2017). In der Cristae-bildenden Membran sind die Komplexe I-IV lokalisiert, welche für die Aufrechterhaltung des Protonengradienten verantwortlich sind (Kühlbrandt, 2015; Lemarie und Grimm, 2011). Die Energie dieses Protonenflusses über die Membran wird von der F_1 - F_0 -ATP-Synthase benutzt, um ATP aus ADP und Phosphat herzustellen. Die F_0 -Einheit bildet hierbei den membranständigen Komplex, durch den die Protonen fließen und die F_1 -Einheit den löslichen, katalytischen Komplex. OSCP (engl. oligomycin sensitivity-conferring protein) verbindet diese beiden Komplexe, wodurch mehrere Konformationsänderungen möglich sind, welche zur ATP-Synthese benötigt werden (Pérez und Quintanilla, 2017; Kühlbrandt, 2015; Watt *et al.*, 2010; Pogoryelov *et al.*, 2009; von Ballmoos *et al.*, 2009). Es wurde postuliert, dass die ATP-Synthase eine

Hauptkomponente der mPTP bildet und dass Ca^{2+} Konformationsänderungen hervorruft, was zu einer Öffnung von mPTP und ein Arrest der ATP-Synthese zur Folge hat, wodurch Ca^{2+} , neben Protonen, ein essentieller Bestandteil zur Aufrechterhaltung der ATP-Bereitstellung zu sein scheint (Pérez und Quintanilla, 2017; Jonas *et al.*, 2015; Giorgio *et al.*, 2013). Für die Ca^{2+} -Aufnahme ist der hoch Ca^{2+} -selektive ($K_D \leq 2 \text{ nM}$) MCU (engl. mitochondrial calcium uniporter) verantwortlich, welcher ebenso wie der mPTP in der IMM lokalisiert ist (Tsai *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2016; Perocchi *et al.*, 2010; Kirichok *et al.*, 2004; Bernardi, 1999; Gunter und Gunter, 1994). Eine Überexpression von MCU führt zu einer vermehrten mitochondrialen Ca^{2+} -Aufnahme was mit einem verminderten transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ einhergeht (De Stefani *et al.*, 2011). Wenn es einen Ca^{2+} -Einstrom gibt, muss es auch einen Ca^{2+} -Ausstrom geben, was durch den mitochondrialen NCX (NCLX, Natrium/Lithium/Calcium-Austauscher) bewerkstelligt wird. Der NCLX ist ebenfalls in der IMM lokalisiert und transportiert vermutlich 3 Na^+ in die mitochondriale Matrix und ein Ca^{2+} in das Cytosol, da die Analyse einer Kristallstruktur von NCX diese Anzahl von Bindestellen gezeigt hat, welche zwischen dem NCX in der Plasmamembran und dem NCLX stark konserviert sind (Liao *et al.*, 2012; Palty *et al.*, 2010; Cai und Lytton, 2004; Palty *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 1995; Baysal *et al.*, 1994). Es in einer Studie eine maximale Ca^{2+} -Fluxrate von $18 \text{ nM} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei einer $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ von $13 \text{ }\mu\text{M}$ bestimmt werden (Boyman *et al.*, 2013; Crompton *et al.*, 1978; Crompton *et al.*, 1977). Wenn aber der Ca^{2+} -Einstrom hauptsächlich durch den MCU und der Ca^{2+} -Ausstrom durch den NCLX bewerkstelligt wird, muss dieser Ca^{2+} -Fluss stets im Gleichgewicht sein (Boyman *et al.*, 2013).

Wie schon oben erwähnt stellt das Mitochondrium ein tubuläres Netzwerk dar und ist somit unter anderem mit Vakuolen und Lysosomen, sowie mit dem ER verbunden (Murley und Nunnari, 2016; Elbaz-Alon *et al.*, 2014; Hönscher *et al.*, 2014; Murley *et al.*, 2013; Kornmann *et al.*, 2009). Eine große Aufmerksamkeit wurde den MAMs gewidmet, welche durch die enge räumliche Nähe von 10-30 nm der OMM und ER-Membran charakterisiert ist, was je nach Zelltyp 5-20 % der Mitochondrien-Oberfläche ausmacht (van Vliet *et al.*, 2014; Helle *et al.*, 2013; Rowland und Voeltz, 2012; Csordás *et al.*, 2006; Rizzuto *et al.*, 1998). Hierbei dient das Ribosom als Distanzhalter, wodurch der Abstand auf $>80 \text{ nm}$ begrenzt ist, welcher sich wiederum deutlich verringert ($>30 \text{ nm}$), wenn kein Ribosom mit der ER-Membran assoziiert ist (Gutiérrez und Simmen, 2018; Wang *et al.*, 2015a). Gleichzeitig schränken die cytosolischen Domänen von IP_3R und RyR ebenfalls den Abstand auf ein Minimum von 10-12 nm ein (Ludtke *et al.*, 2011; Wolfram *et al.*, 2010; Fleischer, 2008). Die erste funktionale

2. Einleitung

Rolle der MAM wurde für den Phospholipid-Austausch zwischen den Organellen beschrieben, jedoch ist mittlerweile bekannt, dass die MAMs ebenso in die Aktivität der UPR, Autophagie und den Ca^{2+} -Austausch zwischen ER und Mitochondrien involviert sind (Csordás *et al.*, 2018; Paillusson *et al.*, 2016; Vance, 1990). Für den Ca^{2+} -Austausch ist die Ca^{2+} -Freisetzung durch den IP_3R wichtig, welcher mit VDAC und GRP75 ein Komplex bildet, um einen besseren Ca^{2+} -Fluss zu gewährleisten (Gomez-Suaga *et al.*, 2017; Mazure, 2017; De Stefani *et al.*, 2012; Szabadkai *et al.*, 2006; Rapizzi *et al.*, 2002). Somit bilden sich in den MAMs Ca^{2+} -Mikrodomänen, welche ausreichen, um den nieder-affinen MCU zu aktivieren, wodurch sich der IP_3R und VDAC in unmittelbarer Nähe (<100 nm) zueinander befinden müssen (Martinvalet, 2018; De Stefani *et al.*, 2016; Neher, 1998). Da eine Überladung der Mitochondrien mit Ca^{2+} zur Apoptose führen kann, muss die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER reguliert werden, was durch eine physiologische Inhibierung der SERCA durch Calnexin (CNX) kompensiert werden könnte (Krols *et al.*, 2016; Paillusson *et al.*, 2016; Rowland und Voeltz, 2012; Csordás und Hajnóczky, 2001; Roderick *et al.*, 2000). Der ER-membranständige Sigma-1 Rezeptor (σ -1R) ist vermehrt in MAMs lokalisiert und stabilisiert dabei die IP_3R -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung (Hayashi, 2015; Hayashi *et al.*, 2011; Hayashi und Su, 2007). Zusätzlich interagiert der σ -1R mit dem in MAMs angereicherten Stresssensor IRE1 α und unterstützt somit das ER-zu-Nukleus-Signal von IRE1 α -induziertem XBP-1 (Mori *et al.*, 2013).

Die MAMs scheinen ebenso eine Rolle in der Immunantwort zu spielen, da das in Makrophagen enthaltene Protein NLRP3 (engl. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) wichtig für die Bildung von Inflammasomen ist und nach Aktivierung in MAMs akkumuliert, was wiederum abhängig von der Aktivität von PERK und IRE1 ist (Martinvalet, 2018; Lerner *et al.*, 2012; Osowski *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011). Zusätzlich bewirkt ein geringerer VDAC-Gehalt eine Reduzierung der Inflammation dieser Art (Zhou *et al.*, 2011). Ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der MAMs für Immunzellen liegt in der Migration von Leukozyten zur Infektionsstelle, was eine Reorganisation vom Cytoskelett und den Mitochondrien benötigt (Campello und Scorrano, 2010; Campello *et al.*, 2006). Diese Migration wird durch Fission der Mitochondrien begünstigt, was wiederum durch MAMs moduliert wird, wobei eine Fusion der Mitochondrien hinderlich ist und dadurch schließlich die MAMs die Migration und Funktion der Leukozyten beeinflussen (da Silva *et al.*, 2014; Campello und Scorrano, 2010; Liu und Hajnóczky, 2009; Campello *et al.*, 2006; Hollenbeck und Saxton, 2005). Gleichfalls wird angenommen, dass MAMs die Aktivierung von

Lymphozyten beeinflussen können, da diese Aktivierung genau taktierte Ca^{2+} -Signale benötigt und MAMs die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase modulieren können (Martinvalet, 2018; Chang *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2015). Außerdem wird spekuliert, dass die zur Autophagie essentiellen Autophagosomen vom ER abstammen und in den MAMs gebildet werden (Hamasaki *et al.*, 2013a; Hamasaki *et al.*, 2013b; Jia *et al.*, 2011; Pua *et al.*, 2007).

2.6.6 BCR-Aktivierung und Ca^{2+} -Homöostase in Immunzellen

Für die Eliminierung von Pathogenen stehen der Zelle zum einen die unspezifische (angeborene) und zum anderen die spezifische (adaptive) Immunantwort zur Verfügung. Die angeborene Immunantwort ist durch eine schnelle und unspezifische Reaktion auf Pathogene charakterisiert, wohingegen die adaptierte Immunantwort die klassischen Eigenschaften einer Immunantwort wie Spezifität, Wiedererkennen des Pathogens und Diversität innehat. Diese adaptierte Immunantwort ist stark von der regulierten Aktivität der B- und T-Zellen nach Antigen-Stimulierung abhängig. Das Antigen wird durch den B-Zell-Rezeptor (BCR, engl. B cell receptor) internalisiert, endosomal prozessiert und schließlich mit dem MHC II (engl. major histocompatibility complex II)-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert, um spezifische T-Helferzellen zu rekrutieren (Blum *et al.*, 2013; Harwood und Batista, 2008; Davidson *et al.*, 1990; Lanzavecchia, 1985; Rock *et al.*, 1984). Die T-Helferzellen (CD4^+ T-Zellen, engl. cluster of differentiation) binden den MHC II-Komplex mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR, engl. T cell receptor), wodurch diese Zellen das Oberflächenprotein CD40L (CD40 Ligand), sowie die Interleukine (IL)-4 und IL-21 bilden, die für die Differenzierung von B- in Plasmazellen wichtig sind (Crotty, 2015; Shlomchik und Weisel, 2012; Good *et al.*, 2006; Ettinger *et al.*, 2005; MacLennan *et al.*, 2003; Ozaki *et al.*, 2000; Parrish-Novak *et al.*, 2000; Armitage *et al.*, 1992; Paul und Ohara, 1987; Clark und Ledbetter, 1986; Howard *et al.*, 1982). Da in dieser Arbeit die RPMI 8226 und NALM-6 Zelllinien verwendet wurden, welche jeweils als Modelle für Plasmazellen und prä-B-Zellen benutzt werden (siehe Kapitel 3.1.6), liegt der Fokus dieses Kapitels auf der BCR-induzierten Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase.

Der BCR repräsentiert ein plasmamembranständiges Ig (mIg) mit 4 (für IgD) oder 5 (für IgM) Ig-Domänen in der schweren Kette, die durch einen Linker und 3 im Cytosol lokalisierten Aminosäuren (Lysin, Valin, Lysin: KVK) miteinander verbunden sind (Treanor, 2012). Das Antigen (= Ligand) wird durch das Paratop, gebildet aus einer variablen schweren und leichten Kette, gebunden. Da der BCR selbst keine Aktivierungsmotive besitzt, wird der BCR

2. Einleitung

über den Ig α /Ig β -Heterodimer mit den intrazellulären Signalwegen gekoppelt (Treanor, 2012; Schamel und Reth, 2000; Benschop und Cambier, 1999; Kurosaki, 1997; Reth und Wienands, 1997). Die Aktivierung dieser Signalwege mündet in einer Phosphorylierung von PLC γ 2, was für das Erreichen der maximalen Hydrolyse von Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PIP $_2$) zu IP $_3$ und Diacylglycerol (DAG) notwendig ist (Scharenberg *et al.*, 2007; Tsukada *et al.*, 1993). Wie schon in Kapitel 2.6.3 erläutert, führt ein intrazellulärer Anstieg von IP $_3$ zu einer IP $_3$ R-vermittelten Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER. Die Ca $^{2+}$ -Mobilisierung aus dem ER hat die Aktivierung von SOCE zur Folge (siehe Kapitel 2.6.4). Die Rolle des SOCE, welcher in Immunzellen der Hauptmechanismus des Ca $^{2+}$ -Influx darstellt, wurde erstmals in T- und Mastzellen beschrieben, was aber auch später in murinen B-Zellen bestätigt werden konnte (Lyubchenko, 2010; Lyubchenko *et al.*, 2009; Luik *et al.*, 2006; Peinelt *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006; Manji *et al.*, 2000; Oritani und Kincade, 1996). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus in unterschiedlichen Zelltypen konserviert ist. Da in dieser Arbeit die prä-B-Zelllinie NALM-6 verwendet wurde, wird im Folgenden auf die Rolle des SOCE in B-Zellen näher eingegangen.

Grundsätzlich liegt die Rolle des SOCE in Lymphozyten hauptsächlich in der Ca $^{2+}$ -abhängigen Aktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wie CREB (engl. cAMP response element binding), MEF-2 (engl. myeloid elf-1-like factor 2), ATF-2 (engl. activating transcription factor 2), aber auch NFAT (engl. nuclear factor of activated T cells) und NF- κ B (engl. nuclear factor- κ light-chain enhancer of activated B cells) (Feske, 2011; Matsumoto *et al.*, 2011; Maul-Pavicic *et al.*, 2011; Macian, 2005; Feske *et al.*, 2001; Kreideweiss *et al.*, 1999; Youn *et al.*, 1999; Anderson und Kane, 1998). Hierbei spielen die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B wahrscheinlich eine größere Rolle, da diese wichtig für die Cytokin-Synthese und anti-apoptotisch/pro-proliferative Effekte sind und jeweils bei [Ca $^{2+}$] $_{\text{cyt}}$ von 200 nM und >500 nM aktiviert werden (Hemon *et al.*, 2017; Scharenberg *et al.*, 2007; Dolmetsch *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1996). SOCE scheint für die BCR-induzierte Proliferation wichtig zu sein, da diese in Orai $^{-/-}$, STIM1 $^{-/-}$ oder STIM2 $^{-/-}$ -Zellen gestört ist (Feske *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2011; Gwack *et al.*, 2008). SOCE scheint allerdings keine Rolle in der B-Zell-Differenzierung zu spielen. Hinweise liefern dazu Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Orai $^{-/-}$ und STIM1 $^{-/-}$ -B-Zellen aus Menschen und Mäusen eine physiologische Anzahl von B-Zell-Subpopulationen aufweisen (Shaw und Feske, 2012; Matsumoto *et al.*, 2011; McCarl *et al.*, 2010; McCarl *et al.*, 2009; Picard *et al.*, 2009; Gwack *et al.*, 2008; Le Deist *et al.*, 1995). Die physiologische Menge an serösem IgM, IgG und IgA,

sowie die erfolgreiche Differenzierung in Ig-produzierende Plasmazellen in humanen Orail- und STIM1-defizienten B-Zellen, bestätigt weiterhin, dass SOCE nicht für die B-Zell-Maturierung und Antikörperproduktion benötigt wird (Shaw und Feske, 2012; Feske, 2011; McCarl *et al.*, 2009; Picard *et al.*, 2009; Feske *et al.*, 1996; Le Deist *et al.*, 1995; Schlesier *et al.*, 1993). Allerdings spielt SOCE für regulatorische B-Zellen eine entscheidende Rolle. Bestimmte B-Zellen mit dem Immunophänotyp CD1d^{hi}CD5⁺ synthetisieren IL-10, was wichtig zur Kontrolle der Autoimmunität ist (Baba *et al.*, 2014; Yanaba *et al.*, 2008; Fillatreau *et al.*, 2002). Murine STIM1/2^{-/-}-B-Zellen synthetisieren kein IL-10, was durch eine Inhibierung der nukleären Translokation von NFAT erklärt wurde, da die Produktion von IL-10 unter anderem von diesem Transkriptionsfaktor abhängig ist (Baba *et al.*, 2014; Matsumoto *et al.*, 2011; Saraiva und O'Garra, 2010). Die Wichtigkeit von SOCE für die regulatorische Funktion wurde in diesen STIM1/2^{-/-}-B-Zellen durch die verschlimmerte Entwicklung und Progression der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) in einem Maus-Modell für Multiple Sklerose (MS) untermauert (Baba *et al.*, 2014; Shaw und Feske, 2012; Matsumoto *et al.*, 2011).

Über die Rolle des SOCE in Plasmazellen ist bisher wenig bekannt. Darüber hinaus ist der Sec61-induzierten Ca²⁺-Efflux in B- oder Plasmazellen kaum untersucht, wobei behauptet wird, dass Lymphozyten aufgrund des geringen ER-Volumens zwar eine schnelle, aber vergleichsweise geringe Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER aufweisen (Shaw *et al.*, 2013; Shaw und Feske, 2012; Feske, 2011). Dies wurde in primären Lymphozyten, sowie in der Jurkat-Zelllinie bestätigt, da der Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} nach TG-Zugabe nur 15-100 nM betrug (Miederer *et al.*, 2015; Cox *et al.*, 2013; Kalra *et al.*, 2000), während in HEK-293 oder HeLa Zellen Werte von 200-400 nM zu erwarten sind (Linxweiler *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2011; Meves, 2008; Nemeth *et al.*, 2001). Die Funktion von BI-1 als Ca²⁺-Efflux-Kanal (siehe Kapitel 2.6.3) spielt in murinen B-Zellen eine wichtige Rolle, da in BI-1^{-/-}-Mäusen eine vermehrte Anzahl von B-Zellen aus der Milz, eine gesteigerte nukleäre Translokation von NF-κB und erhöhte [Ca²⁺]_{cyt} und [Ca²⁺]_{ER} beobachtet wurde (Lisak *et al.*, 2016). Außerdem ist die spontane Sterberate in diesen BI-1^{-/-}-Zellen erhöht, was mit einer vermehrten mitochondrialen Ca²⁺-Aufnahme korreliert. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass die B-Zell-abhängige Antikörper-Synthese beeinträchtigt ist, was generell die Wichtigkeit des Ca²⁺-Efflux über die ER-Membran unterstreicht.

Wenig ist auch über die Rolle in der B-Zell-Physiologie anderer Ca²⁺-Kanäle bekannt, welche direkt oder indirekt die [Ca²⁺]_{cyt} beeinflussen. Nichtsdestotrotz konnte TRPC1 in CD5-

transfizierten B-Zellen nachgewiesen werden, wobei TRPC1^{-/-}-Zellen eine Reduzierung der BCR-induzierten Ca²⁺-Oszillationen und eine erniedrigte NFAT-Aktivierung aufzeigen (Garaud *et al.*, 2018; Hemon *et al.*, 2017; Scharenberg *et al.*, 2007; Mori *et al.*, 2002b). Des Weiteren aktiviert das PLC γ 2-induzierte Spaltprodukt DAG verschiedene TRPC-Kanäle und darüber hinaus den AP-1-Komplex, welcher in Lymphozyten zusammen mit NFAT und NF- κ B die Gen-Expression moduliert, was auch durch SOCE stimuliert werden kann (Vig und Kinet, 2009; Baba *et al.*, 2008; Malek, 2008; Hardie, 2007; Venkatachalam *et al.*, 2001). Zusätzlich werden in B-Zellen TRPM4 (engl. transient receptor potential melastatin 4) und TRPM5 exprimiert, welche bei ansteigender [Ca²⁺]_{cyt} aktiviert und durch die Lipidzusammensetzung moduliert werden und dabei das Membranpotential ändern (Scharenberg *et al.*, 2007; Owsianik *et al.*, 2006; Prawitt *et al.*, 2003; Launay *et al.*, 2002). Deren Aktivierung limitiert die treibende Kraft für den Ca²⁺-Einstrom in T- und Mastzellen, was ein bisher nicht beachteter, aber wichtiger Mechanismus der Ca²⁺-Signale in B-Zellen darstellen könnte (Scharenberg *et al.*, 2007; Vennekens *et al.*, 2007; Launay *et al.*, 2004). Weitere Kandidaten für die Modulierung der [Ca²⁺]_{cyt} in Lymphozyten stellen die P2X-Rezeptoren dar. Diese Kanäle werden durch extrazelluläres ATP aktiviert und erlauben unter anderem einen Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺, wobei die Isoformen P2X1, P2X4 und P2X7 in humanen T-Zellen exprimiert werden (Feske *et al.*, 2012; Junger, 2011; Woehrle *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2009). Die Depletion dieser 3 Isoformen oder deren pharmakologische Inhibition hat eine Reduzierung des Ca²⁺-Einstroms, eine geringere NFAT-Aktivierung, sowie eine geringere IL-2-Produktion in Jurkat Zellen und humanen CD4⁺ T-Zellen zur Folge (Feske *et al.*, 2012; Woehrle *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2009). Dies verdeutlicht weiter die komplex miteinander verwobenen Signalwege, die unter der Kontrolle von Ca²⁺ stehen und essentiell für die B-Zell-Physiologie sind.

2.7 Defekte und Krankheiten in der Translokations-Maschinerie

Aufgrund der essentiellen Funktion des Translokationsapparates ist es nicht verwunderlich, dass aus einem Defekt oder einer Depletion einzelner Komponenten dieser Maschinerie viele unterschiedliche Krankheiten resultieren. Der Ausdruck „Sec61-channelopathy“ beschreibt hereditäre oder tumor-assoziierte Erkrankungen, die entweder direkt die Sec61-Untereinheiten oder deren akzessorischen Proteine betreffen (Haßdenteufel *et al.*, 2017; Lang *et al.*, 2017; Linxweiler *et al.*, 2017; Haßdenteufel *et al.*, 2014). Im Folgenden wird auf ausgewählte Proteine des Translokationskomplexes und deren assoziierten Erkrankungen eingegangen.

Das integrale ER-Membranprotein Sec62 ist nicht nur maßgeblich an der Regulierung des Sec61 α -induzierten Ca²⁺-Efflux beteiligt (siehe Kapitel 2.6.3), sondern ist ebenso in Tumoren aus der Prostata, Lunge und Schilddrüse hochreguliert, was mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht (Linxweiler *et al.*, 2013; Greiner *et al.*, 2011b; Greiner *et al.*, 2011a; Jung *et al.*, 2006). Der Gen-Locus für Sec62 liegt auf Chromosom 3q26, welcher in den oben genannten Tumoren und darüber hinaus in Kopf-Hals-Karzinomen und Cervixkarzinomen amplifiziert vorliegt (Bochen *et al.*, 2017; Linxweiler *et al.*, 2016; Linxweiler *et al.*, 2012). Sec62^{-/-}-Zellen weisen einen erhöhten Sec61 α -induzierten Ca²⁺-Efflux auf und gleichzeitig eine verminderte Migration, was durch Behandlung mit den CaM-Inhibitoren Ophio A und TFP imitiert werden kann (Bochen *et al.*, 2017; Linxweiler *et al.*, 2016; Linxweiler *et al.*, 2013; Linxweiler *et al.*, 2012; Greiner *et al.*, 2011b; Greiner *et al.*, 2011a). Da sowohl die Migration, als auch die Viabilität in Sec62^{-/-}-Zellen nach Behandlung mit TG oder TFP stärker reduziert war, wurde in Mäusen gezeigt, dass die alleinige Behandlung mit TG oder TFP oder deren Kombination zu einem verminderten Tumorwachstum und -Volumen führte, weshalb Sec62 unter anderem eine protektive Rolle während TG-induziertem Stress zugeschrieben worden ist (Körbel *et al.*, 2018; Linxweiler *et al.*, 2016; Linxweiler *et al.*, 2013; Linxweiler *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Verlust des Sec62-Proteins eine verminderte posttranslationale Translokation von Vorläufersubstraten zur Folge hat (Linxweiler *et al.*, 2017; Lang *et al.*, 2012). Eine Überexpression in verschiedenen Tumoren konnte ebenso für Sec63 gezeigt werden (Haßdenteufel *et al.*, 2014; Eschrich *et al.*, 2005; Schulmann *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2002a). Mäuse entwickeln mit einer Organ-spezifischen Sec63-Defizienz polyzystische Leber- und Nierenerkrankung, was mit einem Rückgang von Polycystin 1 und 2 einhergeht, was in primären humanen Zellen bestätigt werden konnte (Besse *et al.*, 2017; Wills *et al.*, 2017; Fedeles *et al.*, 2011; Waanders *et al.*, 2006; Davila *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte eine funktionale Interaktion zwischen Sec63 und UPR in Verbindung mit diesen Krankheiten gezeigt werden (Fedeles *et al.*, 2015). Eine sogenannte „loss-of-function“-Mutation in OST oder in TRAP-Untereinheiten führten zu angeborene Erkrankungen der Glykosylierung (CDG, engl. congenital disorders of glycosylation) und einer nicht-symptomatischen mentalen Retardation (Lang *et al.*, 2017; Pfeffer *et al.*, 2017; Losfeld *et al.*, 2014; Mohorko *et al.*, 2011; Garshasbi *et al.*, 2008; Molinari *et al.*, 2008). Da die TRAP δ -Untereinheit die Verbindung zwischen TRAP und OST herstellt, scheint diese Kooperation für die Glykosylierung von Polypeptiden wichtig zu sein, wobei die Destabilisierung des TRAP-Komplexes in TRAP γ ^{-/-}-

2. Einleitung

Fibroblasten die kongenitalen Funktionsstörung der Glykosylierung erklären könnte (Pfeffer *et al.*, 2017). Ein Fehlen des BiP-ER-Retentionssignals (KDEL) führt jedoch zu einer embryonalen Lethalität in Mäusen, aufgrund einer Respirationsstörung (Mimura *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2006). Des Weiteren besitzen diese Tiere eine geringere Körper- und Gehirngröße, was mit einer veränderten Nervenzellschicht im Cortex einhergeht (Mimura *et al.*, 2008). Heterozygote Tiere überleben und weisen einen stärkeren Gehalt von GRP94 und PDI auf und reagieren auf TUNI-induzierten ER-Stress mit einer Hochregulierung von CHOP, was in homozygoten Tieren ausblieb (Luo *et al.*, 2006). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass in Zellen, die viele Proteine sezernieren, BiP für die Regulation der UPR für eine normale ER-Funktion wichtig zu sein scheint (Mimura *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte durch biochemische Experimente und Ca^{2+} -Imaging-Versuche eine Interaktion zwischen $\text{IP}_3\text{R1}$ und BiP nachgewiesen werden, woraufhin postuliert wurde, dass BiP ein positiver Regulator für die $\text{IP}_3\text{R1}$ -Aktivität und Überleben der Zellen sei, da in $\text{IP}_3\text{R1}^{-/-}$ -Zellen eine verminderte Ca^{2+} -Freisetzung und vermehrte Apoptose zu beobachten war (Higo *et al.*, 2010). Wie in Kapitel 2.6.3 bereits beschrieben führt eine siRNA-vermittelte Depletion von BiP zu einem erhöhten $\text{Sec61}\alpha$ -induzierten Ca^{2+} -Efflux. Die Funktion von BiP kann durch die in *Escherichia coli* produzierte Subtilase AB aufgehoben werden, wobei diese Behandlung BiP spaltet und die Zellen nicht mehr lebensfähig sind (Haßdenteufel *et al.*, 2014; Paton *et al.*, 2006). Subtilase AB behandelte HeLa-Zellen zeigen eine verminderte, substratspezifische Translokation auf, was die Wichtigkeit von BiP während des Transports von Proteinen über die ER-Membran nochmals hervorhebt (Schäuble *et al.*, 2012). Eine „loss-of-function“-Mutation des NEFs Sill1 führt zu einer progressiven cerebralen Atrophie aufgrund eines Verlusts von Purkinje-Zellen, was in die neurodegenerative Erkrankung Marinesco-Sjörgen-Syndrom mündet (Haßdenteufel *et al.*, 2014; Roos *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2010; Anttonen *et al.*, 2005; Senderek *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Defekte von verschiedenen Co-Chaperonen von BiP wurden ebenfalls untersucht. Eine „loss-of-function“-Mutation von ERj4 in Mäusen führt zu einer 50 %-igen perinatalen Sterberate, was mit einem verminderten Glykogenspeicher und Hypoglykämie einherging (Fritz *et al.*, 2014). Außerdem zeigten die lebenden Mäuse in verschiedenen Geweben Zeichen von konstitutiv aktiviertem ER-Stress. Dieses Merkmal war vor allem in den hocheffizient Insulin-sezernierenden β -Zellen aus dem Pankreas deutlich, da hier ein vermehrter β -Zell-Verlust, Hypoinsulinämie und eine Glukoseintoleranz zu beobachten war (Fritz *et al.*, 2014). Des Weiteren führt eine solche Mutation zu einer verminderten Anzahl von B-Zellen, was allerdings durch einen intrinsischen Effekt und einer geringen Überlebensrate erklärt worden ist (Fritz und Weaver, 2014). Hierbei konnte gezeigt werden,

dass ERj4 ein negativer Regulator für die basalen Ig-Werte repräsentiert und für das Überleben von Vorläufer-B-Zellen und eine normale Antikörpersynthese wichtig ist. Die Wichtigkeit von ERj4 in der B-Zell-Entwicklung und Antikörperproduktion wurde in weiteren Studien durch die Kopplung von ERj4 an die UPR und ERAD unterstützt (Fritz und Weaver, 2014; Zhang *et al.*, 2005a; Shaffer *et al.*, 2004; Iwakoshi *et al.*, 2003; Reimold *et al.*, 2001). Vor einem ERj6-Nullhintergrund weisen Mäuse Glukosurie (vermehrte Ausscheidung von Glukose über den Urin), Hyperglykämie und eine gesteigerte Apoptose von β -Zellen auf (Ladiges *et al.*, 2005). Das Fehlen von ERj6 im Pankreas imitiert einen Verlust der β -Zell-Funktionalität, was in einer Insulin-Defizienz und damit in einem vergleichbaren humanen Diabetes-ähnlichen Phänotyp resultiert. Die beiden BiP-Co-Chaperone ERj3 und ERj6 limitieren nicht nur den Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux (siehe Kapitel 2.6.3), sondern sind auch für eine normale Migration der Zellen verantwortlich (Schorr *et al.*, 2015). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass ein genereller Verlust der β -Zell-Funktion eine Erniedrigung der [Ca²⁺]_{ER} zur Folge hat und durch den damit einhergehenden erhöhten Ca²⁺-Efflux Ca²⁺-abhängige apoptotische Signalwege aktiviert werden (Hara *et al.*, 2014).

Somit führt eine ERj6-Depletion in Mäusen zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Y344H-Mutation in Sec61 α (Lloyd *et al.*, 2010; Ladiges *et al.*, 2005). Mäuse mit dieser Mutation entwickeln eine Hyperglykämie, Hyperlipoproteinämie und Heptosteatose (Fettleber). Des Weiteren führt diese Mutation in Sec61 α zu Diabetes aufgrund eines β -Zell-Verlustes, welcher aus einer ER-Stress-induzierten Apoptose resultiert, weshalb angenommen wurde, dass Sec61 α eine wichtige Rolle in der β -Zell-Antwort auf ER-Stress und Glukose spielt (Lloyd *et al.*, 2010). Zusätzlich zeigt diese Mutation in HeLa-Zellen einen Defekt im Proteintransport, ähnlich zu dem Effekt in BiP^{-/-}-Zellen, was die Interaktion von BiP mit Sec61 α an der Stelle 344 (Loop 7) weiterhin unterstützte (Schäuble *et al.*, 2012). Im Menschen wurden 2 unterschiedliche Mutationen in Sec61 α in 2 unabhängigen Familien beschrieben, die an ADTKD (engl. autosomal-dominant tubulo-interstitial kidney disease) erkrankt waren (Bolar *et al.*, 2016). Hierbei verursacht sowohl der Austausch von Threonin (T) zu Alanin (A) an der Stelle 185 (T185A), als auch das Ersetzen von Valin (V) zu Glycin (G) an der Stelle 67 (V67G) einen Verlust der Nierenfunktion, wodurch eine Dialyse und Nierentransplantation nötig wird. Die T185A-Mutation befindet sich nahe des „pore-rings“ und V67G in der „plug“-Domäne der Sec61 α -Untereinheit. Diese pathogenen Mutationen sind in den betroffenen Nierenzellen im ER, aber auch teilweise im Golgi-Apparat lokalisiert und weisen Defekte in der Translokation von Renin in dem Juxtaglomerulären Apparat des Nephron auf, woraufhin eine Rolle von Sec61 α in der renalen Entwicklung postuliert wurde

2. Einleitung

(Bolar *et al.*, 2016). Die Erkrankung variables Immundefektsyndrom (CVID, engl. common variable immunodeficiency) ist die häufigste Form im Menschen mit einer primären Antikörper-Defizienz (Schubert *et al.*, 2018; Foerster *et al.*, 2010; Notarangelo *et al.*, 2009). B-Zellen von diesen Patienten wiesen einen verringerten BCR-induzierten Ca^{2+} -Einstrom aufgrund einer Hochregulierung des negativen Regulators CD22 auf, was mit einer Expansion von CD21^{low} -Zellen, Hypogammaglobulinämie, einer gestörten Autoimmunität und Lymphadenopathie einherging (Foerster *et al.*, 2010). Zusätzlich wurden 2 Mutationen in der Sec61 α -Untereinheit beschrieben, darunter die V85D-Mutation (siehe Kapitel 2.6.3) und die E381*-Mutation, welche jeweils Formen einer heterozygoten Punktmutation darstellen, nämlich „missense“- (V85D) und „nonsense“-Mutation (E381*) (Schubert *et al.*, 2018). Eine „nonsense“-Mutation führt zu einem vorläufigen Stopp der Translation und zu einem mRNA-Abbau, weshalb die E381*-Mutation eine Haploinsuffizienz zur Folge hat (Schubert *et al.*, 2018). Diese Patienten leiden unter Hypogammaglobulinämie, häufige Infektionen des respiratorischen Traktes, weisen aber jedoch eine normale Anzahl von B- und T-Zell-Subpopulationen auf. Da aber eine *in vitro*-Stimulation der B-Zellen zu einer verminderten Differenzierung führte, wurde angenommen, dass dieser Defekt einem intrinsischen Effekt zuzuschreiben ist, was sich in der reduzierten Population von $\text{CD27}^+\text{CD38}^{\text{high}}$ -Plasmazellen in Patienten mit der V85D-Mutation widerspiegelte (Schubert *et al.*, 2018). Diese erniedrigte Anzahl von Plasmazellen wurde durch eine UPR-induzierte Apoptose erklärt, da in verschiedenen Zelllinien die UPR aktiviert war, die als Modell für die Krankheit Multiples Myelom dienen. Wurde die V85D-Mutation jedoch in HeLa-Zellen zusätzlich zu dem endogenen Sec61 α -Protein überexprimiert, so war ein signifikant niedriger Ca^{2+} -Efflux aufgrund einem Verlust des zellulären Ca^{2+} -Gehaltes zu beobachten (Schubert *et al.*, 2018). Zusätzlich bewirkt diese Mutation einen verminderten cotranslationalen Transport, weshalb ein funktionaler Sec61-Komplex für die physiologische Antikörper-Synthese wichtig zu sein scheint (Schubert *et al.*, 2018). Heterozygote Mutationen in Sec61 β führen des Weiteren wie eine Sec63-Defizienz (siehe oben) zu polyzystischen Lebererkrankungen (Besse *et al.*, 2017; Lang *et al.*, 2017) und das Sec61 γ -Gen wird in adulten Gehirntumoren am meisten amplifiziert (Haßdenteufel *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2009). Interessanterweise führen viele der genannten Mutationen oder Depletionen zu Defekten in Zelltypen, die auf eine effiziente Sezernierung von Proteinen spezialisiert sind und somit abhängig von einer normalen ER-Funktion sind, worauf im nächsten Kapitel nochmals Bezug genommen wird.

2.8 Ziele der Arbeit

Der Sec61-Komplex stellt die zentrale, essentielle Komponente für die Translokation von naszierenden Polypeptiden über und die Integration in die ER-Membran dar (siehe Kapitel 2.2). Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass Sec61 α die porenbildende Untereinheit bildet und als ubiquitärer Ca²⁺-permeabler Kanal fungiert (siehe Kapitel 2.6.3). Es ist jedoch bisher keine direkte physiologische Rolle für diesen Ca²⁺-Efflux bekannt, obwohl mehrere Regulatoren wie Sec62, BiP, ERj3, ERj6 und Ca²⁺-CaM bekannt sind. Viele Folgen der beschriebenen Defekte und Mutationen innerhalb des Translokationsapparates wirken sich größtenteils auf Zellen aus, die auf eine hohe Proteinsynthese und -sezernierung spezialisiert sind, wie z.B. Zellen des Immunsystems (siehe Kapitel 2.6.6). Dies setzt eine anspruchsvolle Funktion und Dynamik des ERs voraus, um solche Funktionen ausüben zu können. Speziell während der Differenzierung einer B- in eine Plasmazelle erfährt das ER eine starke Umstrukturierung. Jedoch sind bisher nur wenige Daten im Hinblick auf die Ca²⁺-Homöostase in solchen Zellen bekannt. Aufgrund der vielseitigen, wichtigen Funktionen von Sec61 α sollte deshalb in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern Sec61 α die Ca²⁺-Homöostase bzw. Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER, sowie den Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum in B- und Plasmazellen beeinflusst. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde zum einen die Plasmazelllinie RPMI 8226 ausgewählt, welche als Modell für die Erkrankung Multiples Myelom dient und eine hohe Menge λ -leichte Kette von IgG sezerniert, wobei als Pendant die prä-B-Zelllinie NALM-6 ausgewählt wurde, welche eine geringe Proteinsyntheserate besitzt. Des Weiteren wurde überprüft, ob mit einer gesteigerten Proteinsyntheserate eine pharmakologische Modulierbarkeit des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Effluxes einhergeht. Die Charakterisierung der Ca²⁺-Homöostase und der damit verbundenen Rolle von Sec61 α wurde mit Hilfe des cytosolischen Ca²⁺-Indikators Fura-2 in Ca²⁺-Imaging-Experimenten (siehe Kapitel 3.2.6.1) bestimmt. Darüber hinaus sollte die Sensitivität der beiden Zellen auf pharmakologisch-induzierten ER-Stress und Ca²⁺-abhängigem Zelltod unter Verwendung der Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 3.2.3) analysiert werden, um somit Rückschlüsse auf eine potentielle Rolle des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux im Zelltod zuzulassen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Software:

<u>Hersteller/Vertrieb</u>	<u>Artikel</u>
Abimed GmbH (Langenfeld)	Einkanalpipette (10 µl/ 20 µl/ 200 µl/ 1000 µl)
AHF Analystechnik (Tübingen-Pfrondorf)	Filter Visitron (340/26 BrightLine HC, 387/11 BrightLine HC)
Bandelin (Berlin)	Sonorex Super AK103H (Ultraschallbad)
BD Biosciences (Heidelberg)	FACS Clean
Bio-Rad (Hercules, USA)	Trans-Blot® Cell
Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)	nitril-Einmalhandschuhe
Chroma Technology GmbH (Olching)	Filter Visitron (T400lp, T510/80m)
Corel (Ottawa, Kanada)	CorelDRAW X4 (Software)
Corning (Kaiserslautern)	Einweg Zell-Schaber, Zellkulturschale 35 mm x 10 mm
Duran (Mainz)	Laborglasflaschen (250 ml/ 500 ml/ 1000 ml)
eppendorf AG (Wesseling-Berzdorf / Hamburg)	minispin plus (Tischzentrifuge), Thermostat 5320 (Heizblock)
Fröbel Laborgeräte (Wasserburg)	Wipptisch ROCKY
GE Healthcare (Uppsala, Schweden)	TyphoonTrio™ Scanner
GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)	GraphPad Prism 5.01 (Software)
Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)	Serologische Pipette (1 ml/ 2 ml/ 5 ml/ 10 ml/ 25 ml), Röhre 15 ml/ 50 ml (Falkon)
Heidolph Instruments (Schwabach)	Magnetrührer
Heraeus Holding GmbH (Hanau)	Megafuge 1.0R (Zentrifuge)
Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)	Pipetus®-akku Pippetierhilfe
IDL (Nidderau)	Parafilm

Integra Biosciences GmbH (Biebertal)	Halton LaminAir (Sterilbank)
Invitrogen (Darmstadt)	Countess® Automated Cell Counter, Zählkammern
Leica Microsystems (Wetzlar)	EM PACT2+RTS (Hochdruckgefrierer), AFS2 (engl. automatic freeze substitution apparatus)
Life Technologies (Darmstadt)	Attofluor™ CellChamber (Calcium-Imaging-Messkammer)
Merck Millipore (Darmstadt)	Guava easyCyte 8HT + Software (guavaSoft 2.7), Milli-Q Wasseraufbereitungssystem
Memmert (Büchingen)	Trockenschrank
Microsoft Corporation (Redmond, USA)	Microsoft Excel 2010, Microsoft Word 2010, Microsoft PowerPoint 2010
Miele (Gütersloh)	Spülmaschine
Millipore Co. (Bedford, USA)	Immobilon®-P PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße)
Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA)	ImageQuant Version 5.1 (Software)
MS Laborgeräte Schroeder OHG (Dielheim)	Absaugsystem, Pipetboyacu, SANYO CO ₂ Incubator (Brutschrank)
National Institutes of Health (Bethesda, USA)	ImageJ 1.46r (Software)
neoLab Migge GmbH (Heidelberg)	Vortex-Mixer, Trommel-Rollmischer
ORSAtec GmbH (Bobingen)	Mikroskopische Deckgläser
Panasonic (Hamburg)	Mikrowellenherd
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)	Neubauer Zählkammer
PeqLab (Erlangen)	Lumi Imager Fusion SL Vilber Lourmat, Fusion (Software)
Pharmacia Biotech (Freiburg)	Ultraspec 3000 UV/VIS Spektralphotometer,

3. Material und Methoden

	Power Supply EPS 3500, 600, 200, 500/400
Roche (Mannheim)	Lumi Imager F1
Sarstedt (Nümbrecht)	Mikrotestplatte 96 Well F, Reagiergefäß 1,5 ml/ 2 ml, Serologische Pipette, TC-Flasche T175, TC-Flasche T75, Pipettenspitzen (200 µl/ 1000 µl), Röhre 15 ml (Falkon)
Sartorius (Göttingen)	Feinwaage CP224S
Schott – Duran (Wertheim)	Glaswaren: Pipetten, Bechergläser, Kolben
Scientific Industries (Bohemia, USA)	Vortex-Mixer
Sutter Instruments Company (Hofheim)	Xenon-Gasentladungslampe (Lambda DG-4)
Systat Software GmbH (Erkrath)	SigmaPlot 10 (Software)
Systec GmbH (Linden)	Systec VX-95 (Autoklav)
Thermo Fisher Scientific (Suzhou, China)	Mr. Frosty™ Gefrierbehälter, Nunc™ Kryoröhrchen für Biobanking und Zellkulturen
Visitrons Systems GmbH (Puchheim)	Hamamatsu dual digital CCD camera ORCA-D2, Spectra-5 (LED lichtquelle), X-light confocal unit, VisiView 2.1.1 (Software)
VWR (Darmstadt)	Mikroröhrchen mit Graduierung, Pasteurpipetten
Wenzel Gläsererei (München)	Glasplatten
Werkstatt Biochemie 1 (Göttingen)	SDS-Gelelektrophorese
Whatman GmbH (Dassel)	Whatman FP30/0,2 CA-S rotrand (0,2 µm)
WTW (Altstrimmig)	pH 526 (pH Meter)
Zeiss (Jena)	inverses Fluoreszenzmikroskop (Visitron), AxioVert 25 (Auflichtmikroskop), AxioVision Rel. 4.8 (Software)

3.1.2 Chemikalien und Substanzen:

<u>Hersteller/Vertrieb</u>	<u>Artikel</u>
Acros Organics (New Jersey, USA)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	ECL Western Blot Detection Reagent
Bio-Rad (Hercules, USA)	Bradford Reagenz
Biospec Products (Bartlesville, USA)	Glasbeads 0,5 mm
ENZO Life Sciences GmbH (Lörrach)	Ophiobolin A (Ophio A), z-VAD-FMK (pan-Caspase-Inhibitor)
EZ Biosystems (Washington DC, USA)	293 Cell Avalanche™ Transfection Reagent
GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)	BSA Standardlösung
Invitrogen (Darmstadt)	fetales Kälberserum (FCS)
Life Technologies (Darmstadt)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fura-2 AM, Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit, Dimethylsulfoxid (DMSO, steril), Ionomycin, Minimum Essentiell Medium (MEM), OptiMEM, RPMI Medium 1640, Thapsigargin
Merck Millipore (Darmstadt)	Bromphenolblau Carboxyatractyloside (C-ATR), D(+)-Glucose-Monohydrat, Guava Instrument Cleaning Fluid, Guava ViaCount Reagent for Flow Cytometry, LY 294002 (Autophagie-Inhibitor)
Promega (Mannheim)	FuGENE® HD Transfektionsreagenz
R&D Systems (Minneapolis, USA)	z-LEHD-FMK (Caspase-9 Inhibitor)
Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)	Dithiothreitol (DTT)
Roth (Karlsruhe)	Milchpulver (Blotting grade), Glycerin

3. Material und Methoden

Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)		z-DEVD-FMK (Caspase-3 Inhibitor), z-LEVD-FMK (Caspase-4 Inhibitor)
Selleckchem (München)		A-1155463 (A-11), A-1210477 (A-12), Bortezomib (BTZ), Navitoclax (Nav), Venetoclax (Ven)
Serva , Heidelberg		2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (AMPS), Acrylamid (40 %), Bis-Tris-Acrylamid, Ethanol absolut, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tetramethylethyldiamin (TEMED), Triton X-100
Sigma Aldrich (München)		2-Deoxy-D-Glucose (2-DG), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), Beta-Mercaptoethanol, Calciumchlorid (CaCl ₂), Cycloheximide (CHX), Dimethylsulfoxid (DMSO), Emetine (EME), Ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid (EGTA), Kaliumchlorid (KCl), Lactacystin (Lac), Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Oligomycin A (Oligo), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Rutheniumrot (RR), Trifluoperazine (TFP), Trypsin, Tunicamycin (TUNI), Salpetersäure (HNO ₃ , 70 %), Tween-20
Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)		Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Pluronic® F-127
UdS (Saarbrücken)	Ethanol,	Methanol
VWR (Darmstadt)	Glycin,	Natriumchlorid (NaCl)

3.1.3 Antikörper

Die nachfolgend aufgelisteten primären Antikörper wurden für die immunologische Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran verwendet, um deren Quantität zu bestimmen und miteinander vergleichen zu können (Tabelle 3.1). Die Herstellung der Antikörper gegen ER-residente Proteine erfolgte am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes im Labor von Prof. Dr. Martin Jung und Prof. Dr. Richard Zimmermann. Aus dem gleichen Institut entstammte der Antikörper gegen das mitochondriale Strukturprotein MIC19, welcher freundlicherweise von Prof. Dr. Martin van der Laan zur Verfügung gestellt wurde.

Tabelle 3.1. Liste der verwendeten primären Antikörper für die immunologische Detektion von Proteinen mittels Western-Blot (AK - Antikörper, ER - endoplasmatisches Retikulum, UdS - Universität des Saarlandes, * - affinitätsgereinigt).

Antikörper	interne Kennung	Erkennung	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
α-BiP	950/950*	Polyklonaler AK gegen N-Terminus von BiP	Kaninchen	UdS	1:250
α-GAPDH	GAPDH	Polyklonaler AK gegen cytosolisches Enzym GAPDH	Maus	Santa Cruz	1:500
α-GRP94	GRP94	Polyklonaler AK gegen ER-luminales GRP94	Kaninchen	UdS	1:500
α-L4	994	Polyklonaler AK gegen große ribosomale Untereinheit	Kaninchen	UdS	1:1000
α-MIC19	MIC19	Polyklonaler AK gegen mitochondriales Strukturprotein MIC19	Kaninchen	Universität Freiburg	1:500
α-p68	p68	Monoklonaler AK gegen C-Terminus des nukleären Proteins p68	Maus	UdS (AG Stahl)	1:50
α-PDI	PDI	Polyklonaler AK gegen ER-luminales PDI	Kaninchen	UdS	1:1000
α-S3	680	Polyklonaler AK gegen kleine ribosomale Untereinheit	Kaninchen	UdS	1:1000
α-Sec61α	Sec61 α	Polyklonaler AK gegen C-Terminus der α -Untereinheit des Sec61-Komplexes	Kaninchen	Universität Göttingen	1:250
α-Sec62	262b	Polyklonaler AK gegen ER-Membranprotein Sec62	Kaninchen	UdS	1:500
α-Sec63	Δ N380	Polyklonaler AK gegen ER-Membranprotein Sec63	Kaninchen	UdS	1:500
α-SERCA	SERCA	Monoklonaler AK gegen SERCA2a/b	Maus	Sigma Aldrich	1:1000

3. Material und Methoden

α-β-Actin	β -Actin	Monoklonaler AK gegen β -Aktin	Maus	Sigma	1:10000
---	----------------	--------------------------------------	------	-------	---------

Die sekundären Antikörper dienen zur Visualisierung der Proteinbanden auf der PVDF-Membran. Zum Großteil wurden die Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen und -Maus Antikörper verwendet. Des Weiteren wurden die Cy-Fluoreszenzfarbstoffe ECLTMPlex Ziege-anti-Maus-IgG-Cy3 und ECLTMPlex Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy5 in einer Verdünnung von jeweils 1:1000 eingesetzt (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2. Liste der verwendeten sekundären Antikörper zur Visualisierung der Proteinbanden auf einer PVDF-Membran.

Antikörper	Markierung	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
α-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	Sigma	1:1000
α-Maus	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	Sigma	1:20000
α-Kaninchen	ECL TM Plex IgG-Cy5	Ziege	Sigma	1:1000
α-Maus	ECL TM Plex IgG-Cy3	Ziege	Sigma	1:2500

3.1.4 Plasmide

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Transfektion humaner Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 3.3. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (ECFP – engl. enhanced cyan fluorescent protein, ERQC – engl. endoplasmic reticulum quality compartment, CMV - Zytomegalie-Virus, ER – endoplasmatisches Retikulum, GFP – „green fluorescent protein“, Kana – Kanamycin, (m)RFP – engl. (monomeric) red fluorescent protein, Neo – Neomycin, Uds – Universität des Saarlandes).

Plasmidname	interne Kennung	Charakteristik	Promoter	Resistenzgen	Herkunft
VLP25 Sec61β-GFP	Sec61 β -GFP	ER-Membran Marker	CMV	Kana	Uds (AG Zimmermann)
pECFP-ER	ER-CFP	Luminaler ER-Marker	CMV	Neo	Uds (AG Zimmermann)
H2a-GFP	H2a-GFP	Hauptsächlich in ERQC lokalisiert	CMV	Kana	Tel Aviv University (AG Lederkremer)
CMV-ER-GCaMP6-150	ER-GCaMP-150	Ca ²⁺ -Sensor im ER	CMV	Kana	Weill Cornell Medical College (AG Ryan)
H2a-GCaMP6-150	150-GCaMP-H2a	Ca ²⁺ -Sensor in ERQC	CMV	Kana	Uds (U. Wissenbach)

Das Plasmid VLP25 Sec61 β -GFP und pECFP-ER, im Folgenden jeweils nur noch als Sec61 β -GFP und ER-CFP bezeichnet, wurden freundlicherweise von der AG Prof. Dr. Richard Zimmermann (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung des Plasmids H2a-GCaMP6-150 erfolgte ausgehend von den Plasmiden H2a-GFP und CMV-ER-GCaMP6-150, welche jeweils freundlicherweise von Prof. Dr. Gerardo Lederkremer (Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel) und Prof. Dr. Timothy A. Ryan (Weill Cornell Medical College, New York, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Die Klonierung wurde netterweise von Dr. Ulrich Wissenbach und Karin Wolske durchgeführt (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes).

3.1.5 Raue Mikrosomen (RM)

Raue Mikrosomen (RM) werden meist aus sezernierendem Gewebe gewonnen und stellen in Form von Vesikeln Bestandteile des ERs dar, die jedoch über die gleichen Funktionen und biologische Zusammensetzungen verfügen wie das intakte ER. In dieser Arbeit wurden die RM als Positivkontrolle zur immunologischen Detektion von ER-residenten Proteinen mittels Western-Blot verwendet. Die RM-Konzentration wird in Äquivalent (eq) angegeben, wobei die Konzentration von 1 eq/ μ l einer RM-Suspension mit einer OD_{280nm} von 50 entspricht. Die Präparation der RM wurden nach einer bekannten Methode durchgeführt (Walter und Blobel, 1983; Watts *et al.*, 1983) und von Prof. Dr. Richard Zimmermann (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Vor Verwendung wurden die RM 1:10 mit 1-fach Lämmli-Probenpuffer verdünnt.

3.1.6 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien RPMI 8226 (ATCC, ACC-402) und NALM-6 (ATCC, ACC-128) für den Großteil der Versuche verwendet. Darüber hinaus wurde die HEK-293 Zelllinie eingesetzt. Alle Zelllinien wurden bei der Leibniz-Institut deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH erworben.

RPMI 8226:

Die entnommenen RPMI 8226 Zellen entstammen aus dem peripheren Blut von einem 1966 diagnostizierten an Multiplen Myelom erkrankten 61 Jahre alten Mann und stellen somit ein typisches Modell einer ausdifferenzierten und hoch Antikörper-sezernierende Plasmazelllinie dar. Diese Zelllinie synthetisiert ausschließlich die Lambda (λ)-leichte Kette der Immunglobuline (Ig) und sezerniert pro Tag ca. 15 μg pro $1 \cdot 10^6$ Zellen dieser IgG, was einer Menge pro Tag von $45 \cdot 10^7$ Molekülen/Zelle entspricht (Matsuoka *et al.*, 1967). Die Zellen wachsen in Kultur zu 50 % als Suspension und zu 50 % leicht adhärent und weisen eine Verdopplungszeit von 60-70 Stunden (h) auf. Zudem besitzen die RPMI 8226 Zellen einen hypotriploiden Chromosomensatz mit 7,5 %iger Polyploidie. Die Zellen wurden in dem Kulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS), bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 oder 175 cm² Kulturflaschen inkubiert. In Kapitel 3.2.2.1 erfolgt die detaillierte Ausführung der Kultivierung dieser Zelllinien.

NALM-6:

Die prä-B-Zelllinie NALM-6 wurde aus dem Blut von einem 19 Jahre alten Mann entnommen, der an rezidiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankt war. Im November 1976 wurden neben der NALM-6 Zelllinie noch weitere Zelllinien aus dem Blut dieses Mannes etabliert (Minowada *et al.*, 1978). Die Zellen weisen einen diploiden Chromosomensatz (46, XY) auf, wobei der lange Arm von Chromosom 5 depletiert ist und ein Marker-Y-Chromosom (mar Y) vorhanden ist, das sehr wahrscheinlich auf eine chromosomale Inversion zurückzuführen ist (Hurwitz *et al.*, 1979). Außerdem weisen 10 % der untersuchten Zellen eine Verlängerung auf dem Chromosom 12 auf. Mehr als 90 % der Zellen waren positiv für die cytoplasmatische Immunglobuline (cIg) der μ -schwere und λ -leichte Ketten, aber negativ für sezernierende Immunglobuline (sIg). Die Zellen wurden in dem Kulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS), bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 oder 175 cm² Kulturflaschen inkubiert. In Kapitel 3.2.2.1 erfolgt die detaillierte Ausführung der Kultivierung dieser Zelllinien.

HEK-293:

Des Weiteren wurde die humane, embryonale Nierenzelllinie „human embryonic kidney“ (HEK)-293 verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Fragmenten der DNA vom menschlichen Adenovirus 5 transformiert und wachsen in Kultur als Monolayer (Graham *et al.*, 1977). Die Zellen enthalten 4-5 Kopien des linken Endes des Virus (\cong 12 % des viralen

Genoms) und eine Kopie des rechten Endes (\cong 10 % des viralen Genoms), wobei kein aktiver Virus synthetisiert wird. Die Zellen besitzen eine Verdopplungsrate von 24-30 h und weisen einen diploiden Chromosomensatz mit 6 %iger Polyploidie auf. Die Zellen wurden in dem Kulturmedium „Minimum Essentiell Medium“ (MEM), versetzt mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen inkubiert.

HeLa:

Die epitheliale HeLa Zelllinie (ATCC, Nr.CCL-2™) stammt ursprünglich aus einer Biopsie des Gebärmutterhalses (*cervix uteri*) der 31-jährigen Afroamerikanerin Henrietta Lacks, die an einem Adenokarzinom erkrankt war. Diese Zelllinie ist die erste und somit die älteste Zelllinie, die längerfristig kultiviert werden konnte (Gey *et al.*, 1952). Erste Versuche mit HeLa Zellen, die über einen hypertriploiden/hypotetraploiden Chromosomensatz mit 15 %iger Polyploidie verfügen, dienten zur Herstellung von Viren und zur Isolierung und Identifikation von Polioviren (Scherer *et al.*, 1953). Das Problem der Kreuzmutation mit anderen Zelllinien (MacLeod *et al.*, 1999) wurde durch das Vorhandensein und der Detektion von genomischen Fragmenten des humanen Papilloma Virus 18 (HPV-18) gelöst (Landry *et al.*, 2013; Macville *et al.*, 1999). Die Zellen wurden in dem Kulturmedium „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) + GlutaMAX™-I, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen inkubiert.

INS-1:

Die Insulin sezernierende INS-1 Zelllinie entstammt einem Röntgenstrahl-induzierten transplantierbaren Insulinom aus der Ratte. Diese adhären Zellen benötigen für das Wachstum β -Mercaptoethanol, wobei die Wildtyp-Morphologie erhalten bleibt. Der Gehalt an Insulin, der durch Antikörper nachgewiesen werden kann, beträgt 8 μ g pro $1 \cdot 10^6$ Zellen, was 20 % des Wildtyp-Gehaltes entspricht (Skelin *et al.*, 2010; Asfari *et al.*, 1992). Die Zellen reagieren ebenso wie die Herkunftszellen auf Glukose mit einem Anstieg der Insulinsekretion und einem Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der INS-1 Zellen blieben über eine Periode von zwei Jahren (\cong 80 Passagen) unverändert, was diese Zelllinie als ein sehr geeignetes Modell für Insulin sezernierende β -Zellen auszeichnet (Asfari *et al.*, 1992). Die Zellen wurden in dem Zellkulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10 % FCS, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat und 10 mM HEPES bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen inkubiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Proteinbiochemie

3.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<u>Lämmli-Probenpuffer</u>	<u>Elektrophoresepuffer</u>
Tris/HCl, pH 6,8 60 mM	Tris/HCl 50 mM
Glycerin 10 % (v/v)	Glycin 384 mM
SDS 2 % (w/v)	SDS 0,1 % (w/v)
β -Mercaptoethanol 5 % (v/v)	
Bromphenolblau 0,01 % (w/v)	

Das von Ulrich K. Lämmli 1970 entwickelte Verfahren (Laemmli, 1970) der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet, um Proteine nach deren Molekulargewicht aufzutrennen. Die Proben werden zuerst bei 56 °C für 10 Minuten (min) denaturiert und dann in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, welcher unter anderem das starke Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol und das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. β -Mercaptoethanol trennt intra- und intermolekulare Disulfidbrücken auf, wodurch die Proteine weiter denaturiert werden. Mit der hydrophoben, langkettigen Alkylgruppe bindet SDS an die ebenfalls hydrophoben Aminosäurereste von Proteinen und Polypeptiden in einem Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein (Reynolds und Tanford, 1970), wobei mittlerweile gezeigt werden konnte, dass dieses Verhältnis je nach Protein stark variiert (Rath *et al.*, 2009; Chill *et al.*, 2006; Wallstén und Lundahl, 1990; Miyake *et al.*, 1978; Grefrath und Reynolds, 1974). Des Weiteren werden durch die Sulfatgruppen von SDS die Proteine negativ beladen, wodurch die Auftrennung der Proteingemische bei einer elektrostatischen Induktion (= Laufgeschwindigkeit) im Polyacrylamidgel durch die Masse des Proteinkomplexes erfolgt (Weber und Osborn, 1969). Die Mobilität ist aufgrund der porenartigen Struktur des Gels umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes, wodurch Proteinkomplexe mit geringerem Molekulargewicht schneller wandern als größere Proteinkomplexe (Andrews, 1986; Dwyer, 1993).

Die Polyacrylamidgele wurden zwischen durch zwei Platzhalter getrennte Glasplatten gegossen, deren Boden durch ein 2 %iges Agarosegel abgedichtet wurde. Das Trenngel, in

welchem sich die Proteinkomplexe entsprechend ihrem Molekulargewicht auftrennen, wurde in einer Acrylamidkonzentration von 12,5 % oder 15 % als erstes gegossen. Welche Acrylamidkonzentration verwendet wurde, hing von dem zu untersuchenden Protein und dessen Molekulargewicht ab. Nach Erstarren wurde obenauf das Sammelgel mit einer niedrigeren Acrylamidkonzentration (5 %) und entsprechenden Aussparungen für die Proben gegossen, welches dafür sorgt, dass sich die Proteinkomplexe vor dem Trenngel verdichten. Die Kombination dieser beiden Gele erhöht die Trennschärfe der Proteine. Die Zusammensetzung der beiden Gele ist Tabelle 3.4 zu entnehmen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Kathoden- und Anodenkammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde stets als Standard der „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“ verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 3 h bei 30-45 mA oder bei 5 mA über Nacht.

Tabelle 3.4. Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen.

Lösungen	Trenngel		Sammelgel
	12,5 %	15 %	5 %
Acrylamidkonzentration	12,5 %	15 %	5 %
40 % (w/v) Acrylamid (ml)	4,69	5,63	0,9
2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	1,25	1,5	0,24
H ₂ O _{bidest.} (ml)	2,86	1,67	5,01
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

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

Transferpuffer

Glycin 96 mM

Tris/HCl 12,4 mM

Um die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine zu detektieren, wurden diese auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Diese Methode wird als Western-Blot bezeichnet, bei der ein angelegter Strom, welcher senkrecht zum Polyacrylamidgel verläuft,

3. Material und Methoden

die Proteine vom Gel auf die in direktem Kontakt stehende Membran transferiert (Bass *et al.*, 2017; Mahmood und Yang, 2012). Die Proteine bleiben durch hydrophobe Assoziation und polare Wechselwirkungen auf der Membran haften. Der Transfer auf die Membran wurde als Wet-Blot mit dem Tank-Blot-System „Trans-Blot™ Cell“ (Bio-Rad) durchgeführt. Dabei befinden sich das Gel und die Membran während des ganzen Ablaufs in Transferpuffer. Zuerst wurde die PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm und einer hydrophoben Oberfläche in Methanol inkubiert, um diese für den Transferpuffer zugänglich zu machen. Danach wurden die Membran und das Polyacrylamidgel in dem Transferpuffer gewaschen und äquilibriert. In den Transferpuffer wurden vor dem Aufbau außerdem die nötigen Schwämme und Filterpapiere eingetaucht. Auf die untere Seite der Kassette wurden zuerst ein Schwamm, ein Filterpapier und das Polyacrylamidgel platziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich unter dem Polyacrylamidgel keine Luftblasen befanden, da diese den Transfer der Proteine stören. Direkt auf das Gel wurde die Membran ebenfalls luftblasenfrei gelegt, welche wiederum durch ein weiteres Filterpapier und Schwamm bedeckt wurde (Abb. 3.1). Die Blot-Kammer wurde mit Transferpuffer befüllt, in welche die geschlossene Kassette eingesetzt wurde. Das Gel zeigt hierbei zur Anode (negativer Pol) und die Membran zur Kathode (positiver Pol). Die Proteine wurden auf die Membran bei 400 mA für 3 h oder über Nacht bei gleicher Stromstärke bei 14 °C transferiert.

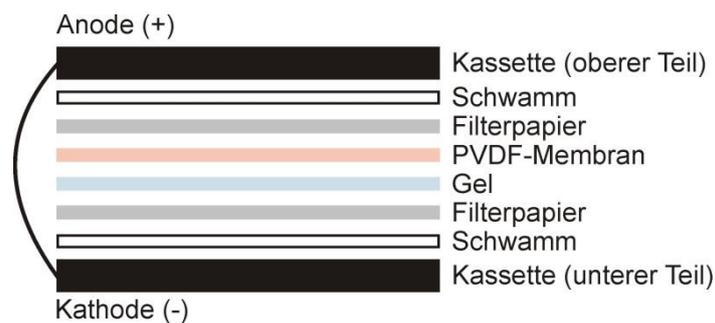


Abbildung 3.1. Schematische Seitenansicht des Aufbaus eines Wet-Blots. Auf die untere Seite der Kassette wird ein Schwamm und Filterpapier gelegt, welche zuvor in Transferpuffer getaucht wurden. Darauf werden das Gel und die PVDF-Membran luftblasenfrei aufgesetzt. Ein weiteres Filterpapier und Schwamm bedecken wiederum die Membran. Das Gel zeigt zur Kathode (negativer Pol) und die Membran zur Anode (positiver Pol).

3.2.1.3 Immunologische Detektion von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf PDVF-Membranen

TBS-Puffer

Tris/HCl, pH 7,4 10 mM
NaCl 150 mM

Blockierlösung

Magermilchpulver 5 % (w/v)
in TBS-Puffer

Antikörperlösung

Blockierlösung

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

+ Antikörper/-seren

Die Grundlage der immunologischen Detektion besteht aus der Benutzung von spezifischen Antikörpern und deren Eigenschaft die komplementäre Sequenz (Epitop) von Proteinen mittels der Antigenbindungsregion (Paratop) hoch affin zu binden. Die Herstellung von Antikörpern erfolgt durch die sogenannte Immunisierung, bei der das gewünschte Antigen in geeignete Tiere injiziert wird. Somit werden polyklonale Antiseren hergestellt, die spezifische Proteine erkennen können. Durch eine Affinitätsreinigung wird diese Spezifität zusätzlich erhöht. Der sekundäre Antikörper bindet mit dessen Paratop den komplementären Fc-Teil des primären Antikörpers, wodurch einzelne Proteine aus ganzen Proteingemischen auf einer PDVF-Membran detektiert werden können. Zur Visualisierung dieser Bindung ist kovalent ein Fluoreszenzfarbstoff an den sekundären Antikörper gebunden. Alternativ ist das Reporterenzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) anstelle des Fluoreszenzfarbstoffs an den sekundären Antikörper gekoppelt, wodurch eine Detektion der katalysierten Chemilumineszenzreaktion ermöglicht wird (Haan und Behrmann, 2007).

Nach dem Transfer der Proteine auf die PDVF-Membran wurde diese in einer Blockierlösung für 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper unzugänglich zu machen. Der primäre Antikörper wurde zuvor in der Antikörperlösung entsprechend verdünnt und die Membran wurde mit dem jeweiligen primären Antikörper für 90 min bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Mit der Blockierlösung wurde die Membran danach 3 Mal für 5 min gewaschen. Der entsprechende sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in der Antikörperlösung verdünnt und für 90 min bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Membran wieder 3 Mal für 5 min mit der Blockierlösung gewaschen. Bei jeder Inkubation und jedem Waschen wurde die PDVF-Membran auf einem Rollinkubator platziert, um eine gleichmäßige Verteilung des

Antikörpers zu gewährleisten. Bei Verwendung eines Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers wurde die Membran getrocknet und die Proteine durch Einscannen im TyphoonTrio™ Scanners detektiert. Bei der Verwendung von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern wurden nach dem Waschen die zwei Lösungen des ECL-Detektionkits (engl. luminol/enhancer und stable peroxide buffer) im Verhältnis 1:2 direkt auf die Membran gegeben und in eine durchsichtige Folie gelegt. Die Detektion der durch enzymatische Umsetzung freigesetzten Photonen erfolgte mittels des LumiImager F1 und Fusion SL Imager.

3.2.1.4 Densitometrie – quantitative Bestimmung der Bandenintensität

Mit der Densitometrie wird die Farbmenge pro Flächeneinheit (Farbdichte) analysiert. Die Bandenintensität auf einer PVDF-Membran der mittels Fluorophor- oder Chemilumineszenz-gekoppelten sekundären Antikörper visualisierten gesuchten Proteinbanden, wurde mit ImageQuant Software TL 1D (Version 5.1) oder Fusion ermittelt und mit Excel 2010 ausgewertet.

3.2.1.5 Herstellung von RPMI 8226 und NALM-6 Zelllysaten und deren Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test

<u>Lysepuffer</u>		<u>PLAC</u>	
NaCl	100 mM	Pepstatin A	3 mg/ml
Tris, pH 8,0	100 mM	Leupeptin	3 mg/ml
MgCl ₂	30 mM	Antipain	3 mg/ml
Nonidet-P40	5 %	Chymostatin	3 mg/ml
PLAC	1:10000	in DMSO	

in H₂O_{bidest.}

Um die Signalstärken der gesuchten Proteine nach immunologischer Detektion miteinander vergleichen zu können, wurden die gleichen Proteinmengen aus RPMI 8226 und NALM-6 Zelllysaten auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinkonzentration wurde hierbei mit einem Bradford-Test bestimmt. Diese Methode beruht auf der Reaktion des anionischen Coomassie Brilliant Blue G-250 (CCB) mit den basischen Aminosäureresten von Proteinen (Bradford, 1976). Diese Bindung führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von

465 nm zu 595 nm, wobei eine steigende Intensität bei 595 nm einer höheren Proteinkonzentration entspricht. Als Standard wurde eine bovine Serumalbumin (BSA)-Reihe verwendet, deren Ausgangskonzentration 2 mg/ml betrug. Zunächst wurden von diesem Standard 30 μl in 570 μl PBS aufgenommen, um eine Konzentration von 0,1 $\mu\text{g BSA}/\mu\text{l}$ zu erreichen. Davon ausgehend wurden die Konzentrationen von BSA zu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in einem Endvolumen von 800 μl PBS eingestellt (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5. Pipettierschema zur Herstellung unterschiedlicher BSA-Konzentrationen.

	0,1 $\mu\text{g BSA}/\mu\text{l}$	PBS	Bradford
1 $\mu\text{g BSA}/\text{ml}$	10 μl	790 μl	200 μl
5 $\mu\text{g BSA}/\text{ml}$	50 μl	750 μl	200 μl
10 $\mu\text{g BSA}/\text{ml}$	100 μl	700 μl	200 μl
15 $\mu\text{g BSA}/\text{ml}$	150 μl	650 μl	200 μl
20 $\mu\text{g BSA}/\text{ml}$	200 μl	600 μl	200 μl

In eine Halb-Mikro-Küvette aus Polystyrol wurden 200 μl der Bradfordlösung (Bio-Rad) und die 800 μl der jeweiligen BSA-Konzentration gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Küvetten in den UV/VIS-Spektrophotometer eingesetzt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Messung des BSA-Standards wurde vor jeder Proteinkonzentrationsbestimmung der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen durchgeführt.

Die Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen erfolgte vor der Herstellung der Zelllysaten. Hierfür wurden $10 \cdot 10^6$ Zellen der RPMI 8226 und $30 \cdot 10^6$ Zellen der NALM-6 Zelllinie verwendet. Die höhere Zellzahl der NALM-6 Zelllinie resultiert aus der bis zu 6-fach geringeren Gesamtproteinkonzentration. Die RPMI 8226 Zellen wurden in 320 μl Lysepuffer und die NALM-6 Zellen in 480 μl Lysepuffer aufgenommen, was einer Konzentration von $31,3 \cdot 10^6$ bzw. $62,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml entspricht. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Zellen für 10 min bei 56 °C gekocht und danach für weitere 10 min mit Glasperlen auf dem Vortex-Mixer geschüttelt. Danach wurden 32 μl von dem RPMI 8226 und 16 μl vom NALM-6 Zelllysate mit jeweils 968 μl und 984 μl PBS verdünnt, um somit eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml zu erhalten. Davon ausgehend wurden für den Bradford-Test 0,25, 0,5 und $1 \cdot 10^6$ der RPMI 8226 Zellen und 0,5, 1 und $2 \cdot 10^6$ NALM-6 Zellen in jeweils 800 μl PBS verwendet (Tabelle 3.6).

3. Material und Methoden

Tabelle 3.6. Pipettierschema von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels Bradford-Test.

	RPMI 8226		NALM-6	
	1·10 ⁶ Zellen/ml	PBS	1·10 ⁶ Zellen/ml	PBS
0,25·10⁶ Zellen	25 µl	775 µl	-	-
0,5·10⁶ Zellen	50 µl	750 µl	50 µl	750 µl
1·10⁶ Zellen	100 µl	700 µl	100 µl	700 µl
2·10⁶ Zellen	-	-	200 µl	600 µl

Danach wurden 200 µl der Bradfordlösung und 800 µl der jeweiligen Zellkonzentration in jeweils eine Küvette pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde im UV/VIS-Spektrophotometer bei 595 nm gemessen. Zu den restlichen Zelllysaten wurden 72 µl (RPMI 8226) bzw. 116 µl (NALM-6) 5-fach konzentrierter Lämmli-Probenpuffer hinzugegeben, was einer Endkonzentration von 25000 Zellen/µl für RPMI 8226 und 50000 Zellen/µl für NALM-6 entspricht. Diese Lysate wurden nochmals für 10 min bei 56 °C gekocht und für 10 min mit dem Vortex-Mixer geschüttelt und danach bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Um nun die Gesamtproteinkonzentration zu bestimmen, wurden die gemessenen Werte des BSA-Standards mit einer linearen Gerade der Gleichung $y = mx + b$ interpoliert. Für die SDS-PAGE und die nach dem Transfer auf eine PDVF-Membran folgende immunologische Detektion der Proteinbanden wurden stets die Proteinkonzentrationen von jeweils 20 µg, 40 µg und 80 µg der RPMI 8226 und NALM-6 Zelllysaten verwendet.

3.2.2 Methoden der Zellkultivierung

Unter Zellkultur wird die Kultivierung von isolierten tierischen und pflanzlichen Zellen im entsprechenden Kulturmedium verstanden, wobei prinzipiell zwischen Primärkultur und immortalisierten Zelllinien unterschieden wird. Erstere bedeutet, dass Zellen direkt aus dem Gewebe entnommen und in Kultur gebracht werden, weshalb diese Zellen nur über eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen verfügen. Im Gegensatz dazu sind die immortalisierten Zelllinien zu einer unbegrenzten Anzahl an Zellteilungen fähig und können somit über einen langen Zeitraum in Kultur gehalten werden, was aus verschiedenen wachstumsfördernden Manipulationen resultiert. Dieser Vorteil der Langlebigkeit kann jedoch auch Nachteile mit

sich ziehen, was sich unter anderem in einer veränderten Morphologie, veränderter Chromosomenanzahl oder Wachstumsverhalten äußern kann (Cieciura *et al.*, 1956; Puck *et al.*, 1956; Earle *et al.*, 1954).

3.2.2.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Sämtliche Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit den Zelllinien RPMI 8226 und NALM-6 durchgeführt. Die Zellen wurden in dem Kulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 oder 175 cm² Kulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurde alle 2-3 Tage in frischem Medium ausgedünnt (passagiert), um somit ein Überwachsen und dem damit einhergehenden Nährstoffmangel und einer pH-Wertänderung vorzubeugen. Hierfür wurden die RPMI 8226 Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst, was bei den NALM-6 nicht notwendig war und in ein Falcon überführt. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation bei 1000 Rotationen pro Minute (rpm) für 5 min abgesaugt und das ursprüngliche Volumen mit frischem Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden mittels der Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in die neue Kulturflasche oder in Kulturschalen für die jeweiligen Versuche überführt. Die Zugabe der Substanzen für die pharmakologische Beeinflussung zellulärer Abläufe erfolgte direkt nach Ausplattierung in die Kulturschale.

Die Insulin sezernierenden INS-1 Zellen aus der Ratte wurden in dem Kulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10 % FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyrovat und 10 mM HEPES und die HEK-293 Zellen in MEM, supplementiert mit 10 % FCS, bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen inkubiert. Die Zellen wurden je nach Bedarf alle 2-5 Tage passagiert, wobei über einen längeren Zeitraum das Medium nach zwei Tagen durch frisches Medium ersetzt wurde. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden jeweils mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die adhären Zellen durch eine dreiminütige Inkubation mit 3 ml Trypsin, welches Adhäsionsproteine spaltet, bei Raumtemperatur und durch mehrmaliges vorsichtiges Klopfen an die Kulturflasche von dem Boden der Kulturflasche gelöst. Danach wurden 7 ml des jeweiligen Kulturmediums hinzugegeben, welches durch dessen Zusätze die Wirkung von Trypsin inhibiert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und entsprechend in einer neuen Kulturflasche mit einem Endvolumen von 12 ml Kulturmedium verdünnt. Da für Experimente definierte Ausgangsbedingungen herrschen sollen, wurde für die Viabilitätsversuche stets eine

3. Material und Methoden

Konzentration von $0,25 \cdot 10^6$ Zellen für HEK-293 und $0,5 \cdot 10^6$ Zellen für INS-1 pro Kulturschale verwendet. Die Kultivierung der HEK-293 Zellen wurde freundlicherweise von Heidi Löhr (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die adhärenz wachsende epitheliale HeLa Zelllinie wurde in dem Kulturmedium DMEM + GlutaMAXTM-I, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37 °C und 5 % CO₂ in 75 cm² Kulturflaschen inkubiert. Die Kultivierung erfolgte analog zu der der HEK-293 und INS-1 Zellen, mit dem Unterschied, dass die Inkubation mit Trypsin für 5-10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ betrug und die Zellzählung mit dem „Countess® Automated Cell Counter“ durchgeführt wurde. Die Kultivierung der HeLa Zellen wurde freundlicherweise von Marie-Christine Klein (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Im Falle der zellulären Manipulation, wurden 4 h nach Ausplattierung die entsprechenden pharmakologischen Stoffe hinzugegeben, sodass sich die Zellen absetzen können und adhärenz sind.

Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Hierfür wurden die Zellen in Suspension gebracht und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in dem entsprechenden Zellkulturmedium, versetzt mit 10 % DMSO, aufgenommen und je nach Zellzahl auf verschiedene Kryoröhrchen aufgeteilt. Diese Röhrchen wurden in die Halterung in einem Gefrierbehälter gesetzt, der in den Aussparungen zwischen Wand und Halterung mit Isopropanol befüllt ist und für 24 h bei -80 °C gelagert. Da Wasser bei einer raschen Abkühlung Eiskristalle bildet und somit die Zellen beschädigen kann, sorgt Isopropanol dafür, dass sich die Temperatur in dem Gefrierbehälter um 1 °C pro Minute verringert. Durch DMSO wird das Cytosol vitrifiziert, wodurch zusätzlich die Eiskristallbildung und somit Schäden der zellulären Strukturen weiter eingedämmt wird. Nach 24 h wurden die Zellen letztendlich in flüssigen Stickstoff überführt, wodurch sich mit dieser Methode Zellen aufbewahren lassen ohne die Viabilität oder Funktion zu beeinträchtigen. Zum Auftauen wurden die Zellen rasch bei 37 °C aufgetaut, anschließend 5 ml Zellkulturmedium hinzugegeben und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in dem entsprechenden zuvor äquilibrierten Kulturmedium, supplementiert mit 1 % P/S, aufgenommen und in 75 cm² Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Diese Vorgehensweise der Kryokonservierung war für die RPMI 8226, NALM-6, HEK-293, HeLa und INS-1 Zellen gleich.

3.2.2.2 Zellzählmethode – Neubauer Zählkammer

Jeder Versuch in dieser Arbeit startete mit dem Ausplattieren der Zellen in eine Kulturschale, weswegen eine präzise Zellanzahl für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit notwendig war. Hierfür wurde die Neubauer Zählkammer verwendet, welche aus vier 1 mm^2 großen Quadraten besteht, die wiederum jeweils aus 16 kleineren Quadraten bestehen. Ein auszählendes Feld betrug somit 4 Quadrate und besitzt ein Flüssigkeitsvolumen von $0,1\ \mu\text{l}$. Die Zählkammer wurde am Rand etwas befeuchtet und ein Deckglas wurde quer auf die Träger aufgeschoben. Der Abstand ist korrekt, wenn Interferenzfarben (Newton'sche Ringe) zwischen Zählkammer und Deckglas zu sehen sind. Die Zellsuspension verteilte sich durch Kapillarkräfte auf die 16 kleineren Quadrate nach Pipettieren des entsprechenden Volumens zwischen der Zählkammer und Deckglas. Nach der lichtmikroskopischen Auszählung der quadratischen Felder wurde der Mittelwert aller gezählten Zellen mit dem Faktor 10000 multipliziert, um die Konzentration 10^6 Zellen/ml zu erhalten.

3.2.2.3 Plasmidgestützte Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion beschreibt das Einschleusen von exogener DNA oder RNA in Säugetierzellen. Es wird generell zwischen einer transienten (temporären) und stabilen Transfektion unterschieden. Bei erfolgreicher Integration der exogenen DNA wird eine Zelle isoliert und kultiviert, wodurch Zellen mit der gleichen Expressionsstärke aus einem Klon generiert werden können. Diese stabile Transfektion kann zum einen auf die Integration der exogenen DNA in das zelluläre Genom oder zum anderen auf einer Plasmid-kodierte Antibiotikaresistenz beruhen. In dieser Arbeit wurde jedoch stets eine Plasmid-DNA durch eine Elektroporation oder liposomale Transfektion transient in die Zellen eingebracht. Plasmide sind kreisförmige DNA-Moleküle und können als Grundlage zur Verstärkung und Expression von Genen von Interesse dienen.

Elektroporation:

Mit Hilfe der Elektroporation wird durch Erzeugen eines elektrischen Feldes mit definierter Stärke und Puls temporär die Permeabilität der Plasmamembran erhöht. Bei dieser Form der Transfektion steigt der Dipolmoment des hydrophilen Teils der Phospholipidmembran, die mit dem elektrischen Feld interagieren, wodurch sich kleine Poren (8 nm im Durchmesser) bilden (Benz und Zimmermann, 1981), durch die die DNA in die Zelle eindringen kann

3. Material und Methoden

(Neumann *et al.*, 1982). Nach dem Impuls des elektrischen Feldes schließen sich die Poren wieder, was für das Überleben der Zellen wichtig ist. Da durch diese Poren sowohl exogene als auch endogene Makromoleküle gelangen können, sind bei der Elektroporation vor allem die Stärke, Dauer und Zeitintervalle der Impulse von großer Bedeutung.

Für die Transfektion wurden zunächst jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen der RPMI 8226 und NALM-6 bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 100 μ l OptiMEM resuspendiert. Nach Addition des Plasmid-Genoms in einer Menge von 5 μ g (2,5 μ g, wenn Zellen mit 2 Plasmid-Genomen transfiziert wurden) wurde das Zell-Plasmid-Gemisch in eine Elektroporationsküvette überführt und in den Elektroporator (AmaxaNucleofactor II Electroporation) eingesetzt. Dabei stehen die Elektroden der Küvette in Verbindung mit den elektrischen Kontakten des Elektroporators, welcher über fest installierte, an die jeweilige Zelllinie angepasste elektrische Impulse enthält. Nach der Elektroporation wurden 2 ml Kulturmedium in jeweils 3 Kulturschalen gegeben, in denen sich sterile mikroskopische Deckgläser befanden, auf die vorsichtig die in 500 μ l Kulturmedium aufgenommenen Zellen gleichmäßig aufgeteilt worden sind. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und nach 24 h wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt.

Lipofektion:

In dieser Arbeit wurde für eine weitere Transfektionsmethode das FuGENE® HD Transfektionsreagenz verwendet, bei der die einzubringende DNA über eine Komplexbildung mit Lipidmolekülen über die Membran in die Zelle gelangen kann, was generell als liposomale Transfektion oder Lipofektion bezeichnet wird. Diese Transfektion wurde in dieser Arbeit ausschließlich für die HEK-293 Zelllinie verwendet und hatte den Zweck das heterologe Gen von Interesse in den Zellen zu exprimieren. Die Zellen wurden dafür zunächst mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst, welches durch Zugabe von frischem Medium inhibiert wurde und auf sterilen mikroskopischen Deckgläsern in Kulturschalen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer Konfluenz von 70-80 % wurde bei jeder Kulturschale das Medium abgesaugt und 2 ml frisches Medium hinzugegeben. In 100 μ l reduziertem Medium (OptiMEM) wurden 2 μ g des Plasmids und 5 μ l des FuGENE® HD Transfektionsreagenz vermischt und für kurze Zeit auf dem Vortex-Mixer geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Zeit reichte für die Komplexbildung des Plasmids mit den Lipidmolekülen aus und der Komplex wurde vorsichtig tropfenweise auf die

Zellen gegeben. Nach 24-48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt.

3.2.2.4 Bestimmung der Proliferation mit Countess®Automated Cell Counter

Da in dieser Arbeit die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt worden sind, die die Viabilität stark beeinträchtigen, wurde zusätzlich die Proliferation dieser Zellen gemessen, da nicht immer die Abnahme der Viabilität mit der Abnahme der Proliferation gleichzusetzen ist. Hierfür wurde der elektronisch unterstützte „Countess®Automated Cell Counter“ verwendet. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis von 1:2 mit einer sterilfiltrierten Trypanblau-Lösung (Invitrogen) auf dem Vortex-Gerät kurz geschüttelt und in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau dient zur Färbung von toten Zellen, da dieser Farbstoff nur in das Cytosol gelangt, wenn die Integrität der Membran verloren geht. Der „Countess®Automated Cell Counter“ ist mit einer Kamera verbunden, mit der vor jeder Messung die Zellen fokussiert wurden. Die automatisierte Zellzählung, welche den Verdünnungsfaktor bereits einberechnet, gibt neben der Gesamtzellzahl auch die Anzahl der toten und lebenden Zellen an. Für die Proliferation wurde jedoch nur die Anzahl der lebenden Zellen berücksichtigt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2010.

3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beschreibt eine Methode, bei dem Zellen in Suspension in hohem Tempo in einer Kapillare an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl mit entsprechender Wellenlänge vorbeiströmen. Somit können Eigenschaften und Anzahl der Zellen anhand von Form, Struktur oder Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt werden. Die Durchflusszytometrie erlaubt eine multiparametrische Analyse von bis zu mehreren Tausend Zellen pro Sekunde. Die häufigste Anwendung findet diese Methode in Blutuntersuchungen (Shah *et al.*, 2013; Brown und Wittwer, 2000), was die Immunologie miteinschließt (Jennings und Foon, 1997). Allerdings können auch DNA- (Hedley *et al.*, 1985) und RNA-Gehalt (Depreter *et al.*, 2017) in den Zellen bestimmt werden, um so Rückschlüsse auf Krankheiten zu ziehen. Bei dem sogenannten Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren (FACS, engl. fluorescence-activated cell sorting) können Fluorophor-markierte

Zellen von Interesse, aufgrund der entsprechenden Fluoreszenz, separiert werden und für spätere Untersuchungen weiter verwendet werden. Bei jedem Durchflusszytometer werden die Parameter Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. side scatter) eingestellt. Das Vorwärtsstreulicht verläuft mit dem Laserstrahl und gibt Aufschluss über die Zellgröße, da das Licht im flachen Winkel an der Zelle gebrochen wird. Das Seitwärtsstreulicht fällt senkrecht auf den Laserstrahl ein und gibt somit durch die Beugung des Lichts im rechten Winkel Aufschluss über die Granularität der Zelle. Diese beiden Parameter werden zelltypspezifisch vor jeder Messung eingestellt, wodurch nicht erwünschte Partikel, wie z.B. Zelltrümmer oder Schmutz von der Analyse ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde die Zellviabilität mit dem Durchflusszytometer Guava easyCyte 8HT der Firma Merck Millipore gemessen. Hierfür wurde das Guava ViaCount Reagenz verwendet, welches auf den zwei Fluorophoren LDS751 und Propidiumiodid (PI) basiert. Der Farbstoff LDS751 kann die Plasmamembran jeder Zelle passieren und ermöglicht somit das Erfassen jeder Zelle, die den Laser in der Kapillare passiert. PI interkaliert in der DNA und ist nicht membrangängig, wodurch nur Zellen mit einer beschädigten Plasmamembran markiert werden. Beide Fluorophore wurden mit 488 nm angeregt, wobei die maximale Emission von LDS751 712 nm und von PI 617 nm beträgt. Aufgrund der fest installierten Filter im Durchflusszytometer wurden jedoch die jeweiligen Emissionen bei 785/70 nm und 661/19 nm detektiert. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Danach wurden 250 µl der entsprechend behandelten Zellen in jeweils ein Well der 96-Well Platte pipettiert. Das vorinstallierte Programm ViaCount wurde mittels der Software guavaSoft 2.7 gesteuert. Jede Messung erfolgte in Duplikaten und endete, wenn 5000 Ereignisse (= Zellen) gemessen wurden. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2010.

3.2.4 Behandlung der Zellen mit Pharmaka

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Inkubation mit verschiedenen Pharmaka zum einen untersucht, ob eine Modulierung des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux möglich ist und zum anderen, inwiefern diese Pharmaka die Viabilität der Zellen durch mögliche Änderungen

des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux beeinflussen. Die Inkubationskonditionen mussten jedoch für beide Methoden angepasst werden.

Akute Behandlung der Zellen:

Für die Calcium-Imaging-Versuche wurden die Zellen 48 h nach Ausplattieren (falls nicht anders angegeben) mit Fura-2 AM beladen und in 300 μ l der jeweiligen Messlösung aufgenommen und in der Messkammer auf 70 % Salpetersäure-behandelte Deckgläser pipettiert (Kapitel 3.2.6.1). Um nach der Applikation der jeweiligen Substanzen die gewünschte Endkonzentration zu erhalten, musste die zu applizierende Lösung die 2-fach höhere Konzentration der Substanz enthalten, da ein Volumen von nochmals 300 μ l in die Messkammer pipettiert wurde. Dies galt auch für eine weitere Zugabe, jedoch betrug dann das Volumen 600 μ l. Für die akute Modulierung des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux wurden die Pharmaka in Anwesenheit von 0,5 mM EGTA bei Raumtemperatur hinzugegeben. Eine Ausnahme bildete hierbei Emetine. Um die Veränderung des Ca²⁺-Efflux mittels Calcium-Imaging nach Behandlung mit Emetine zu bestimmen, wurden die Zellen für 5 min zusammen mit Fura-2 AM bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Langzeitbehandlung der Zellen:

Um den Effekt der Pharmaka auf die Viabilität zu untersuchen, wurden die Zellen über einen längeren Zeitraum behandelt, weshalb die Zellen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Die Substanzen wurden entweder in DMSO oder in H₂O gelöst, wodurch zusätzliche Kontrollen nötig waren, um zu überprüfen, ob die jeweiligen Konzentrationen des Lösungsmittels bereits einen Effekt auf die Ca²⁺-Homöostase oder Viabilität ausübten. Hierbei betrug die maximale DMSO-Konzentration 0,2 % und H₂O-Konzentration 40 %. In beiden Fällen konnte keine Veränderung des Ca²⁺-Efflux oder der Viabilität beobachtet werden. Die genauen Konditionen und Vorgehensweise für die verschiedenen Inkubationen sind detailliert in dem jeweiligen Ergebnis-Kapitel beschrieben.

3.2.5 Mikroskopische Charakterisierung des ERs

3.2.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Alexander Jabłoński postulierte bereits 1933, dass Elektronen die Energie eines Photons (= Exzitation) aufnehmen können und somit von ihrem Grundzustand in einen energetisch

3. Material und Methoden

höheren Zustand übergehen (Gadella, 2009; Periasamy und Day, 2005; Jabłoński, 1933). Diese Anregung ist jedoch von kurzer Dauer, sodass die Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurückfallen und dabei Energie in Form von Wärme und Licht, entsprechend der Stokes-Verschiebung, mit einer höheren Wellenlänge (= niedrigere Energie) emittieren, was generell als Fluoreszenz bezeichnet wird. Die Funktion eines Fluorophors verläuft nach diesem Prinzip, wodurch bei entsprechender Filterwahl im Mikroskop mehrere Fluoreszenzen in der gleichen Probe erfasst werden können. Diese fluoreszenzbasierte Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um das ER strukturell zu charakterisieren. Hierfür wurden die Plasmide Sec61 β -GFP und ER-CFP mittels Elektroporation in die Zellen eingeschleust und nach 24 h mit Hilfe des „laser scanning microscop“ (LSM) Zeiss LSM780 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) analysiert. Der Vorteil dieses Mikroskops liegt hauptsächlich in dessen Auflösung, da durch einen punktförmigen Laser nur ein Teil der Probe belichtet wird und nur das emittierte Licht detektiert wird. Einfallendes Licht aus anderen Ebenen wird dabei durch eine Lochblende blockiert, was zur Schärfe des später elektronisch zusammengesetzten Bildes wesentlich beiträgt. Die Zellen befanden sich während den Aufnahmen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von PD Dr. Elmar Krause (Zentrum für integrative Physiologie und molekulare Medizin, CIPMM, Universität des Saarlandes) durchgeführt.

3.2.5.2 Elektronenmikroskopie

Substitutionslösung

2 % Osmiumtetroxid (w/w)

2 % H₂O (w/w)

in wasserfreiem Aceton

Eponlösung

Epon 812 50 % (w/v)

DDSA 33 % (w/v)

MNA 21 % (w/v)

BDMA 3% (w/v)

in wasserfreiem Aceton

33 % Epon

Eponlösung +

wasserfreies Aceton

Verhältnis 1:2

66 % Epon

Eponlösung +

wasserfreies Aceton

Verhältnis 2:1

Das Elektronenmikroskop (EM) geht auf Arbeiten von Max Knoll und Ernst Ruska in den 1930er Jahren zurück (Harris, 2018; Kourkoutis *et al.*, 2012; Erlandson, 1987; von Borries und Ruska, 1935; Knoll und Ruska, 1932). Bei dieser Art der Mikroskopie werden von einer Elektronenquelle Elektronen durch ein magnetisches oder elektrisches Feld durch lichtoptische Sammellinsen auf eine Probe gelenkt. Je nach Dicke der Probe, die von wenigen Nanometern bis Mikrometern reichen kann, werden die Elektronen unterschiedlich gebeugt und verlieren dabei auch teilweise Bewegungsenergie, was eine Generierung einer Abbildung mit Hilfe von geeigneten optischen Elementen ermöglicht. Der Strahlengang der Elektronen erfolgt in einem Vakuum, wodurch die Elektronen nicht mit anderen Gasmolekülen in der Luft kollidieren können. Je nach Dicke der Probe und gewünschter Auflösung lassen sich verschiedene Beschleunigungsspannungen anlegen, welche bei biologischen Präparaten zwischen 80 und 120 kV liegen. Durch die Elektronenmikroskopie ist es mittlerweile möglich Strukturen mit einer Auflösung von 45 pm darzustellen (Sawada *et al.*, 2015). In dieser Arbeit sollte die Morphologie der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen elektronenmikroskopisch untersucht werden. Um die Proben mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) untersuchen zu können, mussten diese speziell vorbereitet werden. Hierzu gehören das Einfrieren, die Gefriersubstitution, die Einbettung und das Schneiden der Probe. Im Folgenden wird näher auf die einzelnen Schritte eingegangen.

Die älteste Methode der Fixierung einer Probe ist die Verwendung von Aldehyden, wobei hier meistens Glutaraldehyd (GA) oder Paraformaldehyd (PFA) verwendet werden. GA bindet hauptsächlich irreversibel an Lysinreste und bildet intra- und inter-proteinerge Verbindungen aus. Jedoch bindet GA nicht sehr gut Lipide (Bozzola und Russell, 1992), weshalb ein weiteres Fixanz wie PFA hinzugegeben wird. PFA besitzt eine kleine Struktur und diffundiert somit schneller über die Membran (Bowes und Cater, 1966). Allerdings überwiegen die Nachteile der Fixierung mit Aldehyden wie z.B. die strukturelle Änderung der Zelle, Beschädigung der Plasmamembran, denaturierte Proteine oder die durch das cross-linking verursachte räumliche Änderung von Proteinen (Frankl *et al.*, 2015), wodurch diese Methode immer mehr in den Hintergrund rückt. Mittlerweile kommt in der Regel die Hochdruckgefrieretechnik („high pressure freezing“, HPF) zum Einsatz, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Bei dieser Methode bleibt die Ultrastruktur besser erhalten (Murk *et al.*, 2003) und es können somit Ereignisse im Millisekunden-Bereich biochemisch und elektronenmikroskopisch festgehalten werden (Plattner und Hentschel, 2006). Hierfür werden die Proben schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren, damit sich keine

3. Material und Methoden

Eiskristalle bilden können und somit strukturelle Veränderungen der Zellen verhindert werden können. Somit können sogar Proben mit einer Dicke von 250 µm eingefroren werden, ohne dramatische Strukturveränderungen hervorzurufen (Studer *et al.*, 2008).

Als Vorbereitung für das HPF wurden Saphirscheiben in einen Probenhalter gesetzt und mit 0,1 mg/ml Polyornithin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Polyornithin abgesaugt und jeweils 4000 der RPMI 8226 und NALM- Zellen auf die Saphirscheiben pipettiert und diese zum Absetzen der Zellen für etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Saphirscheiben wurden nacheinander in die entsprechende Halterung („flat specimen carrier“) des Hochdruckgefrierers EM PACT2+RTS (Leica) eingesetzt und bei einem Druck von ca. 2000 bar und einer Gefrierate von ca. $10^2 - 10^5$ Kelvin (K)/Sekunde (s) (Studer *et al.*, 2008; Studer *et al.*, 2001; Shimoni und Müller, 1998; Severs und Shotton, 1995) eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Es konnte gezeigt werden, dass die Gefrierate an der Oberfläche von Thrombozyten 7000-20000 K/s beträgt, aber im Inneren der Zelle die Gefrierate mit 2000 K/s deutlich geringer ist (Shimoni und Müller, 1998). Um die zellulären Strukturen kontrastreich darstellen zu können, musste zunächst eine Kryosubstitution erfolgen. Hierbei wird das in den Zellen enthaltene Wasser durch organische Lösemittel ausgetauscht (= Dehydrierung) und anschließend durch ein Einbettungsmedium ersetzt (= Fixierung). Hierfür wurde der „automatic freeze substitution apparatus“ (AFS) AFS2 (Leica) verwendet, welcher zunächst mit den darin enthaltenen Proben von -140 °C auf -90 °C in einem Zeitraum von 2 h erwärmt wurde. Die Substitutionslösung wurde auf -90 °C gekühlt und vorsichtig in die Mitte des Plastikhalters auf die Saphirscheiben pipettiert. Danach wurde der Halter mit einer Metallabdeckung verschlossen und die Temperatur kontinuierlich für 20 h von -90 °C auf -70 °C, für 20 h von -70 °C auf -50 °C und für 5 h von -50 °C auf -10 °C erhöht. Ab diesem Schritt wurde darauf geachtet, dass die Proben immer mit der jeweiligen Lösung bedeckt waren. Danach wurden die Proben mit 100 %igem Aceton 2-3 mal gründlich bei -10 °C gewaschen.

Die Einbettung der Proben im Kunstharz erfolgte durch eine Inkubation mit aufsteigender Epon-Konzentration. Zunächst wurden die Proben mit 33 % Epon (EMS, Electron Microscopy Sciences) für 10 min und danach mit 66 % Epon für eine Stunde bei jeweils -10 °C inkubiert. Die Inkubation mit 100 % Epon für eine Stunde erfolgte bei 20 °C. Die Auspolymerisierung des Epons erfolgte durch Temperaturerhöhung von 20 °C auf 40 °C und

von 40 °C auf 60 °C in jeweils 2 h. Die Endtemperatur von 60 °C wurde für 24 h beibehalten. Danach wurden die Proben innerhalb von 2 h auf 20 °C abgekühlt. Die auspolymerisierten Proben wurden anschließend aus der Substitutionseinheit entnommen und die Saphirscheiben mittels flüssigen Stickstoffs vom Epon-Block abgesprengt. Danach wurden Ultradünnschnitte (Dicke von 80 nm) mit einem Ultramikrotom (Ultramicrotom UC7, Leica) angefertigt und auf mit Pioloform befilmte TEM-Trägernetzchen aus Kupfer aufgezogen.

Da in der natürlichen Zelle nur zu einem geringen Anteil die Elektronen gestreut werden, wurden die Zellen mit Schwermetallsalzen kontrastiert. Diese Kontrastierung erfolgte mit einer 2 %igen Uranylacetatlösung und Bleicitrat. Uranylacetat bindet hauptsächlich an Carboxylgruppen und Phosphatresten von Nukleinsäuren, während Bleicitrat ebenfalls Carboxylgruppen und Phosphatresten, aber auch Sulfhydrylgruppen bindet, wodurch theoretisch alle zellulären Strukturen und vor allem die Membranen kontrastiert werden (Nagl, 1981). Zur Kontrastierung wurden jeweils 3 Tropfen von Uranylacetat und Bleicitrat und daneben ein Tropfen H₂O auf Parafilm pipettiert. Die TEM-Trägernetzchen wurden mit den Schnitten nach unten zunächst auf einen Uranylacetat-Tropfen gelegt und nach kurzer Zeit zum Waschen auf den H₂O-Tropfen platziert. Diese Prozedur wurde mit allen weiteren Tropfen fortgeführt und am Ende wurde vorsichtig mit einem Filterpapier am Rand des TEM-Trägernetzchens der Rest der verbleibenden Lösung entfernt. Zur Trocknung und weiteren Aufbewahrung wurden die TEM-Trägernetzchen in eine Gridbox überführt. Die Proben wurden schließlich an einem TEM (Fei Tecnai12 Biotwin) bei 100 kV analysiert. Alle etablierten Schritte der Probenvorbereitung (Liu *et al.*, 2010) wurden freundlicherweise mit der Hilfe von Dr. Claudia Schirra (Zentrum für integrative Physiologie und molekulare Medizin, CIPMM, Universität des Saarlandes) durchgeführt. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit der frei erhältlichen Software ImageJ 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

3.2.6 Messung von intrazellulärem Calcium mittels Calcium-Imaging

Calcium (Ca²⁺) ist für Funktionen und Abläufe in der Zelle wie Proliferation, Differentiation, Sekretion, Kontraktion, Metabolismus, Transport, Transkription, Apoptose, Entwicklung und Lernen essentiell (Berridge *et al.*, 2003; Carafoli, 2002; Berridge *et al.*, 2000). Aufgrund

3. Material und Methoden

dieser vielfältigen Mechanismen ist es von großer Bedeutung die räumliche und zeitliche Auflösung der Ca^{2+} -Homöostase zu untersuchen. Um diese Änderungen der Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]$) innerhalb der Zelle zu detektieren, wird das sogenannte Ca^{2+} -Imaging verwendet, welches auf einer Änderung der Fluoreszenzintensität, als Konsequenz der Bindung von Ca^{2+} an den verwendeten Ca^{2+} -Indikator, beruht. Grundsätzlich werden entweder chemische oder genetisch kodierte Indikatoren verwendet, letztere werden GECI (engl. genetically encoded calcium indicators) genannt. Hierzu gehört die Familie der Einzel-Fluorophor-Sensoren (GCaMP), welche aus einem Fluorophor und einem Komplex aus Calmodulin (CaM) und einer Mutante des CaM-bindenden Peptides der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (M13) bestehen (Broussard *et al.*, 2014; Nagai *et al.*, 2001). Damit das GCaMP z.B. im ER exprimiert wird, wird die Signalsequenz von Calreticulin mit dem N-Terminus von GCaMP fusioniert. Da diese Signalsequenz allerdings co-translational abgespalten wird (Blobel und Dobberstein, 1975a), bleibt das GCaMP durch das an den C-Terminus gebundene ER-Retentionssignal von BiP im ER lokalisiert (Henderson *et al.*, 2015). Durch eine reversible Konformationsänderung des CaM-M13-Komplexes, hervorgerufen durch Bindung bzw. Dissoziation von Ca^{2+} , verändert sich die Fluoreszenzeigenschaft des Fluorophors, was als Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ interpretiert wird (de Juan-Sanz *et al.*, 2017; Broussard *et al.*, 2014; Nagai *et al.*, 2001). GECI bieten den Vorteil, dass sie durch eine Transfektion in den Zellen exprimiert werden. Eine Transfektion kann zu einer sehr hohen Transfektionsrate führen und die Methode ist meist leicht durchzuführen (Kim und Eberwine, 2010). Chemische Indikatoren hingegen gelangen durch Diffusion bei einer entsprechenden Inkubation in die Zellen und können bei längerer Behandlung geringfügig toxisch wirken, zeichnen sich jedoch über eine hohe Sensitivität gegenüber Ca^{2+} aus (Paredes *et al.*, 2008; Miyawaki *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde ein Ca^{2+} -Indikator ausgewählt, welcher bereits 1985 von Roger Tsien etabliert wurde und ein Derivat des bekannten Ca^{2+} -Chelators 1,2-Bis(o-Aminophenoxy)Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (BAPTA) darstellt (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Um diesen Indikator hydrophob und damit membrangängig zu machen, wurden an die Ca^{2+} -bindenden Carboxylgruppen Acetylmethylester (AM) gebunden. Im Cytosol lokalisierte unspezifische Esterasen spalten die Estergruppen ab, wodurch der Indikator wieder hydrophile Eigenschaften innehat und somit die Plasmamembran nicht mehr passieren kann. Im Folgenden wird näher auf diese Ca^{2+} -Indikatoren eingegangen.

3.2.6.1 Cytosolische Ca^{2+} Messungen

<u>Ca^{2+}-freie Lösung:</u>	<u>nominal Ca^{2+}-freie Lösung:</u>	<u>Ca^{2+}-Lösung:</u>
140 mM NaCl	140 mM NaCl	140 mM NaCl
4 mM KCl	4 mM KCl	4 mM KCl
1 mM MgCl_2	1 mM MgCl_2	1 mM MgCl_2
10 mM D-Glucose	10 mM D-Glucose	10 mM D-Glucose
10 mM HEPES	10 mM HEPES	10 mM HEPES
0.5 mM EGTA	pH 7,4	1 mM Ca^{2+}
pH 7,4		pH 7,4

Die Ca^{2+} -Konzentration im extrazellulären Raum ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) beträgt ca. 1 mM, wohingegen die Konzentration im Cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) bis zu 10000-mal geringer ist (Bianchi *et al.*, 2004; Bronner, 2001; Simons, 1988). In Mikrodomänen, z.B. in der Nähe von Ca^{2+} -Kanälen oder – Pumpen kann die $[\text{Ca}^{2+}]$ sogar noch höher liegen. Da Ca^{2+} als „second messenger“ eine essentielle Rolle in der zellulären Funktion und Signalübertragung spielt, muss die Zelle über ein streng reguliertes Reservoir verfügen, da die zeitliche und räumliche Freisetzung bzw. Aufnahme von Ca^{2+} über das Schicksal der Zelle entscheiden kann. Die Funktion als Ca^{2+} -Speicher übernimmt, wie schon beschrieben, das ER, wobei hier je nach Zelltyp eine lumenale Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) von $\sim 500 \mu\text{M}$ vorliegen kann (Bianchi *et al.*, 2004; Hofer und Schulz, 1996). Da meistens ein transientser Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ auf eine Ca^{2+} -Freisetzung des ERs und eine damit einhergehende Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ zurückzuführen ist, wurde in dieser Arbeit der Ca^{2+} -Indikator Fura-2 verwendet. Aufgrund der niedrigen Ca^{2+} -Affinität von Fura-2 ($\sim 150 \text{ nM}$) (Paredes *et al.*, 2008; Etter *et al.*, 1996; Grynkiewicz *et al.*, 1985), ist dieser etablierte Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion von Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ gut geeignet. Nach Bindung von Ca^{2+} verschiebt sich das Exzitationsmaximum von 367 nm (= Ca^{2+} -ungebunden) nach 340 nm (= Ca^{2+} -gebunden). Hierbei bleibt allerdings das Emissionsmaximum bei 510 nm fast identisch. Somit lassen sich zwei von der Emission unabhängige Wellenlängen in ein Verhältnis setzen (= Ratio, R), weshalb Fura-2 die Eigenschaft eines ratiometrischen Ca^{2+} -Indikators einnimmt. Die gängigen Wellenlängen, die zur Exzitation verwendet werden, sind 340 nm und 380 nm, wobei die gemessenen Intensitäten jeweils bei steigender $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ sich erhöhen bzw. abnehmen. Wird nun die Ratio 340 nm/380 nm (F340/F380) gebildet, geben die Werte eine von der $[\text{Ca}^{2+}]$ abhängige Größe an. Aufgrund der optischen Filter im verwendeten Mikroskop wurden in dieser Arbeit Exzitationen im Bereich von 327-353 nm („340/26 BrightLine HC“) und 381-392 nm („387/11 BrightLine HC“), sowie eine Emission im Bereich von 528-555 nm („ET510/80m“)

3. Material und Methoden

verwendet. Somit ergeben sich eine Exzitation bei 340 nm und 387 nm und eine Detektion der Emission bei 510 nm, woraus die in dieser Arbeit gebildeten Ratios F340/F387 resultieren.

Für die Ca^{2+} -Imaging-Experimente wurden zunächst die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit einer Konzentration von $\sim 0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in eine Zellkulturschale (35 mm x 10 mm) transferiert. Für alle in dieser Arbeit unternommenen Ca^{2+} -Imaging-Versuche mit RPMI 8226 und NALM-6 Zellen wurden die mikroskopischen Deckgläser für 16-24 h in 70 %iger Salpetersäure inkubiert, damit die Oberfläche des Glases rau und hydrophob wird, wodurch eine Anhaftung der Suspensionszellen gewährleistet war. Danach wurden die Deckgläser mit dest. H_2O so lange gewaschen, bis sich wieder ein neutraler pH-Wert eingestellt hatte. Um die Fura-2-Inkubationsbedingungen für die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit Fura-2 AM beladen und anschließend die Intensität der Emission bei 510 nm nach Exzitation mit 360 nm detektiert. Durch die Anregung bei 360 nm, am isosbestischen Punkt, wird die Fluoreszenz von Fura-2 gemessen, welche unabhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ist. Die RPMI 8226 Zellen wurden mit 4 μM und die NALM-6 Zellen mit 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, was für eine annähernd gleichwertige Beladung beider Zelllinien genügte (Abb. 3.2). Danach wurden die Zellen für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert und in 300 μl der jeweiligen Messlösung auf die 70 % Salpetersäure-behandelten Deckgläser gegeben. Um die Zellen zu entfernen, die nicht an dem Deckglas hafteten, wurden 300 μl der jeweiligen Messlösung zu den bereits vorhandenen 300 μl hinzugegeben und wieder abgenommen. Bevor die Messung gestartet wurde, wurden drei Hintergründe und 30-90 Zellen mit so genannten Regionen von Interesse (ROI, engl. region of interest) markiert. Die Werte der Exzitation von 340 nm und 387 nm, welche der Emission bei 510 nm entsprechen, wurden mit dem Mittelwert der drei Hintergründe korrigiert, sodass eine indirekte Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ zu jedem einzelnen Messpunkt gegeben war. Die Zellen wurden für 10 ms bei einem Binning von 4 oder 8 belichtet, wobei alle 3 Sekunden eine Aufnahme der Exzitation mit 340 nm und 387 nm erfolgte. Diese Einstellungen wurden mit der Software VisiView2.1.1 (Visitron Systems GmbH Puchheim) vorgenommen. Nach diesem Protokoll wurden alle weiteren Ca^{2+} -Imaging-Experimente durchgeführt, falls es nicht anders angegeben wurde.

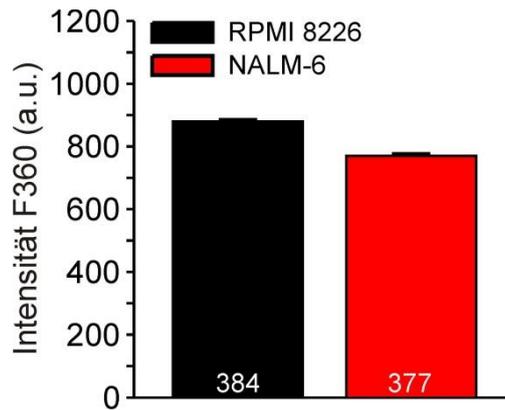


Abbildung 3.2. Vergleich der Beladung der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit Fura-2 AM. Für die Calcium-Imaging-Versuche wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 beladen. Gezeigt ist die Hintergrund korrigierte Intensität der Emission von 510 nm nach Exzitation mit 360 nm (F360, Ca^{2+} -unabhängig). Die Anzahl der gemessenen Zellen ist angegeben ($n = 3$).

Das Einfrieren für die Lagerung der Zellen (Kapitel 3.2.2.1) erfolgte nach mehrmaligem Passagieren der Zellen, wobei nichtsdestotrotz nach dem Auftauen die erste Passage auch als solche angesehen wurde. Aufgrund dessen wurde überprüft, ob sich die Ca^{2+} -Homöostase über die Anzahl der Passagen verändert (Abb. 3.3). Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Fura-2 AM beladen und auf die 70 % Salpetersäure-behandelten Deckgläser transferiert. Die Messungen wurden entweder in Anwesenheit von 0,5 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) oder 1 mM Ca^{2+} durchgeführt. Bei Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ wird der sogenannte „store operated calcium entry“ (SOCE) aktiviert, welcher für die Bereitstellung von Ca^{2+} aus dem Extrazellarraum sorgt, sodass das ER mit Ca^{2+} wieder aufgefüllt werden kann (Cho *et al.*, 2017; Ong *et al.*, 2007b; Liou *et al.*, 2005; Hoth und Penner, 1992; Putney, 1986). Somit ist dieser Signalweg ein wichtiger Bestandteil zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase. Drei Minuten nach Beginn der Messung wurde 1 μM Thapsigargin (TG) hinzugegeben, um den Ca^{2+} -Efflux vom ER zu demaskieren. TG inhibiert die ER-membranständigen SERCA-Pumpen (Kijima *et al.*, 1991), die für ein Wiederauffüllen des ERs mit Ca^{2+} verantwortlich sind (Toyoshima und Inesi, 2004). Bei Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ aufgrund des SOCE deutlich mehr an als in Anwesenheit von 0,5 mM EGTA ($\text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$). In einem weiteren Versuch wurde nach einer Minute der gesamte Ca^{2+} -Gehalt der Zelle mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (IONO) gemessen. IONO lagert sich sowohl in der Plasmamembran, als auch in den Membranen der Organellen ein und kann so Ca^{2+} über die Membranen transportieren (Abramov und Duchon, 2003; Himmel *et al.*, 1990; Pollock und Rink, 1986; Beeler *et al.*, 1979). Zur Auswertung wurde der Mittelwert des Bereichs des maximalen Anstiegs von dem

3. Material und Methoden

Mittelwert aus 30 Sekunden vor TG- oder IONO-Zugabe subtrahiert ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$). Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, konnten keine dramatischen Veränderungen sowohl des Ca^{2+} -Efflux aus dem ER, als auch des Ca^{2+} -Gehalts in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen der Passagen 0-40 beobachtet werden.

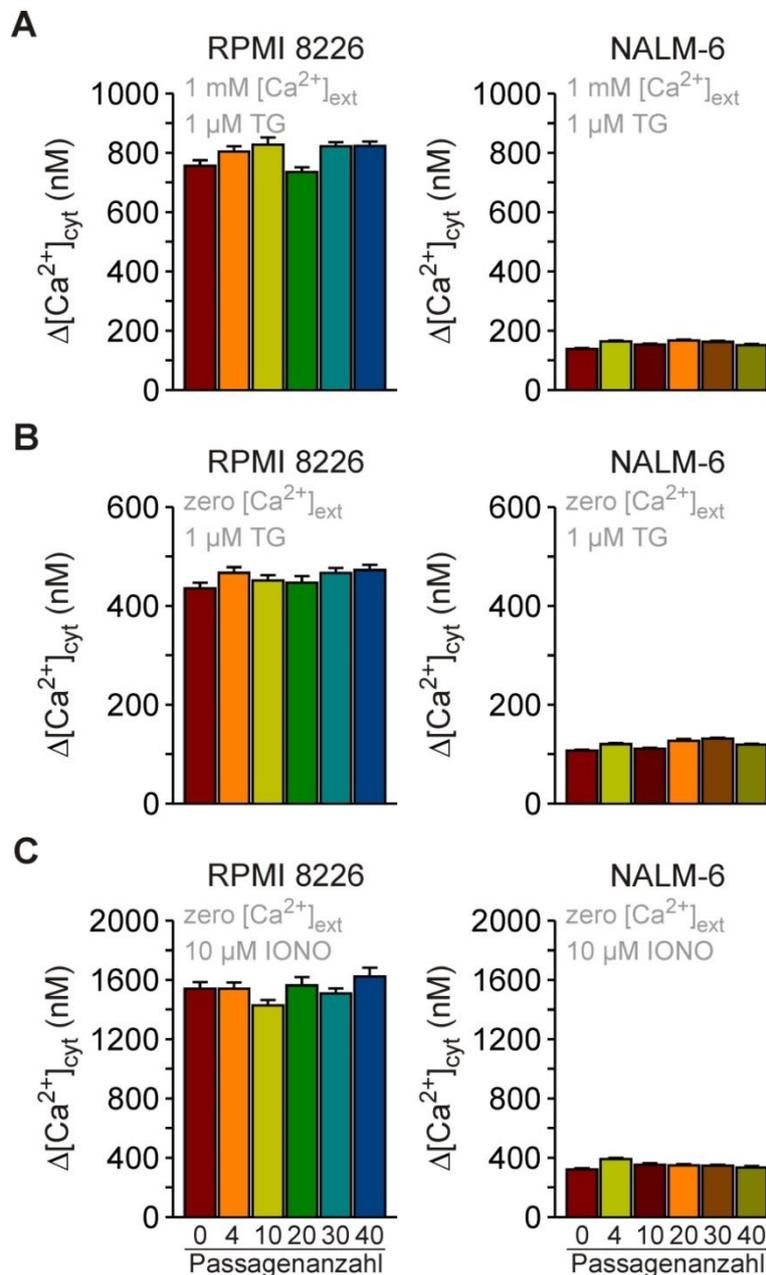


Abbildung 3.3. Ca^{2+} -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bei unterschiedlicher Passagenanzahl. Für die Calcium-Imaging-Versuche wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 beladen. Links sind die RPMI 8226 und rechts die NALM-6 Zellen dargestellt. (A) Der Ca^{2+} -Efflux aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde mit 1 μM Thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -Lösung (1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) gemessen. In Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} wird bei Entleerung des ERs unter physiologischen Bedingungen der sogenannte „store operated calcium entry“ (SOCE) aktiviert, was Rückschlüsse auf dessen Funktionalität ziehen lässt. (B) Vergleichbar mit A, nur dass die Messung in Anwesenheit von 0,5 mM EGTA ($\text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) durchgeführt wurde, wodurch nur der Ca^{2+} -Efflux aus dem ER gemessen wird. (C) Der Ca^{2+} -Gehalt der gesamten Zelle wurde mit 10 μM Ionomycin (IONO) in $\text{zero}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ detektiert. Die Passagenanzahl ist unten angegeben ($n = 3$).

3.2.6.2 Umrechnung der Fura-2 Ratio-Werte in Ca^{2+} -Konzentrationen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ratio-Werte von Fura-2 in systemunabhängige $[\text{Ca}^{2+}]$ umgerechnet. Dafür musste das System und die Zellen zunächst kalibriert werden. Hierfür wurden nach Lomax *et al.* (2002) eine systemspezifische Dissoziationskonstante K_d von Fura-2 für Ca^{2+} und die minimalen und maximalen Ratio-Werte der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen ermittelt. Um geeignete $[\text{Ca}^{2+}]$ im linearen Bereich zu erhalten, müssen die ermittelten Werte in eine entsprechende Formel eingesetzt werden (Lomax *et al.*, 2002). Um die K_d zu erhalten, wurde ein Fura-2 Kalibrierungskit (Life Technologies) verwendet, welches jeweils 50 μM Fura-2 enthält und verschiedene $[\text{Ca}^{2+}]$ (0-39 μM), sowie eine zusätzliche Lösung ohne Fura-2 (Tabelle 3.7). Darüber hinaus enthalten alle Lösungen Polystyren-Kügelchen mit einem Durchmesser von 15 μm , welche zum einen als Abstandhalter der beiden Deckgläser und zum anderen als Fokusebene dienten. Zur Kalibrierung wurden 5 μl der jeweiligen Lösung auf ein Deckglas mit einem Durchmesser von 25 mm pipettiert und ein kleineres Deckglas (Durchmesser von 10 mm) auf den Tropfen gelegt, wodurch sichergestellt wurde, dass sich die Lösung mit den Kügelchen immer gleichmäßig verteilt. Danach wurde die Emission bei 510 nm nach Exzitation bei 340 nm (F_{340}) und 387 nm (F_{387}) detektiert. Bei jeder Messung wurden die ROIs beibehalten, um Abweichungen der Pixeldichte der Kamera zu eliminieren.

Tabelle 3.7. Lösungen des Fura-2 Kalibrierungskits (Life Technologies) zur Detektion der systemspezifischen K_d .

Bezeichnung	freies Ca^{2+} (μM)	Fura-2 (μM)
1	0	50
2	0,017	50
3	0,038	50
4	0,065	50
5	0,1	50
6	0,15	50
7	0,225	50
8	0,351	50
9	0,602	50
10	1,35	50
11	39	50
12	39	-

Für die Umrechnung wurden bestimmte Ratio-Werte benötigt. Dazu gehören die maximale Intensität der Emission bei 510 nm nach Exzitation mit 340 nm ($F_{340\text{max}}$) und 387 nm ($F_{387\text{max}}$) der Lösung 1, die minimalen Intensitäten ($F_{340\text{min}}$, $F_{387\text{min}}$) der Lösung 11 und die

3. Material und Methoden

Hintergrundfluoreszenzen (BG_{340} , BG_{387}) der Lösung 12. Die restlichen Lösungen wurden ebenfalls gemessen, was die Genauigkeit der Kalibrierung erhöhte. Die Umrechnung der ermittelten Intensitäten in $[Ca^{2+}]$ erfolgte mit der Gleichung (Gl.) nach Grynkiewicz und Kollegen (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}]_{\text{frei}} = K_d \cdot \alpha \cdot \frac{[(R - R_{\min})]}{[(R_{\max} - R)]} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

wobei $R = \frac{[(F_{340} - BG_{340})]}{[(F_{387} - BG_{387})]} \quad (\text{Gl. 3.2})$

$$\alpha = \frac{F_{387\text{max}}}{F_{387\text{min}}} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Und $K'_d = K_d \cdot \alpha \quad (\text{Gl. 3.4})$

Nach Einfügen der entsprechenden Werte und Logarithmierung der Gleichung (3.1), wird diese in eine lineare Geradengleichung der Form $y = mx + b$ umgestellt (Abb. 3.4). Durch Exponenzieren des Wertes der Nullstelle dieser Geraden ($y = 0$), was dem Logarithmus der K'_d entspricht, erhält man den gewünschten Wert von K'_d .

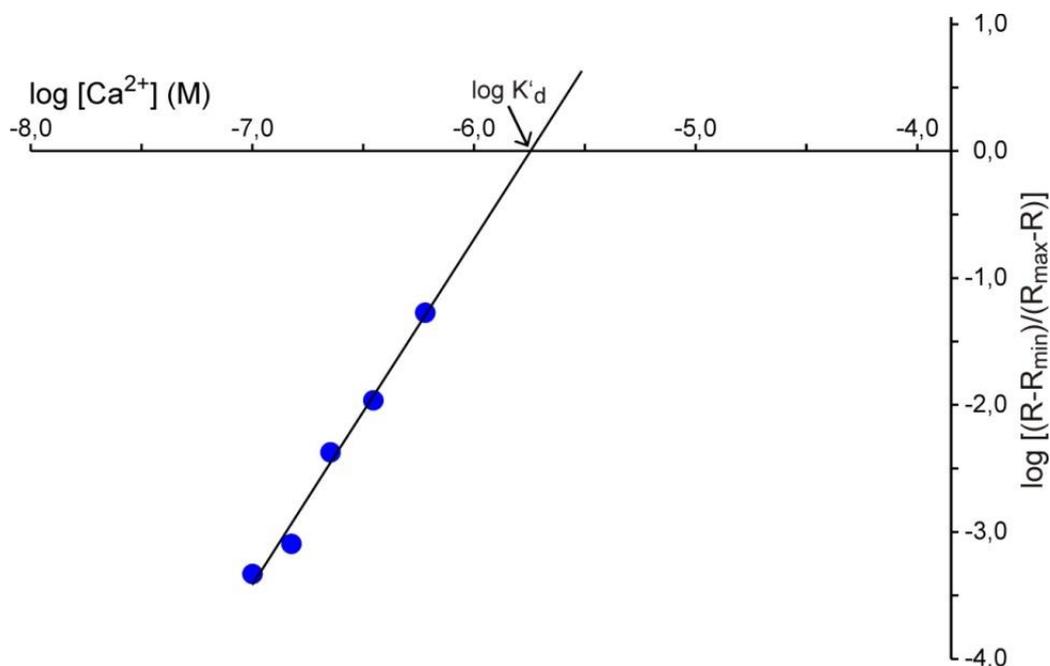


Abbildung 3.4. Exemplarische Kalibrierungsgerade von Fura-2 für Ca^{2+} . Für die Kalibrierung von Fura-2 wurde ein Kalibrierungskit verwendet, welches Lösungen mit jeweils $50 \mu\text{M}$ Fura-2 und verschiedenen $[Ca^{2+}]$ (0 - $39 \mu\text{M}$) enthält, sowie eine Lösung ohne Fura-2. Auf der x-Achse sind die logarithmierten $[Ca^{2+}]$ (in Mol, M) und auf der y-Achse die logarithmierten Ratio-Werte aufgetragen. Mit Hilfe dieser linearen Geradengleichung der Form $y = mx + b$ kann das Verhältnis zwischen Fluoreszenz und $[Ca^{2+}]$ dargestellt werden. Durch die Nullstelle ($y = 0$) der interpolierten Geraden erhält man die logarithmierte K'_d , welche durch Exponenzieren den gewünschten Wert der K'_d angibt.

Da die Xenon-Gasentladungslampe über die Zeit an Intensität verliert, muss diese in regelmäßigen Abständen ausgetauscht werden. Daher ist es auch notwendig nach jedem Wechsel der Lampe die K'_d neu zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde mit folgenden K'_d gearbeitet:

- (1) $K'_d = 5105,14 \text{ nM}$
- (2) $K'_d = 4372,23 \text{ nM}$
- (3) $K'_d = 5248,88 \text{ nM}$
- (4) $K'_d = 3742,5 \text{ nM}$

Die systemunabhängige K_d wurde durch die Division der K'_d -Werte mit dem Faktor α aus der Gleichung (3.3) ermittelt. Daraus ergibt sich:

- (1) $K_d = 116,08 \text{ nM}$
- (2) $K_d = 163,24 \text{ nM}$
- (3) $K_d = 171,81 \text{ nM}$
- (4) $K_d = 388,95 \text{ nM}$

Für die Umrechnung der Ratio-Werte in $[\text{Ca}^{2+}]$ mussten neben der systemunabhängigen K'_d noch die zelltypspezifischen minimalen und maximalen Ratio-Werte (R_{\min} und R_{\max}) ermittelt werden (Abb. 3.5). Für R_{\min} wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Fura-2 AM beladen und in $20 \mu\text{M}$ IONO in Anwesenheit von 15 mM EGTA bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Dieser Schritt wurde 3 weitere Male wiederholt, um sicherzugehen, dass die Zellen so wenig Ca^{2+} wie möglich enthalten. Danach wurden die Zellen auf 70% Salpetersäure-behandelten Deckgläsern in der gleichen Lösung verteilt und in die Messkammer eingespannt. Die Messung betrug insgesamt 5 min und auf dem gleichen Deckglas wurde ein anderer Bereich ausgewählt und ebenfalls 5 min gemessen. Um nun den Ratio-Wert für R_{\min} zu erhalten, wurde von jeder Zelle das Minimum bestimmt und der Mittelwert gebildet. Für R_{\max} wurden die Zellen mit Fura-2 AM beladen und auf den 70% Salpetersäure-behandelten Deckgläser in nominal Ca^{2+} -freier Lösung verteilt und in die Messkammer eingespannt. Da sich in der Messkammer bereits $300 \mu\text{l}$ der extrazellulären Lösung befanden, mussten die Konzentrationen der zu applizierenden Substanzen dementsprechend eingestellt werden. Zur Vereinfachung werden im Nachfolgenden immer die Endkonzentrationen angegeben. Drei Minuten nach Beginn der Messung wurden $10 \mu\text{M}$ IONO in Anwesenheit von 25 mM Ca^{2+} hinzugegeben, um somit die maximale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ zu erreichen. Nicht nur das Ca^{2+} in der Zelle, sondern auch das extrazelluläre Ca^{2+} wird aufgrund des enormen Gradientenunterschieds in das Cytosol transportiert (Himmel *et al.*, 1990). Dieser enorme Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ wurde für

3. Material und Methoden

weitere 12 min detektiert. Diese Messung wurde nochmals mit Zellen aus einer anderen Schale wiederholt und es wurde aus beiden Messungen das Maximum der Zelle gesucht und der Mittelwert gebildet, um den gewünschten Ratio-Wert von R_{\max} zu erhalten.

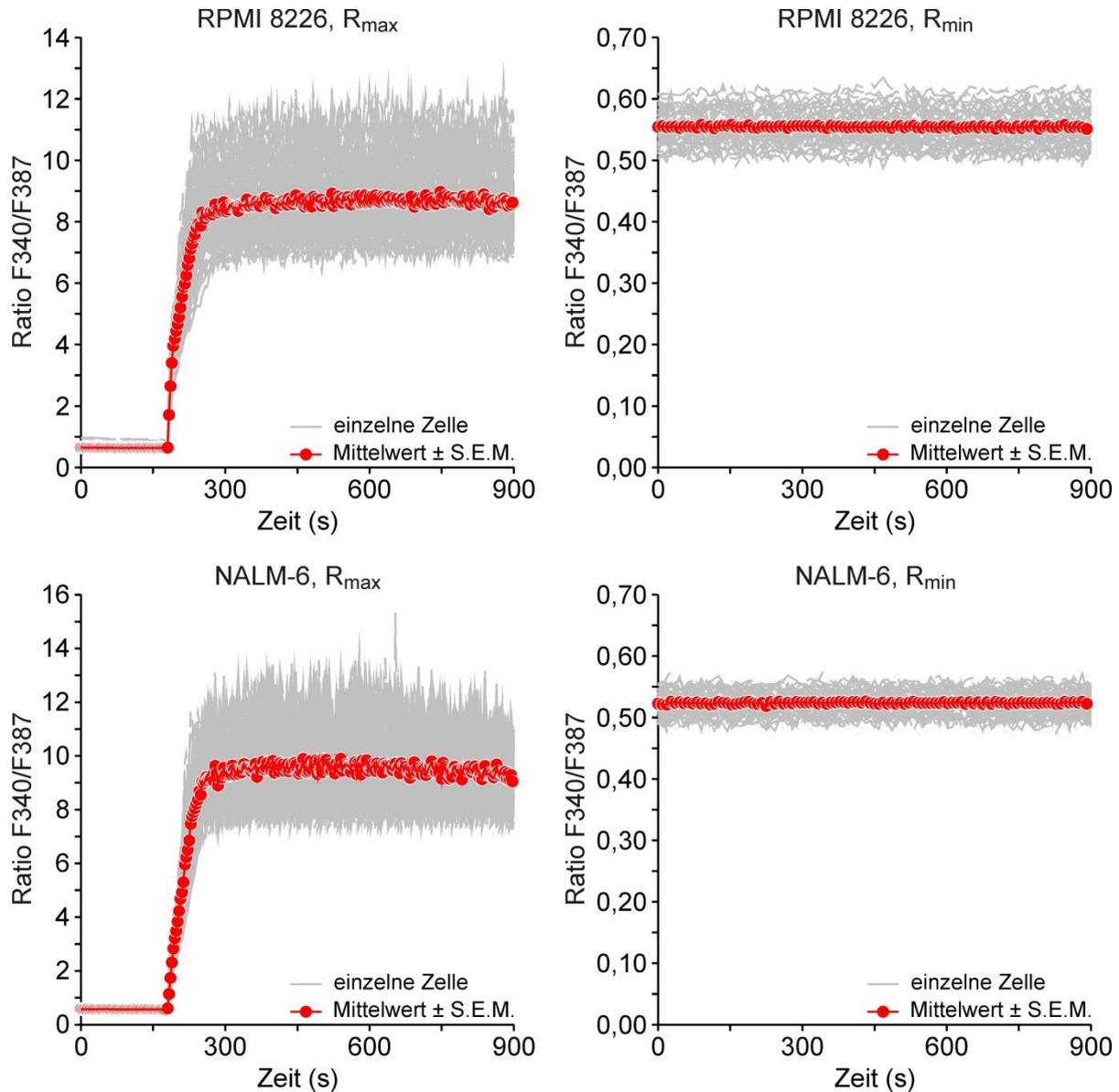


Abbildung 3.5. Bestimmung der minimalen (R_{\min}) und maximalen (R_{\max}) Ratio-Werte von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zur Kalibrierung von Fura-2 Messwerten. Die Zellen wurden mit 4 μM (RPMI 8226) oder 8 μM (NALM-6) Fura-2 AM für 5 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 beladen und danach für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Um R_{\min} zu erhalten, wurden die Zellen mit 20 μM Ionomycin (IONO) in Anwesenheit von 15 mM EGTA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies wurde drei weitere Male wiederholt. Danach wurden die Zellen auf 70 % Salpetersäure-behandelten Deckgläsern in der gleichen Lösung verteilt und in die Messkammer eingespannt. Die Messung betrug insgesamt fünf Minuten. Auf dem gleichen Deckglas wurde ein anderer Bereich ausgewählt und ebenfalls für fünf Minuten gemessen. Der R_{\min} -Wert ergab sich aus dem Mittelwert des minimalen Ratio-Wertes aller gemessenen Zellen. Für R_{\max} wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Fura-2 AM beladen und in nominal Ca^{2+} -freier Lösung auf 70 % Salpetersäure-behandelten Deckgläsern verteilt und in die Messkammer eingespannt. Drei Minuten nach Beginn der Messung wurde 10 μM IONO und 25 mM Ca^{2+} hinzugegeben. Die Messung wurde einmal wiederholt. Der R_{\max} -Wert ergab sich aus dem Mittelwert des maximalen Ratio-Wertes aller gemessenen Zellen.

Aufgrund des mehrmaligen Wechsels der Lampe, vor allem aber wegen deren Intensitätsverlust über die Zeit, wurden in dieser Arbeit für die RPMI 8226 Zellen R_{\min} -Werte im Rahmen von 0,22 - 0,55 und R_{\max} -Werte von 4,90 - 9,34 verwendet. Die verwendeten R_{\min} -Werte der NALM-Zellen lagen bei 0,22 - 0,53 und die R_{\max} -Werte befanden sich zwischen 4,79 und 9,53.

Manche Zellen betrug jedoch niedrigere Ratio-Werte als der gemessene R_{\min} -Wert. Dies hatte zur Folge, dass negative $[Ca^{2+}]$ berechnet wurden. Aufgrund dessen wurden Zellen, die länger als 30 Sekunden negative $[Ca^{2+}]$ aufwiesen, nicht in die Analyse mit einbezogen. Des Weiteren ließen sich nicht immer alle gemessenen Veränderungen der $[Ca^{2+}]$ unter verschiedenen Bedingungen deutlich voneinander unterscheiden, was aus einem geringen Unterschied der $[Ca^{2+}]$ resultierte, weshalb eine Grenze berechnet werden musste, ab der objektiv eine signifikante Änderung vorlag. Hierzu wurde die Größe der „peak-to-peak“-Amplitude der basalen $[Ca^{2+}]$ Fluktuationen der jeweiligen Kontrolle berechnet, indem die Differenz aus dem Maximum und Minimum vom Anfang der Messung gebildet wurde. Dieser Wert betrug im Mittel 44 nM für RPMI 8226 und 53 nM für NALM-6 Zellen, welche jedoch für jeden Versuch neu berechnet wurden.

3.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der nicht-parametrische Zweistichproben Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Dieser Test wurde ausgesucht, da keine Normalverteilung der Daten vorlag und dieser Test diese nicht voraussetzt. Zum Widerlegen oder Bestätigen der Nullhypothese wurde das Signifikanzniveau in verschiedene Bereiche eingeteilt:

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

$p < 0,05 \triangleq$ *

$p < 0,01 \triangleq$ **

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

Bei den angezeigten Fehlerbalken handelt es sich entweder um die Varianz (S.D., engl. standard deviation) oder den Standardfehler einer Stichprobenmenge (S.E.M., engl. standard error of the mean).

3. Material und Methoden

Die Berechnung der Fehlerbalken der Varianz erfolgte mit der Gleichung:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

und die des S.E.M. mit:

$$\text{S.E.M.} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gl. 3.6})$$

wobei x = Wert einer Stichprobe

\bar{x} = Mittelwert aller Stichproben

n = Anzahl der Stichproben

σ = Varianz

4. Ergebnisse

Der ER-membranständige heterotrimere Sec61-Komplex bildet die Proteintranslokase, welche zusammen mit dessen akzessorischen Proteinen verschiedene Funktionen ausübt. Die Hauptfunktion besteht in der Translokation naszierender Polypeptidketten in das ER-Lumen und die Insertion von Proteinen in die Membran (Shao und Hegde, 2011; Zimmermann *et al.*, 2011; Rapoport *et al.*, 2004; Schnell und Hebert, 2003; Mothes *et al.*, 1994). Daneben wurde jedoch in den letzten Jahren gezeigt, dass die porenbildende Untereinheit des Sec61-Komplexes (Sec61 α) für Ca²⁺ durchlässig ist (Schorr *et al.*, 2015; Schäuble *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2011; Flourakis *et al.*, 2006), wobei dieser Ca²⁺-Efflux durch verschiedene Proteine wie das lumenale Chaperon BiP, dessen Co-Chaperone ERj3 und ERj6, Sec62 sowie Ca²⁺-CaM reguliert wird (Schorr *et al.*, 2015; Linxweiler *et al.*, 2013; Schäuble *et al.*, 2012; Erdmann *et al.*, 2011; Greiner *et al.*, 2011a). Des Weiteren wurde in mehreren Studien gezeigt, dass Mutationen in *SEC61A1* zu verschiedenen Krankheiten führen können. Erstens, verursacht eine Substitution der Aminosäure Tyrosin (Y) zu Histidin (H) an der Stelle 344 (Y344H) einen Diabetes-ähnlichen Phänotyp, welcher aus einem Absterben der β -Zellen aus dem Pankreas, begleitet von ER-Stress, resultiert (Lloyd *et al.*, 2010). Diese Mutation befindet sich in der BiP-Bindestelle von Sec61 α (Loop 7), was zu einem substratspezifischen, verminderten Proteintransport in das ER-Lumen und erhöhtem Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER in HeLa Zellen führt (Schäuble *et al.*, 2012). Zweitens, eine durch den Austausch von Valin (V) mit Glycin (G) an der Stelle 67 (V67G) und Threonin (T) mit Alanin (A) an der Stelle 185 (T185A) hervorgerufene Mutation führt im Menschen in beiden Fällen zu einer renalen tubulären Atrophie, was schließlich in einen Verlust der Nierenfunktion mündet (Bolar *et al.*, 2016). Drittens, befindet sich anstatt Valin die Aminosäure Asparaginsäure (D) an der Stelle 85 (V85D), wird die Überlebensrate von Zelllinien, welche als Modell für Plasmazellen dienen, signifikant reduziert (Schubert *et al.*, 2018). Zusätzlich führt diese dominant-negative Mutation sowohl zu einem Defekt im cotranslationalen Proteintransport, als auch zu einem veränderten Ca²⁺-Gehalt in HeLa Zellen, was für eine entscheidende Rolle für Sec61-Komplexe in der Ca²⁺-Homöostase von Plasmazellen spricht.

Alle eben genannten Phänotypen der Sec61 α -Mutationen bildeten die Grundlagen für die Hypothese dieser Arbeit, nämlich, ob Zellen mit einem hohen Sec61 α -Gehalt anfälliger auf pharmakologisch-induzierte Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase im ER reagieren und ob durch Beeinflussung der Funktionen von Sec61 α oder dessen akzessorischen Proteine die

Viabilität der Zellen stärker eingeschränkt ist. Hierfür wurde zum einen die als Modell für die Tumorerkrankung Multiples Myelom dienende Zelllinie RPMI 8226 und als Gegensatz die Vorläufer B-Zelllinie NALM-6 ausgewählt. Zunächst wurde die Morphologie beider Zelllinien mit dem Fokus auf das ER untersucht. Danach wurde die Ca^{2+} -Homöostase charakterisiert, anschließend der Sec61 α -induzierte Ca^{2+} -Efflux moduliert und die Viabilität nach Behandlung mit ER-Stressoren analysiert.

4.1 Morphologie des ERs in RPMI 8226 Zellen und NALM-6 Zellen

Die ausgewählten Zelllinien RPMI 8226 und NALM-6 unterscheiden sich hauptsächlich funktionell in der Fähigkeit Ig zu synthetisieren. Erstere stellen ausdifferenzierte Plasmazellen dar und sollten daher ein erhöhtes ER-Volumen besitzen, sowie eine Hochregulierung der entsprechenden Proteine, die zur Kompensierung des damit einhergehenden Stresses nötig sind. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellen zunächst mit den beiden Plasmiden ER-CFP und Sec61 β -GFP transfiziert (siehe Kapitel 3.2.2.3) und nach 48 h an einem LSM analysiert (siehe Kapitel 3.2.5.1). ER-CFP wird im ER-Lumen und Sec61 β -GFP in der ER-Membran exprimiert, welche somit die mikroskopische Darstellung des ERs gestatten. Die RPMI 8226 Zellen sind etwas größer als die NALM-6 Zellen, wobei beide Zelllinien die gleiche Form aufweisen. Jedoch ist zu erkennen, dass das Cytosol der RPMI 8226 Zellen mit deutlich mehr ER durchzogen ist als in NALM-6 Zellen (Abb. 4.1 A). Außerdem scheinen die RPMI 8226 Zellen mehr „ER sheets“ zu besitzen. Um die Morphologie des ERs in beiden Zelllinien besser untersuchen zu können, wurden die Zellen mittels Hochdruckgefrieretechnik und darauffolgender Epon/Osmium-Substitution für die elektronenmikroskopische Aufnahmen vorbereitet (siehe Kapitel 3.2.5.2), welche in Abbildung 4.1 B abgebildet sind. Die quantitative Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt, dass das Cytoplasma in den RPMI 8226 Zellen verglichen mit NALM-6 Zellen eine doppelt so große Fläche aufweist (Abb. 4.1 C). RPMI 8226 Zellen müssen ihren Energiehaushalt an die hohe Anforderung der Chaperone für die Faltung der Igs angleichen, was sich in einer signifikanten Erhöhung der mitochondrialen Schnitte und der Fläche der Mitochondrien in Relation zum Cytoplasma widerspiegelt (Abb. 4.1 D und E). Eine weitere Adaption an die hocheffiziente Synthese von Ig ist die Expansion des ERs während der Differenzierung von B-Zellen (Kirk *et al.*, 2010). Diese Expansion zeigte sich in RPMI 8226

Zellen in der erhöhten Länge der „ER sheets“, sowie die Zunahme der Fläche des ERs in Relation zur Cytoplasmafläche (Abb. 4.1 F und G). Da in RPMI 8226 Zellen deutlich mehr naszierende Polypeptidketten in das ER-Lumen transloziert werden müssen, besitzen diese Zellen wie erwartet mehr ER-membranassoziierte Ribosomen (Abb. 4.1 H). Hierfür wurden nur Ribosomen gezählt, die einen maximalen Abstand von 4 Pixeln zur ER-Membran aufwiesen.

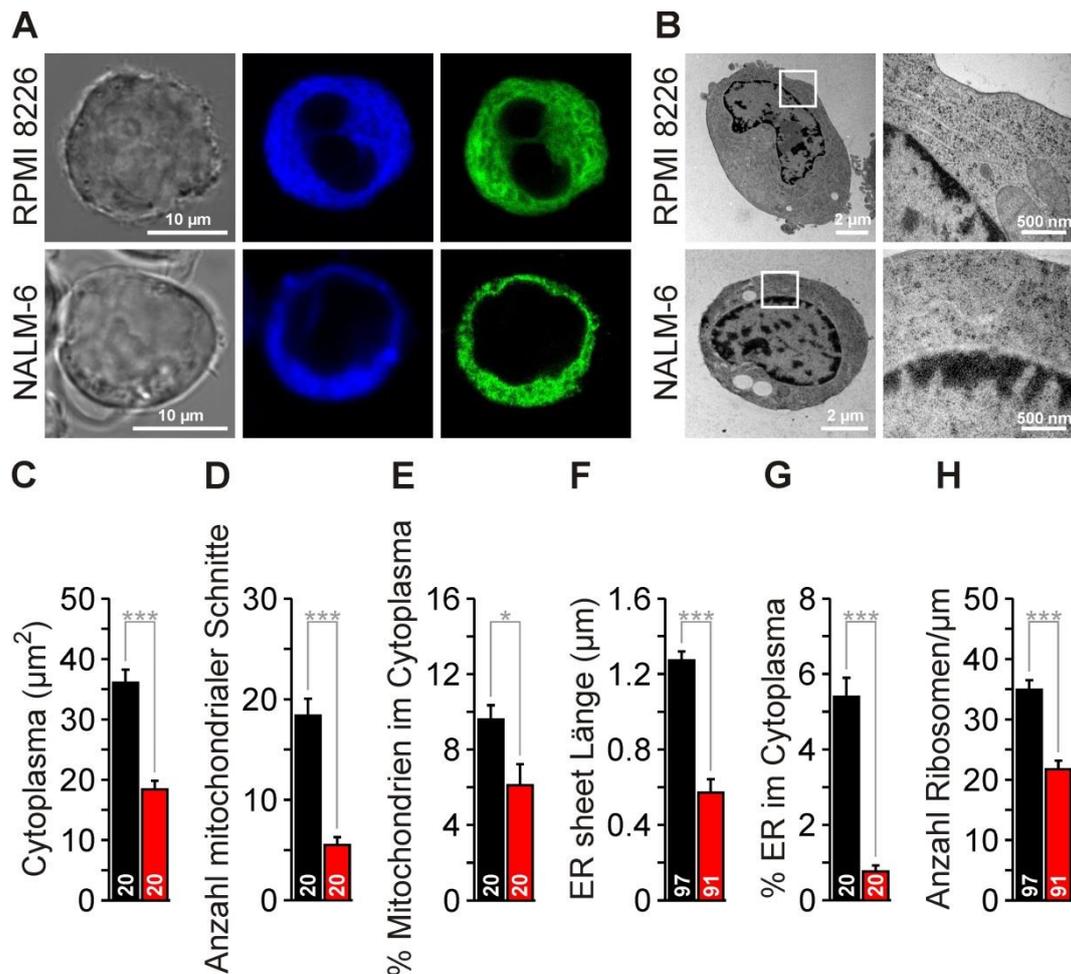


Abbildung 4.1. ER-Morphologie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. (A) Die RPMI 8226 (obere Zeile) und NALM-6 Zellen (untere Zeile) wurden jeweils durch Elektroporation mit 1 μg ER-CFP und 1 μg Sec61 β -GFP transfiziert und 48 h später mittels LSM analysiert. ER-CFP (mittlere Spalte) wird im ER-Lumen und Sec61 β -GFP (rechte Spalte) in der ER-Membran exprimiert. Eine Phasenkontrastaufnahme zur Übersicht der Zellen ist in der linken Spalte dargestellt. (B) Gezeigt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von RPMI 8226 (obere Zeile) und NALM-6 Zellen (untere Zeile). Die weiße Box in den linken Abbildungen zeigt den vergrößerten Ausschnitt, welcher in den rechten Abbildungen illustriert ist. (C-H) Die Graphen zeigen die statistische Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, wobei die Werte der RPMI 8226 in schwarz und die der NALM-6 Zellen in rot dargestellt sind. Die Anzahl der analysierten Zellen bzw. Organellen sind angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz ist angegeben als $p < 0,05^*$ und $p < 0,001^{***}$.

4. Ergebnisse

Abbildung 4.2 zeigt weitere statistische Auswertungen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Neben der Fläche der Zelle und des Nukleus (Abb. 4.2 A und B), die zur Berechnung der Fläche des Cytoplasmas verwendet wurden (Abb. 4.2 C), wurden ebenso die Fläche des ERs (Abb. 4.2 D) und der mitochondrialen Schnitte (Abb. 4.2 G) benötigt, um das Flächenverhältnis zum Cytoplasma in Prozent zu erhalten. Diese Parameter waren signifikant in RPMI 8226 Zellen erhöht. Wie erwartet unterscheiden sich beide Zelllinien nicht signifikant hinsichtlich des Durchmessers der ER sheets (Abb. 4.2 E). Ebenso ist die Fläche pro mitochondrialem Schnitt (Abb. 4.2 F) und die Anzahl der Cristae pro mitochondrialem Schnitt (Abb. 4.2 H) unverändert. Jedoch ist die Anzahl an Cristae pro Zelle und die gesamte Zahl der Cristae aller analysierten RPMI 8226 Zellen im Vergleich zur NALM-6 Zelllinie signifikant erhöht (Abb. 4.2 I und J). Die Daten stimmen damit überein, dass während der Differenzierung von B- zu Plasmazellen das ER eine signifikante Volumenzunahme erfährt und dass aufgrund des hohen Energiebedarfs die Anzahl der Mitochondrien ebenfalls steigt (Kirk *et al.*, 2010).

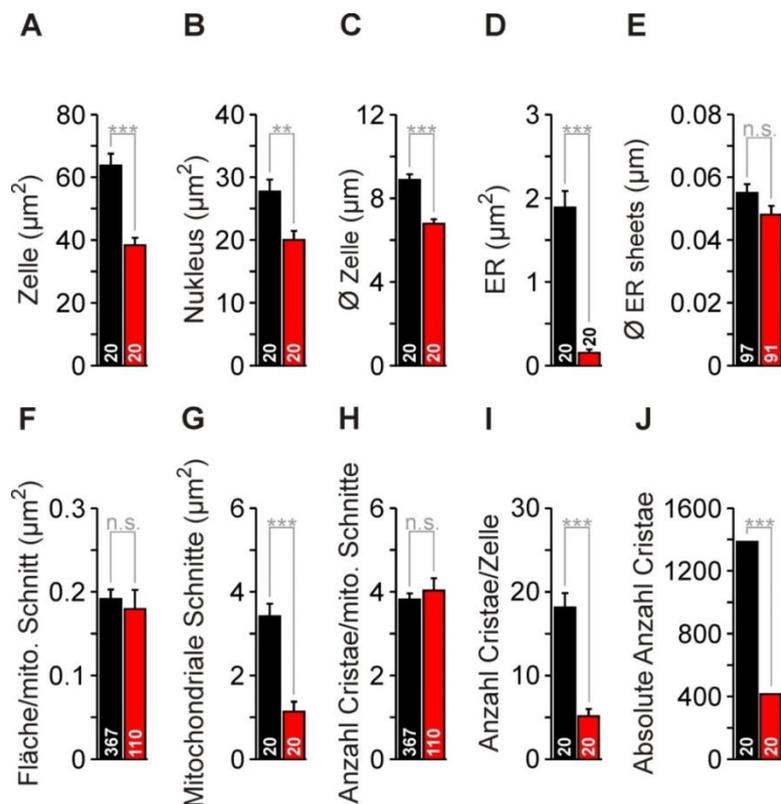


Abbildung 4.2. Zusätzliche statistische Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. (A-J) Gezeigt sind weitere statistische Auswertungen der in Abb. 4.1 B gezeigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Fläche der Zelle (A) und des Nukleus (B) wurden zur Berechnung des Cytoplasmas (Abb. 4.1 C) verwendet. Die Fläche des ERs (D) und die der mitochondrialen Schnitte (G) wurden zur Ermittlung des prozentualen Anteils im Cytoplasma (Abb. 4.1 E und G) verwendet. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Anzahl der analysierten Strukturen ist angegeben und die statistische Signifikanz ist angezeigt als n.s. = nicht signifikant, $p < 0,01$ ** und $p < 0,001$ ***.

Im nächsten Schritt wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen daraufhin untersucht, ob mit der Volumenzunahme des ERs eine Hochregulierung ER-residenter Proteine einhergeht. Um dies zu überprüfen, wurden die entsprechenden Proteine mittels Western-Blot detektiert und mittels Densitometrie miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.2.1). Hierfür wurden jeweils 20 µg, 40 µg und 80 µg Protein der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen auf das Gel aufgetragen (Abb. 4.3). Als Positivkontrolle dienten raue Mikrosomen (RM) und isolierte Mitochondrien aus HEK-293 Zellen (Mito).

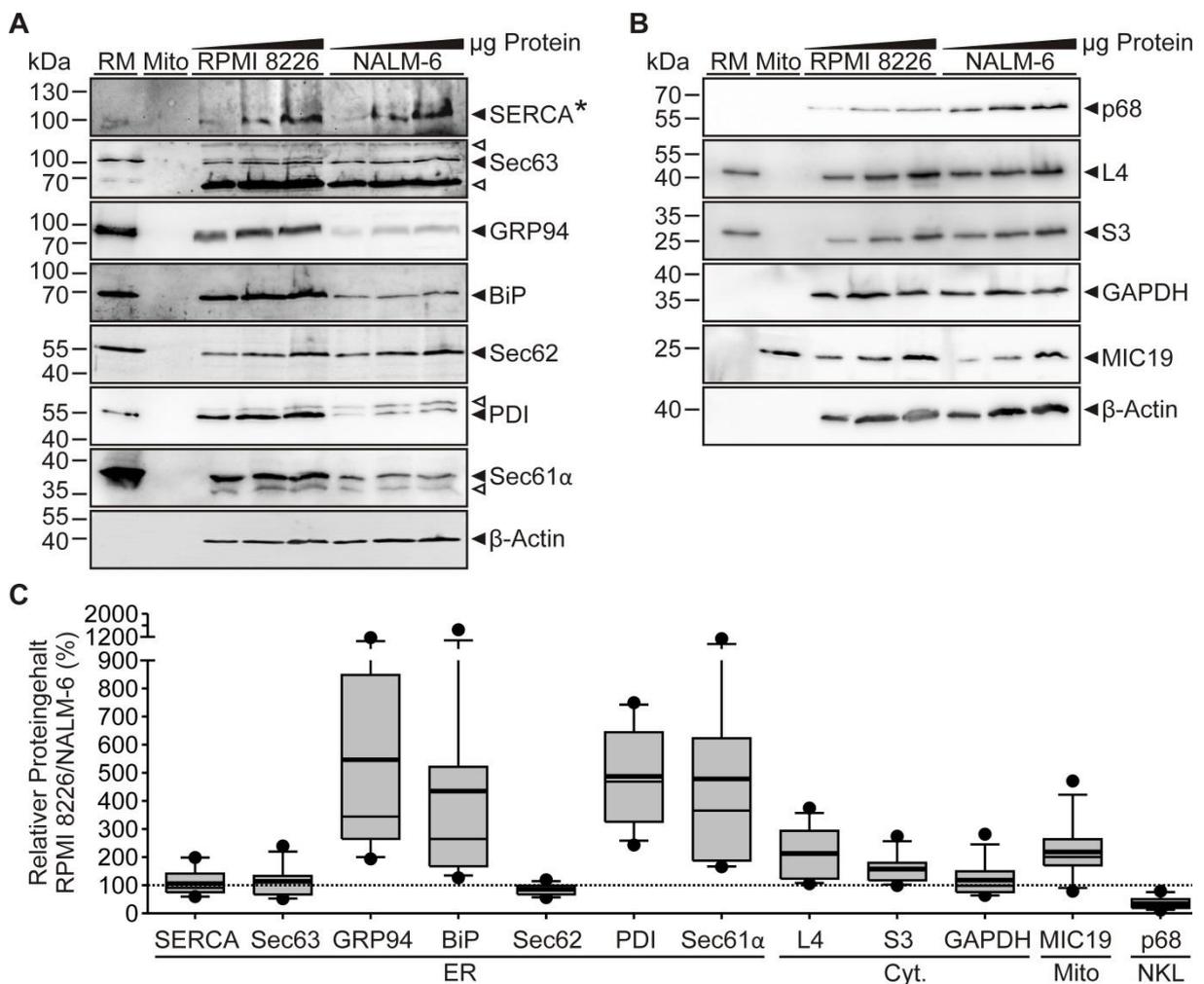


Abbildung 4.3. Bestimmung des Proteingehalts von ER-residenten, mitochondrialen, nukleären und cytosolischen Proteinen in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. (A) Für die SDS-PAGE wurden jeweils 20 µg, 40 µg und 80 µg Protein der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen aufgetragen. Die auf der rechten Seite benannten ER-residenten Proteine wurden mit polyklonalen Antikörpern detektiert und mit β-actin (monoklonaler Antikörper) abgeglichen. Canine raue Mikrosomen (RM) und aus HEK-293 Zellen isolierte Mitochondrien (Mito) dienten als Positivkontrolle. Links sind die entsprechenden Größen der Markerbanden aufgezeigt, um einen Abgleich mit der bekannten Größe des gesuchten Proteins zu ermöglichen. Leere Pfeilspitzen weisen auf unspezifische Banden hin. (B) Gezeigt sind die Proteinbanden von dem nukleären Protein p68, den cytosolischen Proteinen GAPDH, L4 (große ribosomale Untereinheit) und S3 (kleine ribosomale Untereinheit), sowie dem mitochondrialen Strukturprotein MIC19. (C) Der Boxplot repräsentiert die mittels Densitometrie (siehe Kapitel 3.2.1.4) analysierten Daten aus A und B als Verhältnis zwischen RPMI 8226 und NALM-6 in Prozent. Die unteren Punkte geben den minimalen und die oberen den maximalen Wert an. Die dünne schwarze Linie repräsentiert den Median und die dicke schwarze Linie den Mittelwert. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert bei 100 % an (Cyt. – Cytosol, ER- endoplasmatisches Retikulum, Mito – Mitochondrien, NKL – Nukleus).

Wie in Abbildung 4.3 C zu sehen ist, sind viele der ER-residenten Proteine in RPMI 8226 Zellen hochreguliert. So zeigen diese Zellen eine ~5-fache Zunahme des Gehalts von GRP94 ($546 \pm 130 \%$), PDI ($487 \pm 49 \%$) und Sec61 α ($478 \pm 119 \%$), sowie eine ~4-fache Zunahme von BiP ($435 \pm 139 \%$). Interessanterweise war keine Änderung des Gehalts von SERCA ($106 \pm 15 \%$), Sec63 ($113 \pm 15 \%$), sowie Sec62 ($85 \pm 6 \%$) zu beobachten. Zum besseren Vergleich des Proteingehalts in den beiden Zelllinien wurden zudem noch die cytosolischen Proteine GAPDH, L4 (große ribosomale Untereinheit) und S3 (kleine ribosomale Untereinheit), das mitochondriale Strukturprotein MIC19 und das nukleäre Protein p68 untersucht. Hierbei konnte kein Unterschied in dem Proteingehalt von GAPDH ($118 \pm 18 \%$), jedoch eine Erhöhung der ribosomalen Proteine L4 ($213 \pm 25 \%$) und S3 ($157 \pm 15 \%$) in RPMI 8226 Zellen detektiert werden. Der deutlich geringere Proteingehalt an p68 ($34 \pm 6 \%$) resultiert in den nur langsam wachsenden RPMI 8226 Zellen vermutlich daraus, dass p68 wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt (Yang *et al.*, 2007a; Yang *et al.*, 2005). Die Erhöhung des Gehalts von MIC19 ($218 \pm 29 \%$) spiegelt die erhöhte Anzahl an Mitochondrien (Abb. 4.1 D) in den RPMI 8226 Zellen wider.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die RPMI 8226 im Vergleich zu den NALM-6 Zellen eine ~7-fache Zunahme der ER-Fläche und eine ~3-fache Erhöhung der Anzahl der Mitochondrien aufweisen (Abb. 4.1). Diese Zunahme geht mit einer ~5-fachen Erhöhung von GRP94, PDI und Sec61 α , einer ~4-fachen Erhöhung von BiP, sowie einer ~2-fachen Erhöhung von MIC19 einher (Abb. 4.3). Die ausgewählten Zelllinien stellen somit ein geeignetes Modell für Zellen mit viel und wenig ER-Volumen und Sec61 α -Gehalt dar. In den nächsten Versuchen sollte die Ca²⁺-Homöostase der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen charakterisiert und miteinander verglichen werden.

4.2 Charakterisierung der Ca²⁺-Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Die Analyse der Morphologie der beiden Zelllinien zeigte, dass die RPMI 8226 Zellen eine deutliche Zunahme des ER-Volumens und Sec61 α -Gehalts im Vergleich zu NALM-6 Zellen aufweisen. Um zu untersuchen, ob sich mit einer solchen Adaption an eine hohe Proteinsyntheserate die Ca²⁺-Homöostase ebenfalls verändert, wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.6.1 ausplattiert und nach 48 h mit dem ratiometrischen cytosolischen Ca²⁺-Indikator Fura-2 AM beladen und an einem Fluoreszenzmikroskop mit der entsprechenden

Software detektiert. Diese Methode erlaubt aufgrund der niedrigen Affinität von Fura-2 eine effiziente Detektion der Änderung der $[Ca^{2+}]_{cyt}$. In den ersten Versuchen wurde der Ca^{2+} -Efflux des ERs in Anwesenheit von 0,5 mM EGTA (zero $[Ca^{2+}]_{ext}$) mittels dem spezifischen SERCA-Inhibitor TG in einer Konzentration von 1 μM demaskiert, was sich unter diesen Bedingungen in einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ äußert, welcher aus der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER resultiert (Abb. 4.4 A). Hierbei zeigten die RPMI 8226 Zellen einen signifikant höheren Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ($\Delta[Ca^{2+}]_{cyt}$) im Vergleich zu NALM-6 Zellen, welcher jeweils 342 nM und 33 nM betrug (Abb. 4.4 B). Um den Gesamtgehalt des zellulären Ca^{2+} miteinander vergleichen zu können, wurden 10 μM des Ca^{2+} -Ionophors IONO in Anwesenheit von zero $[Ca^{2+}]_{ext}$ verwendet (Abb. 4.4 C). Die RPMI 8226 Zellen wiesen mit 1420 nM eine signifikant höhere Ca^{2+} -Freisetzung als die NALM-6 Zellen (255 nM) auf, was für eine generell höhere totale $[Ca^{2+}]$ in den RPMI 8226 spricht (Abb. 4.4 D).

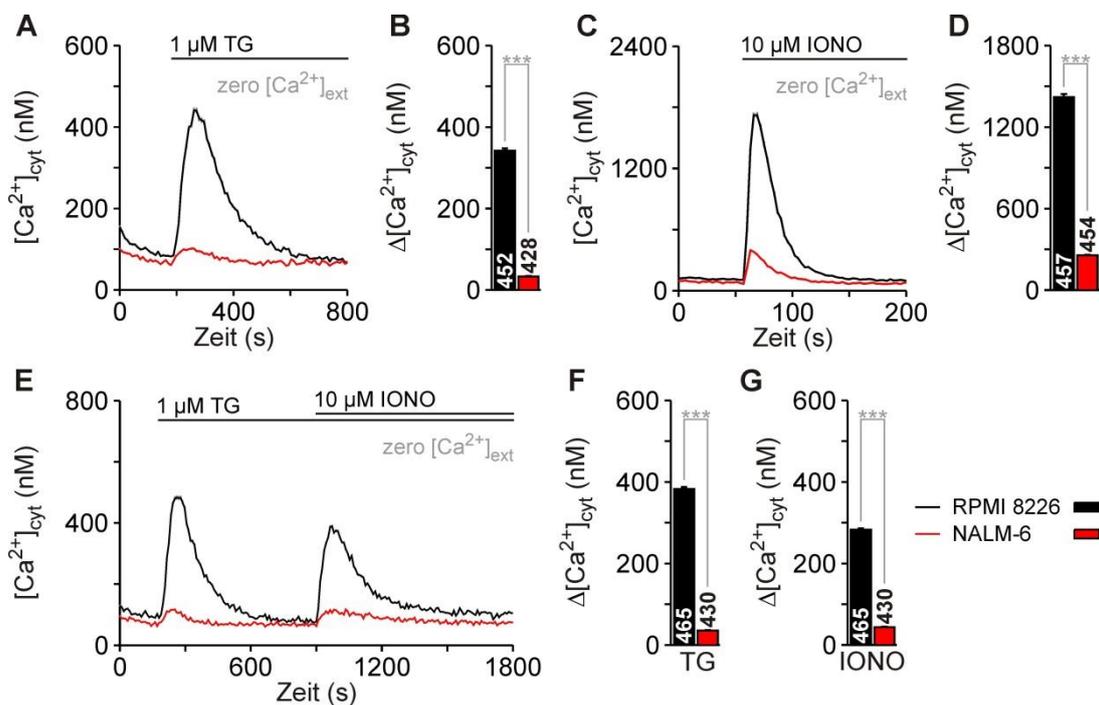


Abbildung 4.4. Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 beladen. (A) Um den Ca^{2+} -Efflux des ERs zu demaskieren, wurde 1 μM Thapsigargin (TG) 3 min nach Start des Experiments in Anwesenheit von 0,5 mM EGTA (zero $[Ca^{2+}]_{ext}$) hinzugegeben und für weitere 12 min gemessen. (B) Der Graph zeigt die statistische Auswertung des in A gezeigten $[Ca^{2+}]_{cyt}$ Anstiegs. (C) Mit Hilfe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin (IONO) in einer Konzentration von 10 μM wurde der gesamte Ca^{2+} -Gehalt der Zellen in Anwesenheit von zero $[Ca^{2+}]_{ext}$ gemessen. (D) Der Graph zeigt die statistische Auswertung des in C gemessenen Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{cyt}$. (E) Die Hauptcalciumspeicher, ER und Mitochondrien, wurden durch Zugabe von 1 μM TG nach 3 min und nach weiteren 12 min durch Applikation von 10 μM IONO getrennt voneinander detektiert. (F-G) Statistische Auswertung des Anstiegs nach Applikation von TG und IONO der in E gezeigten Graphen. Anzahl der analysierten Zellen von 6 unabhängigen Experimenten ist angegeben und die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M angegeben. Die statistische Signifikanz ist angegeben als $p < 0,001$ ***.

4. Ergebnisse

Da bisher der Ca^{2+} -Efflux aus dem ER alleine (Abb. 4.4 A) und aller Ca^{2+} -Speicher (Abb. 4.4 C) gemessen wurde, wurden im nächsten Experiment zum einen der Hauptcalciumspeicher und zum anderen der transiente Calciumspeicher der Zelle, nämlich das ER und die Mitochondrien, separat voneinander detektiert (Xu *et al.*, 2016; Kaufman und Malhotra, 2014; Walsh *et al.*, 2009; Medvedeva *et al.*, 2008; Nicholls und Chalmers, 2004; Malli *et al.*, 2003; Koch, 1990). Hierfür wurde wieder in Anwesenheit von zero $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ 1 μM TG hinzugegeben, um den Ca^{2+} -Efflux zu demaskieren, welcher wieder signifikant in RPMI 8226 Zellen erhöht war (Abb. 4.4 E und F). Nach insgesamt 15 min wurde 10 μM IONO appliziert, was zu einer Permeabilisierung aller Membranen führt, wodurch der damit einhergehende Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ aus der Ca^{2+} -Freisetzung von TG-insensitiven Ca^{2+} -Speichern resultiert. Diese Ca^{2+} -Mobilisierung nach IONO-Zugabe spiegelt vermutlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien wider (siehe Kapitel 3.2.6.1). Hierbei zeigten die RPMI 8226 Zellen einen signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ auf 283 nM im Vergleich zu NALM-6 Zellen (44 nM).

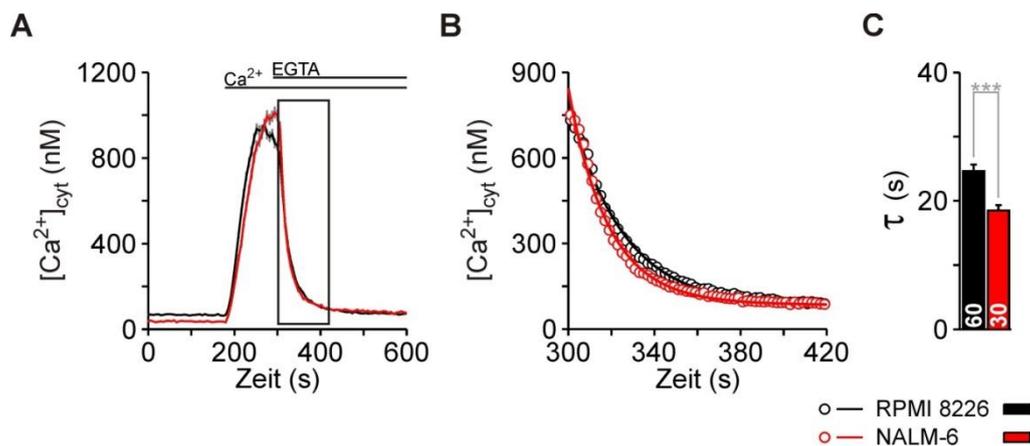


Abbildung 4.5. „ Ca^{2+} -Clearance“ in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 beladen. (A) Nach der Speicherentleerung durch 1 μM TG für 15 min (nicht abgebildet) wurde die Messung gestartet. Nach 3 min wurden zu den RPMI 8226 1 mM Ca^{2+} und zu den NALM-6 Zellen 10 mM Ca^{2+} hinzugegeben, damit die Geschwindigkeit ausgehend von einer gleichen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ detektiert werden konnte. Nach weiteren 2 min wurde jeweils 7 mM oder 25 mM EGTA zu den RPMI 8226 und NALM-6 appliziert, wobei der damit einhergehende Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ den Ca^{2+} -Transport aus dem Cytosol repräsentiert. (B) Gezeigt ist der Ausschnitt aus der in A gezeigten schwarzen Box, welche den Zeitraum 300-420 Sekunden der Messung markiert. Um die Geschwindigkeiten direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte auf den höchsten Wert normiert. (C) Statistische Auswertung durch exponentielle Anpassung der in B gezeigten Graphen. Die Anzahl analysierter Zellen von einem Experiment ist angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Die statistische Signifikanz ist mit $p < 0,001$ *** angezeigt.

Aufgrund der Bedeutsamkeit von Ca^{2+} für viele Signalwege innerhalb der Zelle (siehe Kapitel 2.6), spielt neben dem Ca^{2+} -Efflux aus dem ER die Geschwindigkeit, mit der Ca^{2+} durch die PMCA oder NCX aus dem Cytosol transportiert wird (= „ Ca^{2+} -Clearance“), eine weitere

wichtige Rolle. Um die „Ca²⁺-Clearance“ in den beiden Zelllinien zu untersuchen wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit 1 μM TG für 15 min behandelt, um das ER zu entleeren, jedoch ohne die Kinetik zu detektieren. Wird nun extrazelluläres Ca²⁺ hinzugegeben, erfolgt ein Ca²⁺-Einstrom in das Cytosol, welcher aus der Aktivierung des SOCE hervorgeht (siehe Kapitel 2.6.4). Nachdem die Messung gestartet wurde, wurde nach 3 min 1 mM Ca²⁺ zu den RPMI 8226 und 10 mM Ca²⁺ zu NALM-6 Zellen hinzugegeben, damit die [Ca²⁺]_{cyt} annähernd das gleiche Niveau erreicht (Abb. 4.5 A). Nach weiteren 2 min wurden zu den RPMI 8226 Zellen 7 mM EGTA und zu den NALM-6 Zellen 25 mM EGTA hinzugegeben, um extrazelluläres Ca²⁺ zu chelatieren und somit die Geschwindigkeit des Ca²⁺-Transports aus dem Cytosol bei gleicher initialen [Ca²⁺]_{cyt} detektieren zu können. Zur weiteren Analyse wurden nur Zellen ausgewählt, die annähernd den gleichen Wert des maximalen Anstiegs der [Ca²⁺]_{cyt} aufwiesen, woraus sich der Mittelwert 742 nM für RPMI 8226 und 757 nM für NALM-6 Zellen ergab. Davon ausgehend wurden die Werte in dem Zeitraum von 300-420 Sekunden auf den höchsten Wert normiert, um die Geschwindigkeiten direkt miteinander vergleichen zu können (Abb. 4.5 B). Auch wenn die statistische Auswertung eine Signifikanz angibt (Abb. 4.5 C), so lässt sich nach Betrachten der Graphen in Abbildung 4.5 B annehmen, dass in der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Transports aus dem Cytosol zwischen RPMI 8226 und NALM-6 Zellen kein Unterschied besteht. Diese Annahme wurde weiter durch die Ermittlung der Efflux-Rate für Ca²⁺ (reziproker τ -Wert) untermauert. Daraus ergab sich für die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen jeweils eine Ca²⁺-Efflux-Rate von $0,041 \cdot \text{s}^{-1}$ und $0,054 \cdot \text{s}^{-1}$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen einen ~10-fach stärkeren Ca²⁺-Efflux aufweisen und einen ~6-fach größeren Ca²⁺-Gehalt besitzen (Abb. 4.4), was beides mit einem ~7-fachen ER-Volumen und ~5-fachen Sec61 α -Gehalt der RPMI 8226 Zellen einhergeht (Abb. 4.1). Jedoch geht diese stärkere Ca²⁺-Mobilisierung nicht mit einer schnelleren „Ca²⁺-Clearance“ einher (Abb. 4.5).

4.2.1 Analyse des “store operated calcium entry” (SOCE) in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Der SOCE ist zum Wiederauffüllen des Ca²⁺-Speichers essentiell und trägt somit wesentlich zur Aufrechterhaltung der zellulären Ca²⁺-Homöostase bei (Niemeyer, 2016; Pathak *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2014; Fodor *et al.*, 2013). Für die Charakterisierung des SOCE wurden die Zellen 48 h nach Ausplattieren mit Fura-2 AM beladen (siehe Kapitel 3.2.6.1) und es

4. Ergebnisse

wurde zunächst in Anwesenheit von 1 mM oder 10 mM extrazellulärem Ca^{2+} (1 mM/10 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) 1 μM TG hinzugegeben (Abb. 4.6 A). Unter diesen Bedingungen resultiert der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ aus dem additiven Effekt des Ca^{2+} -Effluxes aus dem ER und dem extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol. Wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ um das 10-fache erhöht, konnte ein Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von 153 nM auf 219 nM in RPMI 8226 und von 101 nM auf 196 nM in NALM-6 Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig erhöhte sich die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nach Zugabe von TG von 590 nM (1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) auf 853 nM (10 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) in RPMI 8226 Zellen und von 33 nM (1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) auf 66 nM (10 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) in NALM-6 Zellen (Abb. 4.6 B). Somit bleibt der signifikante Unterschied des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, wie schon in Abbildung 4.4 gezeigt, auch unter diesen Konditionen zwischen den RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bestehen. Da aber eine 10-fache Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen lediglich jeweils eine ~1,4- bzw. 2-fache Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nach Zugabe von TG bewirkte, liegt es nahe, dass mit diesen verwendeten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ das Cytosol mit Ca^{2+} nahezu gesättigt zu sein scheint. Um den Ca^{2+} -Efflux aus dem ER und den Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran in das Cytosol separat zu detektieren, wurde zunächst in Anwesenheit von nominal freier Ca^{2+} -Lösung (nom. frei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) 1 μM TG appliziert, um das ER im Hinblick auf Ca^{2+} zu entleeren, um somit den SOCE zu aktivieren. Auch hier konnte ein deutlich erhöhter Ca^{2+} -Efflux in den RPMI 8226 Zellen detektiert werden (Abb. 4.6 C). Nach insgesamt 15 min wurde dann entweder 1 mM oder 10 mM Ca^{2+} hinzugegeben, was zu einem deutlichen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ führte. Eine 10-fache Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ bewirkte einen weiteren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von 1487 nM auf 3339 nM in RPMI 8226 und von 203 nM auf 884 nM in NALM-6 Zellen (Abb. 4.6 D).

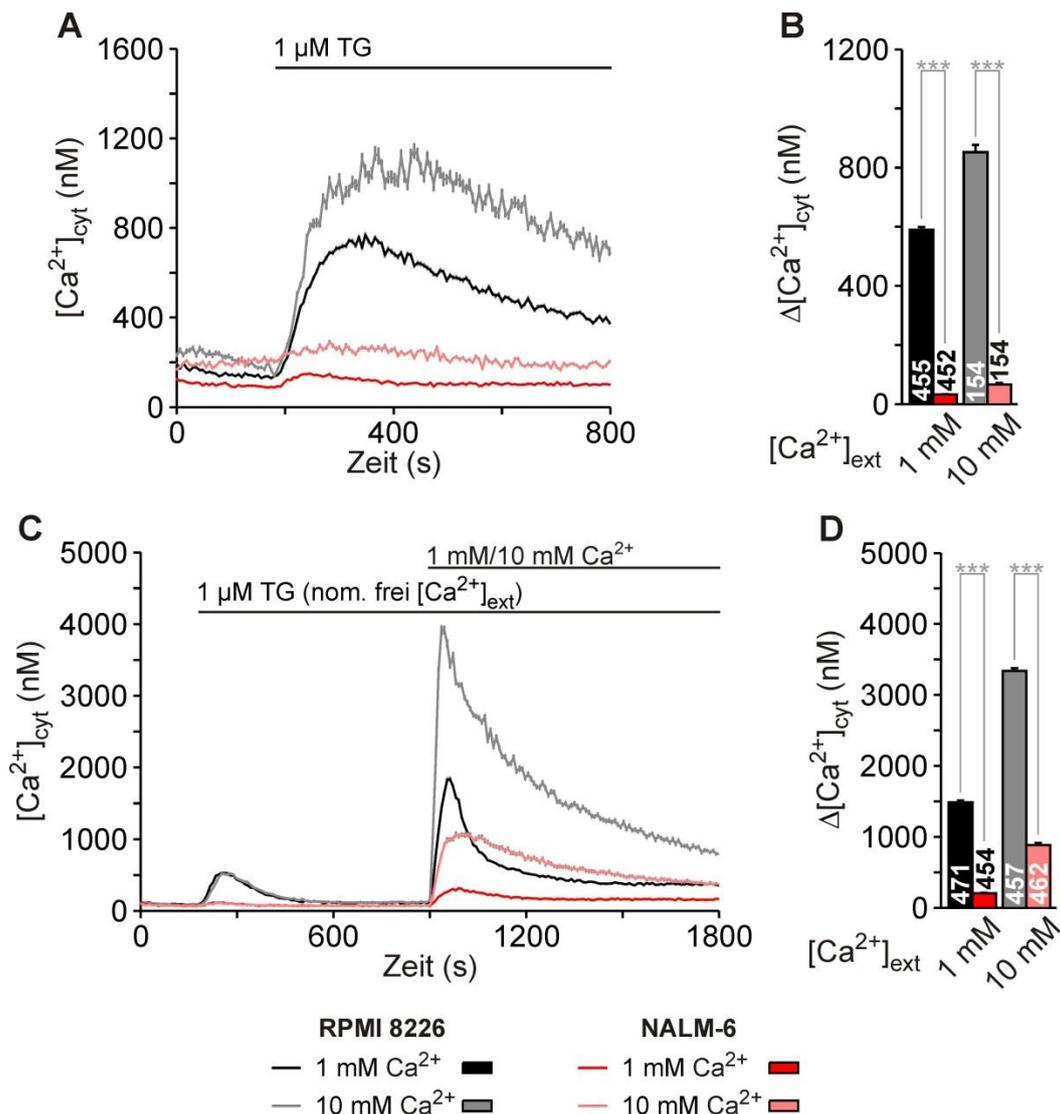


Abbildung 4.6. SOCE in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μ M und 8 μ M Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 beladen. (A) Der Ca^{2+} -Efflux aus dem ER wurde durch Zugabe von 1 μ M TG in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen in Anwesenheit von 1 mM oder 10 mM extrazellulärem Ca^{2+} demaskiert. (B) Statistische Auswertung des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der in A gezeigten Graphen. (C) Die $[Ca^{2+}]_{ER}$ wurde durch die Zugabe von 1 μ M TG in Anwesenheit von nominal freier Ca^{2+} -Lösung (nom. frei $[Ca^{2+}]_{ext}$) stark verringert. Nach insgesamt 15 min wurde entweder 1 mM oder 10 mM extrazelluläres Ca^{2+} hinzugegeben, um den SOCE zu detektieren. (D) Statistische Auswertung des durch in C gezeigten SOCE-induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Die Anzahl der analysierten Zellen ist von 2 oder 6 unabhängigen Experimenten angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. und die statistische Signifikanz als $p < 0,001$ *** dargestellt.

Aufgrund des ~7-fach stärkeren SOCE (1 mM $[Ca^{2+}]_{ext}$) in RPMI 8226 Zellen wurde als nächstes überprüft, ob diese Erhöhung mit einem gesteigerten Gehalt von Orai- und STIM-Proteinen einhergeht. Da keine Antikörper gegen die SOCE-verantwortlichen Proteine für eine Western-Blot-Analyse vorhanden waren, wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt, um den mRNA Gehalt von Orai1, Orai2, Orai3, STIM1 und STIM2 in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zu bestimmen (Abb. 4.7), um somit die Validität des erhöhten SOCE in RPMI 8226 zu untermauern.

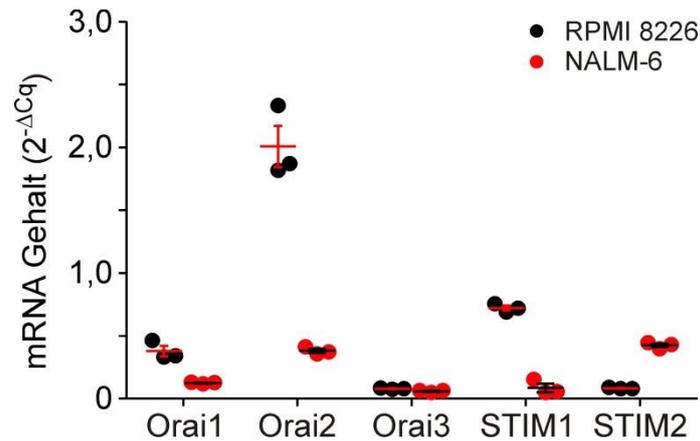


Abbildung 4.7. Quantitative real-time PCR von Orai und STIM mRNA aus RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Gezeigt sind die durch quantitative real-time (qRT)-PCR gemessene $2^{-\Delta Cq}$ -Werte des mRNA Gehalts von Orai1, Orai2, Orai3, STIM1 und STIM2, welche auf das TATA box-bindendes Protein (TBP) normalisiert wurden. Die Messungen wurden in Duplikaten gemessen, wovon jeder einzelne Punkt den Mittelwert darstellt. Zusätzlich ist der Mittelwert \pm S.E.M. von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die qRT-PCR wurde freundlicherweise von Gertrud Schwär (AG Prof. Dr. Barbara Niemeyer, Zentrum für integrative Physiologie und molekulare Medizin, CIPMM, Universität des Saarlandes) durchgeführt.

Da in Mastzellen Orai2 eine wichtige Rolle in der Ca^{2+} -gesteuerten Exozytose und Degranulation spielt (Tsvilovskyy *et al.*, 2018; Ikeya *et al.*, 2014), liegt es nahe, dass der hohe Orai2 mRNA Gehalt in RPMI 8226 Zellen aus der stetigen Sezernierung der synthetisierten Ig resultiert. Jedoch ist ebenfalls der mRNA Gehalt der Hauptakteure des SOCE, nämlich Orai1 und STIM1 (Bhardwaj *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2016; Ong *et al.*, 2007a), in den RPMI 8226 Zellen höher, was mit dem stärkeren SOCE korreliert. Ein erhöhter STIM2 mRNA-Gehalt wurde in NALM-6 Zellen detektiert, was vermutlich für eine verbesserte Kontrolle der $[Ca^{2+}]_{ER}$ spricht. Allerdings war kein Unterschied des Orai3 mRNA-Gehaltes zu beobachten.

Zusammengefasst weisen die RPMI 8226 im Vergleich zu den NALM-6 Zellen nicht nur einen ~10-fach höheren Ca^{2+} -Efflux aus dem ER auf (Abb. 4.4 B), sondern auch einen ~7-fach stärkeren SOCE (Abb. 4.6 D), was darauf schließen lässt, dass die RPMI 8226 Zellen vor allem für die Herausforderung der hocheffizienten Ig-Synthese nicht alleine eine erhöhte ER-Funktionalität benötigen, sondern unter diesem Aspekt gleichzeitig die Ca^{2+} -Homöostase eine ebenso wichtige Rolle zu spielen scheint.

4.3 Modulierung des Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Efflux durch die Translationsinhibitoren Cycloheximid und Emetin

Bisher wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie und Ca²⁺-Homöostase untersucht. Hierbei zeigten die RPMI 8226 eine deutlich höhere ER-Fläche (Abb. 4.1 G), einen größeren Ca²⁺-Efflux aus dem ER (Abb. 4.4 A), sowie einen stärkeren SOCE (Abb. 4.6 C). Es konnte bereits gezeigt werden, dass 60 % des Ca²⁺-Efflux in HeLa Zellen dem Sec61 α -Kanal zuzuschreiben sind (Lang *et al.*, 2011). Da die RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen einen höheren Sec61 α - und ribosomalen Proteingehalt aufweisen (Abb. 4.3 C), sollte im nächsten Schritt der Sec61 α -vermittelte Ca²⁺-Efflux durch entsprechende Modulation untersucht werden. Hierfür wurde zunächst der Ca²⁺-Efflux pharmakologisch durch Verwendung der translationalen Inhibitoren Cycloheximid (CHX, reversibel) und Emetin (EME, irreversibel) verringert. Die Grundlage hierfür ist, dass die Inhibitoren an die E-Stelle der großen Untereinheit des Ribosoms binden und somit die Funktion der t-RNA verhindert wird, was zum Stopp der Elongation der Polypeptidkette führt (Myasnikov *et al.*, 2016; Garreau de Loubresse *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2014). Dadurch wird die Polypeptidkette im Sec61 α -Kanal arretiert, wodurch der Ca²⁺-Efflux letztlich limitiert werden soll (Lang *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2007b). Zuerst wurden die Zellen 48 h nach Ausplattieren jeweils zusammen mit Fura-2 AM für 5 min mit 0,1 % DMSO (-CHX) oder CHX in den Konzentrationen 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M oder 1000 μ M bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch die Zugabe von 1 μ M TG 3 min nach Start der Messung in Anwesenheit von zero [Ca²⁺]_{ext}, konnte in RPMI 8226 Zellen ein konzentrationsabhängiger Rückgang des Ca²⁺-Efflux von 255 nM (Kontrolle) auf 185 nM (1000 μ M CHX) detektiert werden (Abb. 4.8 A). Der Ca²⁺-Efflux in NALM-6 Zellen blieb dagegen unverändert (Kontrolle: 36 nM, 1000 μ M CHX: 40 nM).

4. Ergebnisse

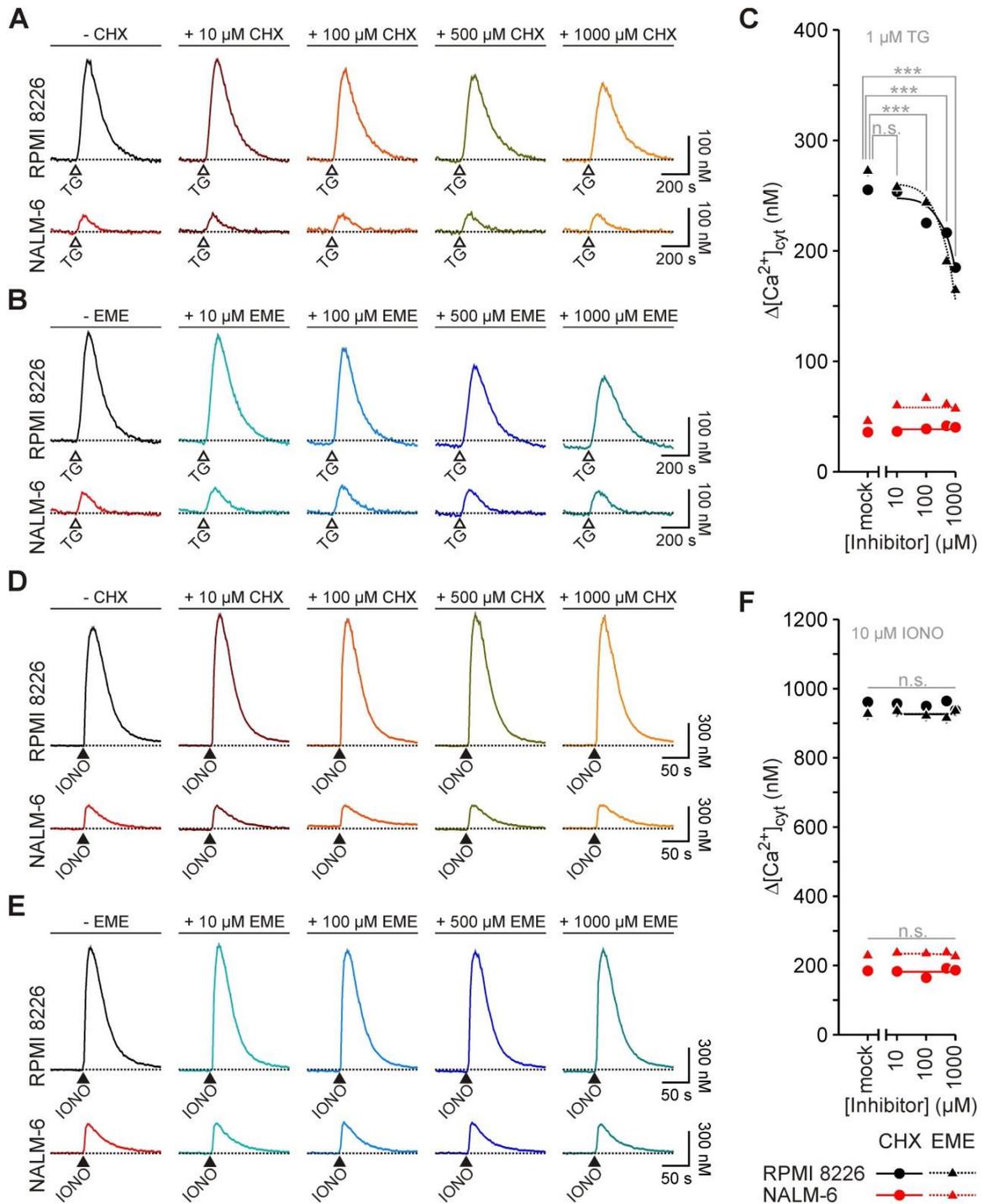


Abbildung 4.8. Modulation des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Efflux mit Hilfe der Translationsinhibitoren Cycloheximid oder Emetin in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 beladen. Gleichzeitig wurden zuvor entweder 0,1 % DMSO (-CHX, -EME) oder die entsprechenden Konzentrationen der Translationsinhibitoren Cycloheximid (CHX) oder Emetin (EME) zu den Zellen hinzugegeben. (A, B) 1 μM TG (leerer Pfeilkopf) wurde 3 min nach Start des Experimentes zu den RPMI 8226 (oberer Graph) und zu NALM-6 Zellen (unterer Graph) hinzugegeben. (C) Statistische Auswertung der in A und B gezeigten Graphen. Die entsprechende Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ der RPMI 8226 (schwarz) und der NALM-6 Zellen (rot) mit CHX sind in Kreisen und mit EME als Dreiecke dargestellt. (D, E) 10 μM IONO (ausgefüllter Pfeilkopf) wurde eine Minute nach Start des Experimentes zu den RPMI 8226 (oberer Graph) und zu NALM-6 Zellen (unterer Graph) hinzugegeben. (F) Statistische Auswertung der in D und E gezeigten Graphen. Die entsprechende Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ der RPMI 8226 (schwarz) und der NALM-6 Zellen (rot) mit CHX sind in Kreisen und mit EME als Dreiecke dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ der Kontrolle vor TG- bzw. IONO-Zugabe dar. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt ($n = 354\text{-}428$). Die statistische Signifikanz ist als n.s. = nicht signifikant und $p < 0,001$ *** angegeben.

Die Zellen wurden im nächsten Experiment unter den gleichen Konditionen mit dem irreversiblen Inhibitor EME inkubiert, welcher in RPMI 8226 Zellen eine ausgeprägtere Veränderung des Ca^{2+} -Effluxes im Vergleich zu CHX zeigte (Abb. 4.8 B). Hierbei wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme des TG-induzierten Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von 272 nM (Kontrolle) auf 164 nM (1000 μM EME) detektiert. In NALM-6 Zellen blieb der Ca^{2+} -Efflux wieder unverändert (Kontrolle: 46 nM, 1000 μM EME: 57 nM). Jedoch konnte erst eine signifikante Veränderung des Ca^{2+} -Effluxes in RPMI 8226 Zellen ab einer Konzentration von 100 μM der Inhibitoren (CHX: 225 nM, EME: 244 nM) beobachtet werden (Abb. 4.8 C). In NALM-6 Zellen konnte keine verwendete Konzentration der beiden Inhibitoren eine signifikante Veränderung hervorrufen.

Um zu überprüfen, ob der Inhibitor-induzierte verringerte Ca^{2+} -Efflux in RPMI 8226 Zellen tatsächlich durch den Verschluss von $\text{Sec61}\alpha$ -Kanälen zurückzuführen ist und nicht durch eine globale Veränderung des Ca^{2+} -Gehalts, wurden die Zellen wie schon zuvor mit den Inhibitoren behandelt. Anstatt TG wurde hier jedoch IONO zur Messung des gesamten Ca^{2+} in der Zelle verwendet. Falls die Inhibitoren keine Veränderung des Ca^{2+} -Gehaltes in den Zellen verursacht, liegt es nahe, dass der veränderte Ca^{2+} -Efflux tatsächlich aus dem Verschluss von $\text{Sec61}\alpha$ -Untereinheiten resultiert. Wie in Abbildung 4.8 D und E zu sehen ist, blieb der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ bei ~ 940 nM für RPMI 8226 und ~ 210 nM für NALM-6 Zellen nahezu gleich.

Da keine signifikante Veränderung der IONO-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung festgestellt werden konnte (Abb. 4.8 F), kann der $\text{Sec61}\alpha$ -vermittelte Ca^{2+} -Efflux sehr wahrscheinlich mittels den Translationsinhibitoren CHX und EME inhibiert werden. Die RPMI 8226 Zellen weisen im Vergleich zu NALM-6 Zellen hierbei eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Inhibitoren auf, was mit dem erhöhten $\text{Sec61}\alpha$ -Gehalt, der gesteigerten Translokation und dem größeren Ca^{2+} -Efflux korreliert. Da der Effekt von EME im Vergleich zu CHX stärker war, wurde EME für darauffolgende Experimente ausgewählt.

4.4 Effekt von Faltungsantagonisten und CaM-Inhibitoren auf den Ca²⁺-Efflux in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Es konnte schon zuvor gezeigt werden, dass in HeLa Zellen eine 3-minütige Behandlung mit dem Inhibitor der N-Glykosylierung Tunicamycin (TUNI) oder dem Detergens Dithiothreitol (DTT) einen signifikanten Sec61 α -abhängigen Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} zur Folge hat (Schäuble *et al.*, 2012). Die zugrunde liegende Idee besteht darin, dass durch diese Behandlung fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen akkumulieren, woraufhin BiP in der Funktion als Chaperon versucht diese zu binden und im Zuge dessen von Sec61 α dissoziiert, wodurch mehr Sec61-Kanäle für Ca²⁺ permeabel werden. Da die RPMI 8226 Zellen einen deutlichen Rückgang der [Ca²⁺]_{cyt} nach Behandlung mit EME aufwiesen (Abb. 4.8 B), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob eine erhöhte Anzahl offener Sec61 α -Kanäle mit einem erhöhten Ca²⁺-Efflux korreliert und ob selbiger durch den Translationsinhibitor EME wieder limitiert werden kann. Hierfür wurden die Zellen 48 h nach Ausplattieren zunächst mit Fura-2 AM beladen (siehe Kapitel 3.2.6.1) und nach einer 3-minütigen Inkubation mit 10 μ g/ml TUNI oder 1 mM DTT wurde der Ca²⁺-Efflux durch 1 μ M TG demaskiert (Abb. 4.9 A und C). In RPMI 8226 Zellen konnte ein signifikanter Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} detektiert werden (Kontrolle: 222 nM, TUNI: 299 nM, DTT: 288 nM), wohingegen dieser Effekt in NALM-6 Zellen nicht zu beobachten war (Kontrolle: 37 nM, TUNI: 38 nM, DTT: 41 nM) (Abb. 4.9 B und D). Um zu untersuchen, ob dieser erhöhte Ca²⁺-Efflux auch in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen Sec61 α -vermittelt ist, wurden die Zellen vor der Messung zusammen mit Fura-2 AM mit 100 μ M oder 1000 μ M EME für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (prä-Inkubation). In RPMI 8226 Zellen konnte, wie schon in Abbildung 4.8 C gezeigt, ein Rückgang des Anstiegs der [Ca²⁺]_{cyt} auf 189 nM nach prä-Inkubation mit 100 μ M EME beobachtet werden (Abb. 4.9 A und B). Diese Konzentration reichte schon aus, um den Effekt von TUNI und DTT zu verhindern (100 μ M EME + TUNI: 218 nM, 100 μ M EME + DTT: 220 nM). Nach prä-Inkubation mit 1000 μ M EME konnte ein weiterer Rückgang des Ca²⁺-Efflux, was in einem kleineren Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} resultierte (150 nM), in RPMI 8226 Zellen detektiert werden. Auch mit dieser Konzentration stieg die [Ca²⁺]_{cyt} nicht signifikant auf nur noch 175 nM in Kombination mit TUNI oder DTT an. Der Ca²⁺-Efflux in NALM-6 Zellen blieb mit einer Zunahme der [Ca²⁺]_{cyt} von 33-45 nM unabhängig von den verwendeten Inkubationsbedingungen unverändert.

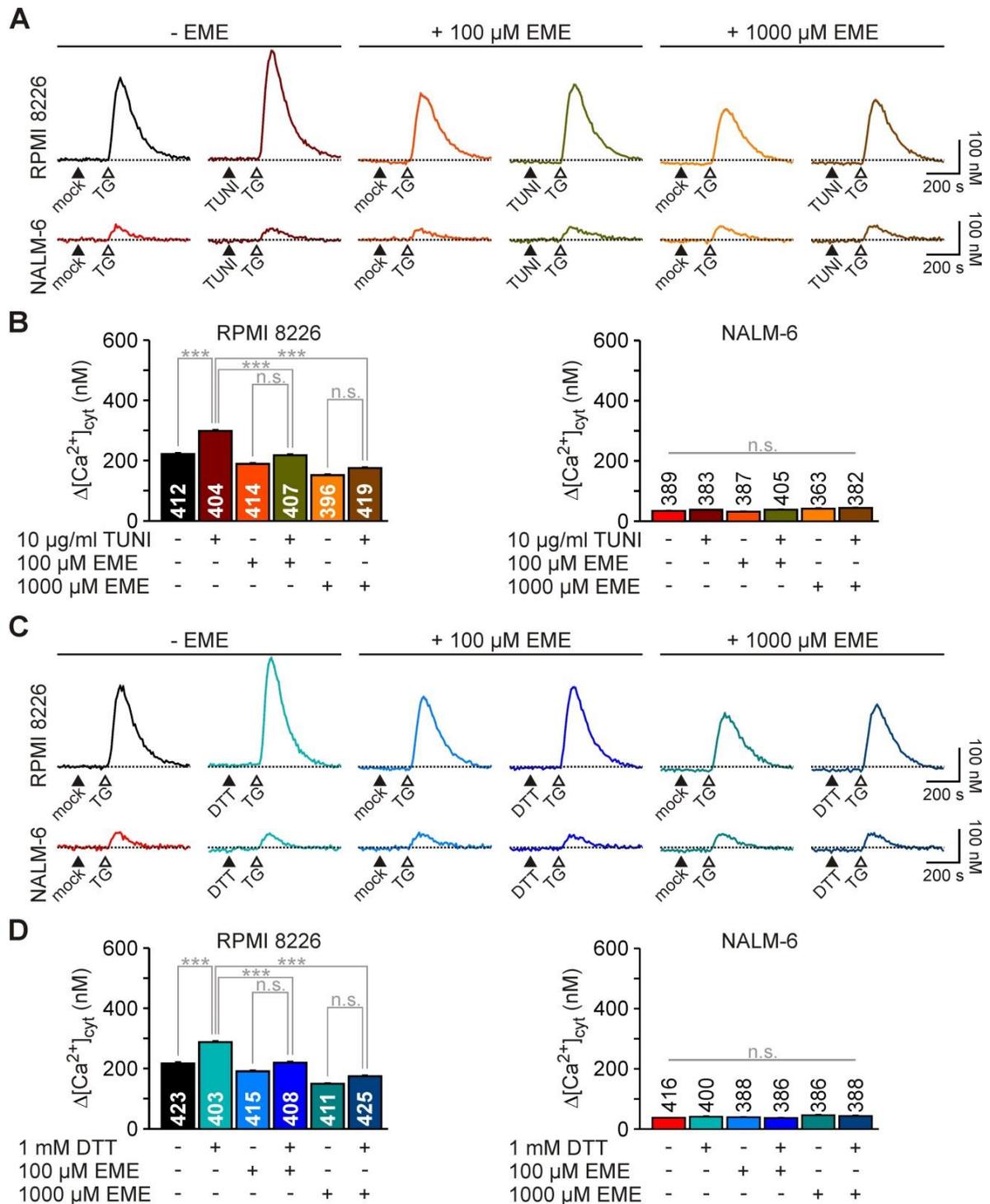


Abbildung 4.9. Effekt von Faltungsantagonisten auf den Ca^{2+} -Efflux in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Vorbehandlung mit EME. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μ M und 8 μ M Fura-2 AM für 5 min bei 37 $^{\circ}$ C und 5 % CO_2 beladen. (A) RPMI 8226 (obere Graphen) und NALM-6 Zellen (untere Graphen) wurden entweder mit 0,1 % DMSO (-EME) oder mit 100 μ M (+100 μ M EME) oder 1000 μ M EME (+1000 μ M EME) für 5 min bei 37 $^{\circ}$ C und 5 % CO_2 prä-inkubiert. Zwei Minuten nach Start des Experimentes wurde zu den Zellen entweder mit 0,2 % DMSO (mock) oder 10 μ g/ml TUNI hinzugegeben (gefüllte Pfeilspitze). Nach weiteren 3 min wurde der Ca^{2+} -Efflux durch Zugabe von 1 μ M TG demaskiert (leere Pfeilspitze). Die gestrichelte Linie stellt die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ der Kontrolle vor TG-Zugabe dar. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). (C) Der Aufbau des Experimentes und die Behandlung der Zellen entspricht der in A, mit der Ausnahme, dass 1 mM DTT anstelle von TUNI verwendet wurde. (D) Dargestellt ist die statistische Auswertung der in C gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). Die Anzahl der analysierten Zellen ist angegeben und die Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz ist dargestellt als n.s. = nicht signifikant und $p < 0,001$ ***.

4. Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob der veränderte Ca^{2+} -Efflux auf eine totale Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ zurückzuführen ist, wurden die Zellen wie oben beschrieben mit den Faltungsantagonisten TUNI und DTT behandelt. Anstelle von TG wurde jetzt allerdings $10 \mu\text{M}$ IONO verwendet, um die Gesamtkonzentration an Ca^{2+} in der Zelle zu bestimmen (Abb. 4.10 A). Wie in Abbildung 4.10 B zu sehen ist, liegt der Ca^{2+} -Gehalt in RPMI 8226 Zellen bei $780\text{-}790 \text{ nM}$ und in NALM-6 Zellen bei $150\text{-}160 \text{ nM}$. Somit bleibt die totale $[\text{Ca}^{2+}]$ in den Zellen während der Inkubation mit TUNI oder DTT unverändert.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass RPMI 8226 Zellen sensitiver auf die Faltungsantagonisten TUNI und DTT hinsichtlich des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Efflux reagieren und dass diese den globalen Ca^{2+} -Gehalt nicht verändern. Außerdem kann dieser Effekt durch den irreversiblen Translationsinhibitor EME verhindert werden.

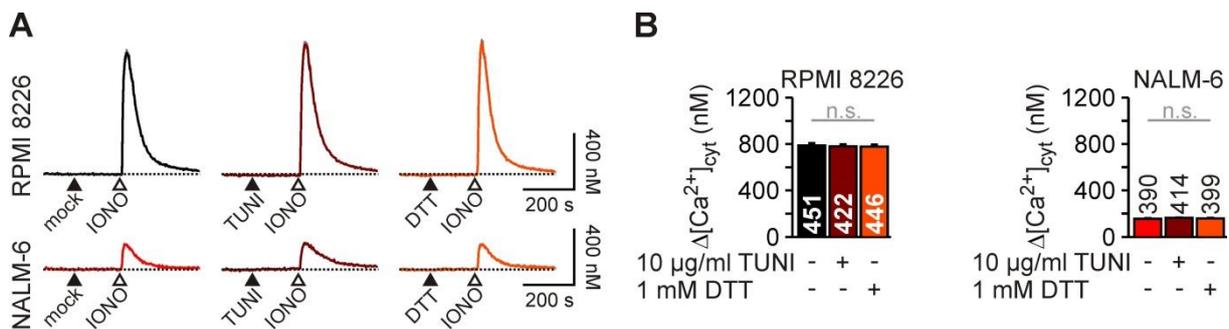


Abbildung 4.10. Effekt von Faltungsantagonisten auf den Ca^{2+} -Gehalt in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils $4 \mu\text{M}$ und $8 \mu\text{M}$ Fura-2 AM für 5 min bei 37°C und 5 % CO_2 beladen. (A) RPMI 8226 (obere Graphen) und NALM-6 Zellen (untere Graphen) wurden 2 min nach Start der Messung entweder mit 0,2 % DMSO (mock), $10 \mu\text{g/ml}$ TUNI oder 1 mM DTT inkubiert (gefüllte Pfeilspitzen). Nach weiteren 3 min wurde $10 \mu\text{M}$ IONO hinzugegeben (leere Pfeilspitze), um den Ca^{2+} -Gehalt zu bestimmen. Die gestrichelte Linie stellt die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ der Kontrolle vor IONO-Zugabe dar. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). Die Anzahl der analysierten Zellen ist angegeben und die Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz ist dargestellt als n.s. = nicht signifikant.

Der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Efflux wird jedoch nicht nur durch das lumenale Chaperon BiP, sondern auch durch Ca^{2+} -CaM limitiert (Schäuble *et al.*, 2012; Erdmann *et al.*, 2011). Ca^{2+} -CaM bindet hierbei an ein im N-Terminus befindliches IQ-Motiv von Sec61 α in einer $[\text{Ca}^{2+}]$ -abhängigen Weise. Unter Verwendung der CaM-Inhibitoren Ophiobolin A (Ophio A) und Trifluoperazin (TFP) konnte ein erhöhter Sec61 α -abhängiger Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in HeLa Zellen beobachtet werden (Erdmann *et al.*, 2011). Somit wurde im nächsten Schritt der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Efflux nicht von der ER-luminalen Seite durch Faltungsantagonisten, sondern von der cytosolischen Seite mittels CaM-Inhibitoren moduliert.

Hierfür wurden die Zellen wieder mit Fura-2 AM beladen (siehe Kapitel 3.2.6.1) und eine Minute nach Start der Messung wurde für weitere 10 min entweder 0,2 % DMSO (mock), 50 μM Ophio A oder 10 μM TFP hinzugegeben (Abb. 4.11 A und C). Die Inkubation mit den CaM-Inhibitoren führte bereits nach wenigen Minuten in RPMI 8226 Zellen zu einem vermehrten Ca^{2+} -Efflux, was sich in dem Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von 66 nM auf 104 nM (Ophio A) bzw. 59 nM auf 103 nM (TFP) widerspiegelt. Nach Zugabe von 1 μM TG konnte ein signifikanter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in RPMI 8226 beobachtet werden (Kontrolle: 245 nM, Ophio A: 392 nM, TFP: 392 nM), wobei in NALM-6 Zellen weder die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Ophio A: 58 nM auf 55 nM, TFP: 50 nM auf 65 nM), noch der Anstieg nach TG-Zugabe drastisch verändert war (Kontrolle: 40 nM, Ophio A: 38 nM, TFP: 42 nM) (Abb. 4.11 B und D). Durch die prä-Inkubation mit 100 μM oder 1000 μM EME für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 konnte der Anstieg der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in RPMI 8226 Zellen bereits deutlich verringert werden (100 μM EME + Ophio A: 50 nM auf 65 nM, 1000 μM EME + Ophio A: 45 nM auf 47 nM, 100 μM EME + TFP: 49 nM auf 78 nM, 1000 μM EME + TFP: 41 nM auf 66 nM). Diese Blockade des Sec61 α -Kanals durch den EME-induzierten arretierten Ribosom-Polypeptid-Komplex wurde weiterhin durch die Inhibierung des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nach TG-Zugabe bestätigt (Kontrolle: 245 nM, 100 μM EME: 190 nM, 1000 μM EME: 140 nM). Die Inkubation mit EME in Kombination mit den CaM-Inhibitoren führte zu keinem signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in RPMI 8226 Zellen nach TG-Zugabe im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit EME (100 μM EME + Ophio A: 229 nM, 1000 μM EME + Ophio A: 167 nM, 100 μM EME + TFP: 206 nM, 1000 μM EME + TFP: 150 nM). Auch hier wiesen die NALM-6 Zellen bei keiner Kondition eine Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ auf, da alle Werte zwischen 33 und 50 nM lagen.

4. Ergebnisse

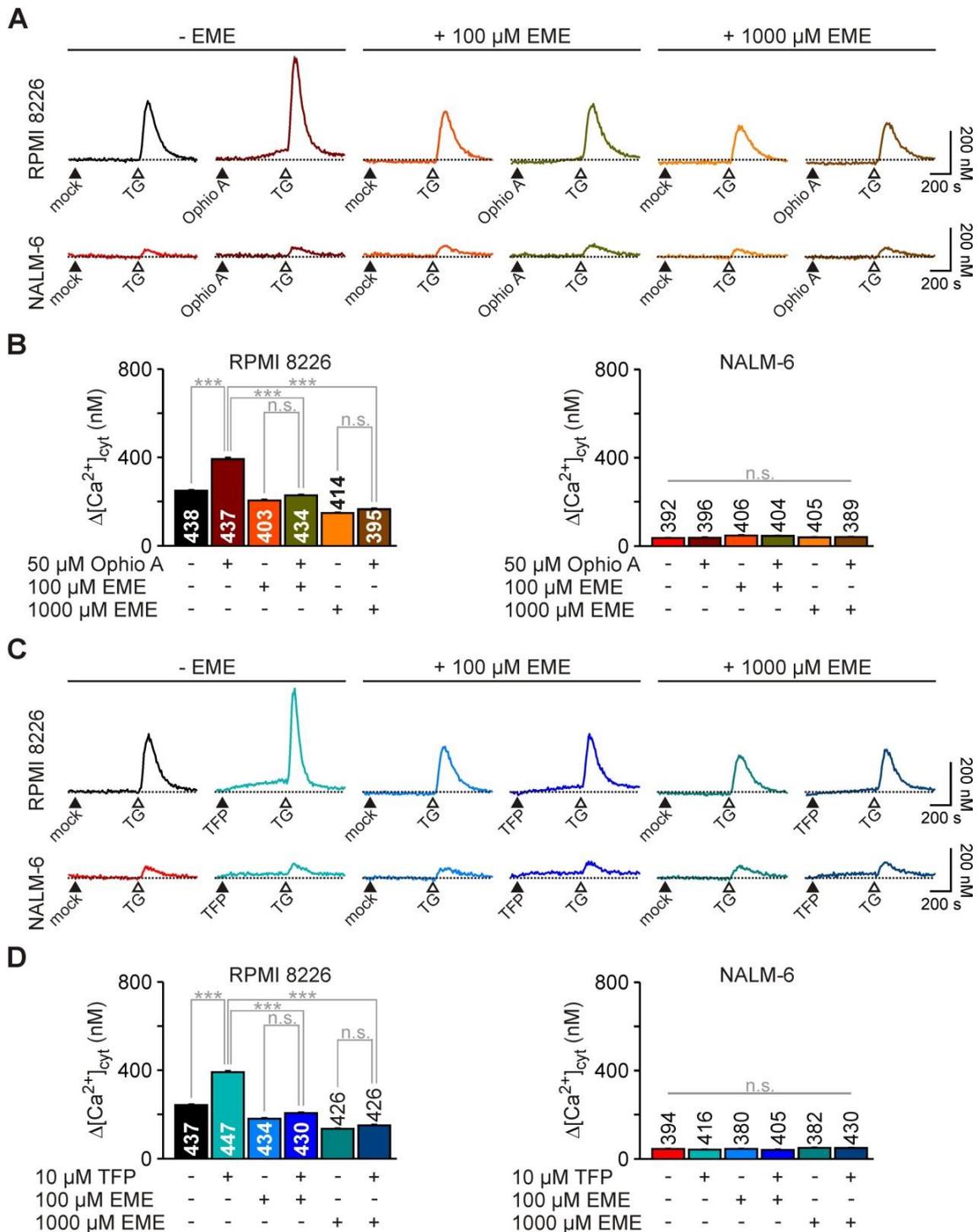


Abbildung 4.11. Effekt von CaM-Inhibitoren auf den Ca²⁺-Efflux in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Vorbehandlung mit EME. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 µM und 8 µM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ beladen. (A) RPMI 8226 (obere Graphen) und NALM-6 Zellen (untere Graphen) wurden entweder mit 0,1 % DMSO (-EME) oder mit 100 µM (+100 µM EME) oder 1000 µM EME (+1000 µM EME) für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ prä-inkubiert. Eine Minute nach Start des Experimentes wurde zu den Zellen entweder mit 0,2 % DMSO (mock) oder 50 µM Ophio A hinzugegeben (gefüllte Pfeilspitze). Nach weiteren 10 min wurde der Ca²⁺-Efflux durch Zugabe von 1 µM TG demaskiert (leere Pfeilspitze). Die gestrichelte Linie stellt die basale [Ca²⁺]_{cyt} der Kontrolle vor TG-Zugabe dar. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). (C) Der Aufbau des Experimentes und die Behandlung der Zellen entsprechend wie in A, mit der Ausnahme, dass 10 µM TFP anstelle von Ophio A verwendet wurde. (D) Dargestellt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). Die Anzahl der analysierten Zellen ist angegeben und die Werte sind als Mittelwert ± S.E.M. von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz ist dargestellt als n.s. = nicht signifikant und p<0,001***.

Um auch hier eine Änderung der globalen $[Ca^{2+}]$ durch die CaM-Inhibitoren auszuschließen, wurde der Ca^{2+} -Gehalt in den Zellen durch die Zugabe von 10 μM IONO bestimmt (Abb. 4.12 A). Abbildung 4.12 B zeigt, dass weder in RPMI 8226 (Kontrolle: 886 nM, Ophio A: 888 nM, TFP: 879 nM) noch in NALM-6 Zellen (Kontrolle: 135 nM, Ophio A: 135 nM, TFP: 152 nM) die Gesamtkonzentration durch die Verwendung der CaM-Inhibitoren signifikant verändert war.

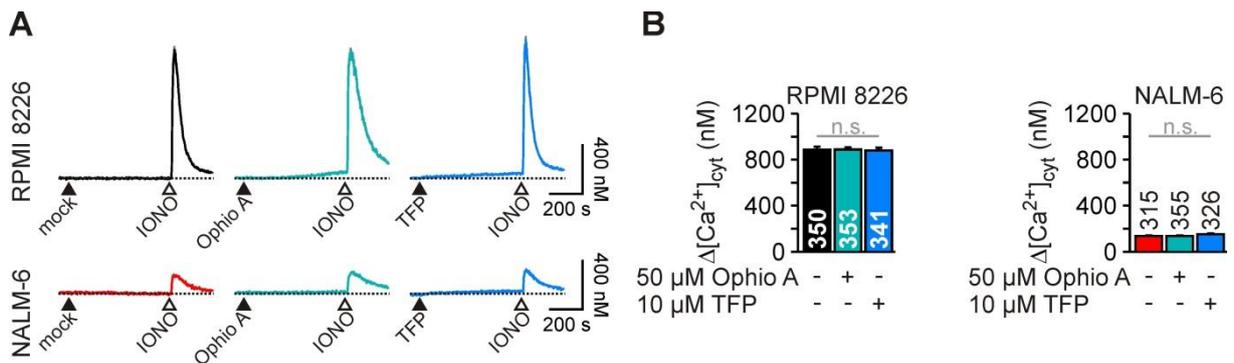


Abbildung 4.12. Effekt von CaM-Inhibitoren auf den Ca^{2+} -Gehalt in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 beladen. (A) RPMI 8226 (obere Graphen) und NALM-6 Zellen (untere Graphen) wurden eine Minute nach Beginn der Messung entweder mit 0,2 % DMSO (mock), 50 μM Ophio A oder 10 μM TFP inkubiert (gefüllte Pfeilspitzen). Nach weiteren 10 min wurde 10 μM IONO hinzugegeben (leere Pfeilspitze), um den Ca^{2+} -Gehalt zu bestimmen. Die gestrichelte Linie stellt die basale $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der Kontrolle vor IONO-Zugabe dar. (B) Gezeigt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). Die Anzahl der analysierten Zellen ist angegeben und die Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz ist dargestellt als n.s. = nicht signifikant.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass mit einer Expansion des ERs und einer vermehrten Proteinsynthese und -sezernierung nicht nur der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Efflux größer wird, sondern dieser auch pharmakologisch verstärkt werden kann. Dadurch wird der Ca^{2+} -Efflux in RPMI 8226 Zellen nach Inkubation mit den Faltungsantagonisten TUNI und DTT (Abb. 4.9), sowie den CaM-Inhibitoren Ophio A und TFP (Abb. 4.11) signifikant größer, was nach prä-Inkubation mit EME wieder verhindert werden kann. Im Gegensatz dazu konnte mit keiner verwendeten Inkubation der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Efflux in NALM-6 Zellen moduliert werden.

4.5 Effekte von Faltungsantagonisten und CaM-Inhibitoren auf die Ca²⁺-Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Langzeitinkubation

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Plasmazelllinie RPMI 8226 einen signifikanten Anstieg der ER-Fläche (Abb. 4.1 G), des Ca²⁺-Efflux (Abb. 4.4 B) und einen größeren SOCE (Abb. 4.6 D) aufweist als die prä-B-Zelllinie NALM-6. In RPMI 8226 Zellen sind deutlich mehr Ribosomen mit der ER-Membran assoziiert (Abb. 4.1 H), was in der hoch effizienten Proteinsynthese der Ig und deren anschließenden Sezernierung begründet liegt. Dadurch lassen sich die RPMI 8226 Zellen leichter durch Translationsinhibitoren (Abb. 4.8), Faltungsantagonisten (Abb. 4.9) und CaM-Inhibitoren (Abb. 4.11) hinsichtlich ihrer Ca²⁺-Homöostase in wenigen Minuten beeinflussen. Im Gegensatz dazu waren die NALM-6 Zellen nahezu „immun“ gegen solche akuten Modulationen des Ca²⁺-Efflux, was wahrscheinlich aus deren geringem Sec61 α -Gehalt und vergleichsweise geringer Proteinsyntheserate resultiert. Im nächsten Schritt sollte deshalb untersucht werden, ob sich durch eine Langzeitinkubation mit dem Faltungsantagonist TUNI oder dem CaM-Inhibitor TFP die Ca²⁺-Homöostase auch in NALM-6 Zellen modulieren lässt. Hierfür wurden die Zellen für 24 h direkt nach dem Ausplattieren mit 0 %, 0,1 % DMSO, 10 μ g/ml TUNI oder 10 μ M TFP in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daneben wurden die Zellen mit 0,1 μ M TG behandelt, was in diesem Fall als Negativkontrolle für den Ca²⁺-Gehalt des ERs dienen sollte. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Fura-2 AM beladen (siehe Kapitel 3.2.6.1) und 3 min nach Start der Messung wurde 1 μ M TG zur Demaskierung des Ca²⁺-Efflux verwendet. Nach weiteren 12 min wurde mittels 10 μ M IONO das verbleibende Ca²⁺ in den Zellen gemessen (Abb. 4.13 A). Da in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zwischen 0 % und 0,1 % DMSO-behandelten Zellen weder in der TG- (RPMI 8226: 0 % DMSO: 405 nM, 0,1 % DMSO: 377 nM; NALM-6: 0 % DMSO: 93 nM, 0,1 % DMSO: 100 nM) noch in der darauffolgenden IONO-Antwort (RPMI 8226: 0 % DMSO: 232 nM, 0,1 % DMSO: 205 nM; NALM-6: 0 % DMSO: 49 nM, 0,1 % DMSO: 47 nM) ein signifikanter Unterschied bestand (Abb. 4.13 B), wurden zur statistischen Analyse als Kontrolle die 0,1 % DMSO-behandelten Zellen herangezogen.

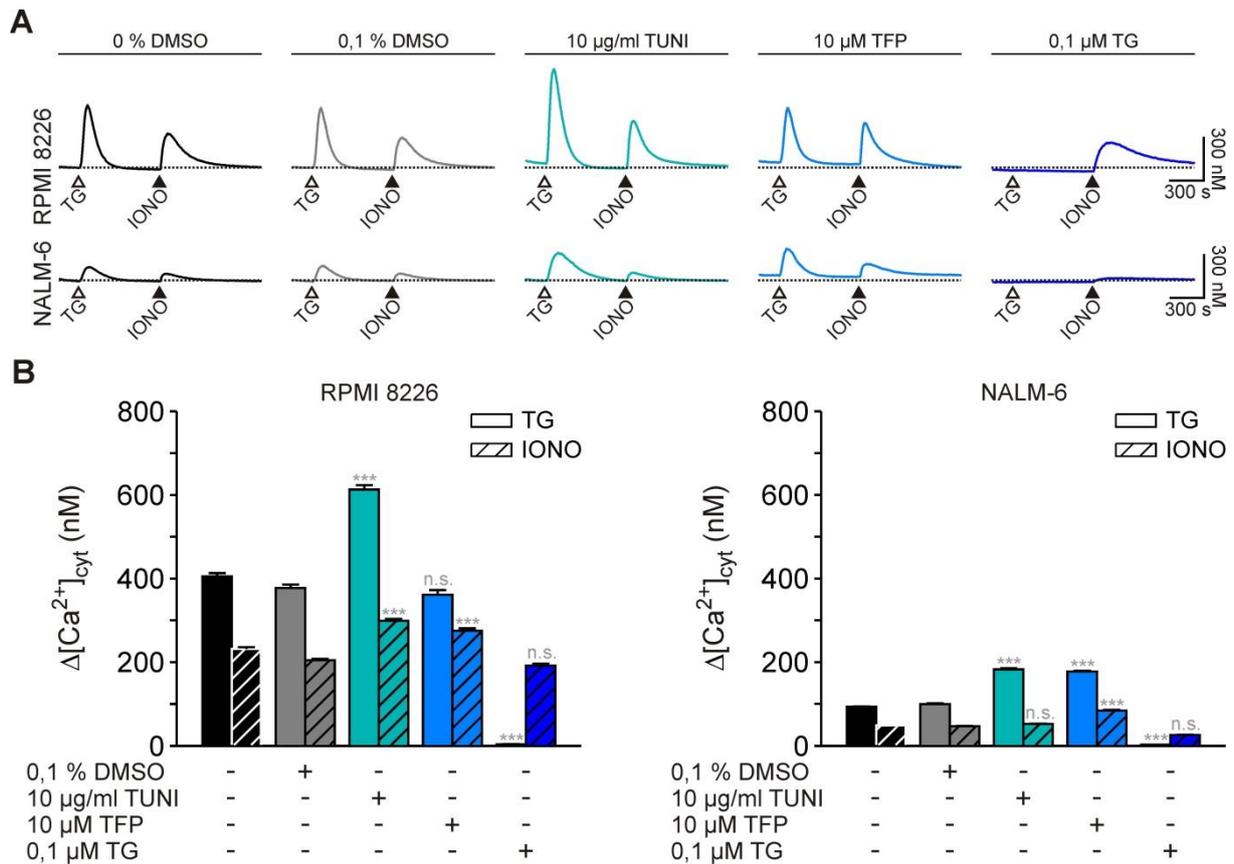


Abbildung 4.13. Effekt der Langzeitinkubation von TUNI und TFP auf die Ca²⁺-Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 µM und 8 µM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ beladen. (A) RPMI 8226 (obere Graphen) und NALM-6 Zellen (untere Graphen) wurden entweder mit 0 % DMSO, 0,1 % DMSO, 10 µg/ml TUNI, 10 µM TFP oder 0,1 µM TG für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um den Ca²⁺-Efflux zu demaskieren, wurde 3 min nach Beginn der Messung 1 µM TG (leere Pfeilspitze) hinzugegeben. Nach weiteren 12 min wurde durch Zugabe von 10 µM IONO (gefüllte Pfeilspitze) das verbleibende Ca²⁺ in den Zellen gemessen. Die gestrichelte Linie repräsentiert die basale [Ca²⁺]_{cyt} der 0 % DMSO-behandelten Zellen vor TG-Zugabe. (B) Dargestellt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). Die Werte sind als Mittelwert ± S.E.M. von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt (n = 212-243). Die statistische Signifikanz wurde mit den 0,1% DMSO-behandelten Zellen als Kontrolle erhoben und ist dargestellt als n.s. = nicht signifikant und p < 0,001 ***.

In RPMI 8226 Zellen bewirkte die Langzeitinkubation von 24 h mit TUNI und TFP eine Erhöhung der basalen [Ca²⁺]_{cyt} von 48 nM (Kontrolle) auf jeweils 83 nM und 86 nM. Der Anstieg der [Ca²⁺]_{cyt} nach Zugabe von TG betrug in der Kontrolle 377 nM, wohingegen die 24 h Vorinkubation mit TUNI eine signifikante Erhöhung auf 613 nM zur Folge hatte (Abb. 4.13 B), was vermutlich aus einer vermehrten Ca²⁺-Aufnahme vom ER resultiert. Die TG-Antwort in TFP-behandelten Zellen war jedoch unverändert (362 nM). Zusätzlich war eine Erhöhung des durch die Zugabe von IONO gemessenen restlichen Ca²⁺ in TUNI- (299 nM) und TFP-behandelten Zellen (275 nM) im Vergleich zur Kontrolle (205 nM) signifikant erhöht, was für eine erhöhte Ca²⁺-Konzentration der Mitochondrien ([Ca²⁺]_{mito}) spricht. Wie

4. Ergebnisse

erwartet war in den TG-behandelten Zellen kaum ein Anstieg (3 nM) nach der TG-Zugabe zu erkennen, wohingegen die IONO-Antwort unverändert blieb (192 nM).

Interessanterweise konnte unter diesen Bedingungen auch ein signifikanter Unterschied bei den NALM-6 Zellen festgestellt werden. Hier betrug der Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ der Kontrolle nach Zugabe von TG 100 nM, wobei bei TUNI- und TFP-behandelten Zellen eine signifikante Erhöhung von jeweils 183 nM und 177 nM detektiert wurde (Abb. 4.13 B). Unter physiologischen Bedingungen passiert Ca^{2+} den Sec61 α -Kanal nur nach Termination der Translokation einer Polypeptidkette (Roy und Wonderlin, 2003), weshalb es nahe liegt, dass die Mobilisierung von Ca^{2+} in NALM-6 Zellen durch die vergleichsweise geringe Proteinsynthese längere Zeit in Anspruch nimmt. Die anschließende Applikation von IONO zeigte, dass die restliche $[Ca^{2+}]$ der Kontrolle 49 nM betrug, wobei TFP eine signifikante Erhöhung der restlichen $[Ca^{2+}]$ auf 84 nM zur Folge hatte. Diese Ca^{2+} -Mobilisierung blieb bei den TUNI-behandelten Zellen unverändert (52 nM). Die basale $[Ca^{2+}]_{cyt}$ konnte allerdings in NALM-6 Zellen nur durch TFP erhöht werden (Kontrolle: 24 nM, TUNI: 27 nM, TFP: 62 nM) (Abb. 4.13 A). Ähnlich zu den RPMI 8226 Zellen war auch in NALM-6 Zellen die erneute TG-Antwort nach deren Langzeitinkubation mit TG nicht zu erkennen (3 nM), während die restliche $[Ca^{2+}]$ mit 26 nM im Vergleich zur Kontrolle unwesentlich verändert war.

Um zu überprüfen, ob der erhöhte Ca^{2+} -Efflux aus einem erhöhten Ca^{2+} -Gehalt oder einfach aus einem größeren Ca^{2+} -Efflux resultiert, wurden die Zellen wieder für 24 h mit den Ca^{2+} -Efflux-Modulatoren behandelt und daraufhin mit Hilfe von 10 μ M IONO der Ca^{2+} -Gehalt bestimmt (Abb. 4.14 A). Auch hier verursachte die Inkubation mit 0,1 % DMSO weder in RPMI 8226 (0 % DMSO: 1241 nM, 0,1 % DMSO: 1233 nM) noch in NALM-6 Zellen (0 % DMSO: 426 nM, 0,1 % DMSO: 408 nM) eine signifikante Änderung der globalen $[Ca^{2+}]$ (Abb. 4.14 B), womit zur Analyse die 0,1 % DMSO-behandelten Zellen als Kontrolle herangezogen wurden. In RPMI 8226 Zellen konnte eine signifikante Zunahme der $[Ca^{2+}]$ in TUNI- (2552 nM) und TFP-behandelten Zellen (1779 nM) detektiert werden, wohingegen die durch TG speicherentleerten Zellen mit einem cytosolischen Ca^{2+} -Anstieg von 206 nM eine signifikante Abnahme aufwiesen (Abb. 4.14 B). Die NALM-6 Zellen zeigten ebenfalls einen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Gehalt nach der Langzeitinkubation mit TUNI (979 nM) und TFP (663 nM) im Vergleich zur Kontrolle (408 nM). TG führte auch in diesen Zellen zu einer Abnahme der zellulären $[Ca^{2+}]$ (23 nM).

Zusammengefasst deuten diese Resultate darauf hin, dass die Ca^{2+} -Homöostase von Zellen mit weniger aktiven Sec61-Komplexen erst durch eine Langzeitinkubation mit TUNI oder TFP, in Form von einem vermehrten Ca^{2+} -Gehalt, stark verändert wird. Diese erhöhte Ca^{2+} -Zunahme im ER lässt sich vermutlich durch eine erhöhte Expression und Aktivität von SERCA-Pumpen erklären (Højmann Larsen *et al.*, 2001; Caspersen *et al.*, 2000). Die globale Erhöhung der zellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ wird wahrscheinlich durch die Aktivität von STIM- und Orai-Proteinen begünstigt. Weiterhin deutet die erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme auf eine Rolle der Mitochondrien hin, was durch die erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung nach IONO-Zugabe (Abb. 4.13) untermauert wird. Dies lässt vermuten, dass die Mitochondrien eine ebenso wichtige Rolle wie das ER in der Ca^{2+} -Homöostase spielen.

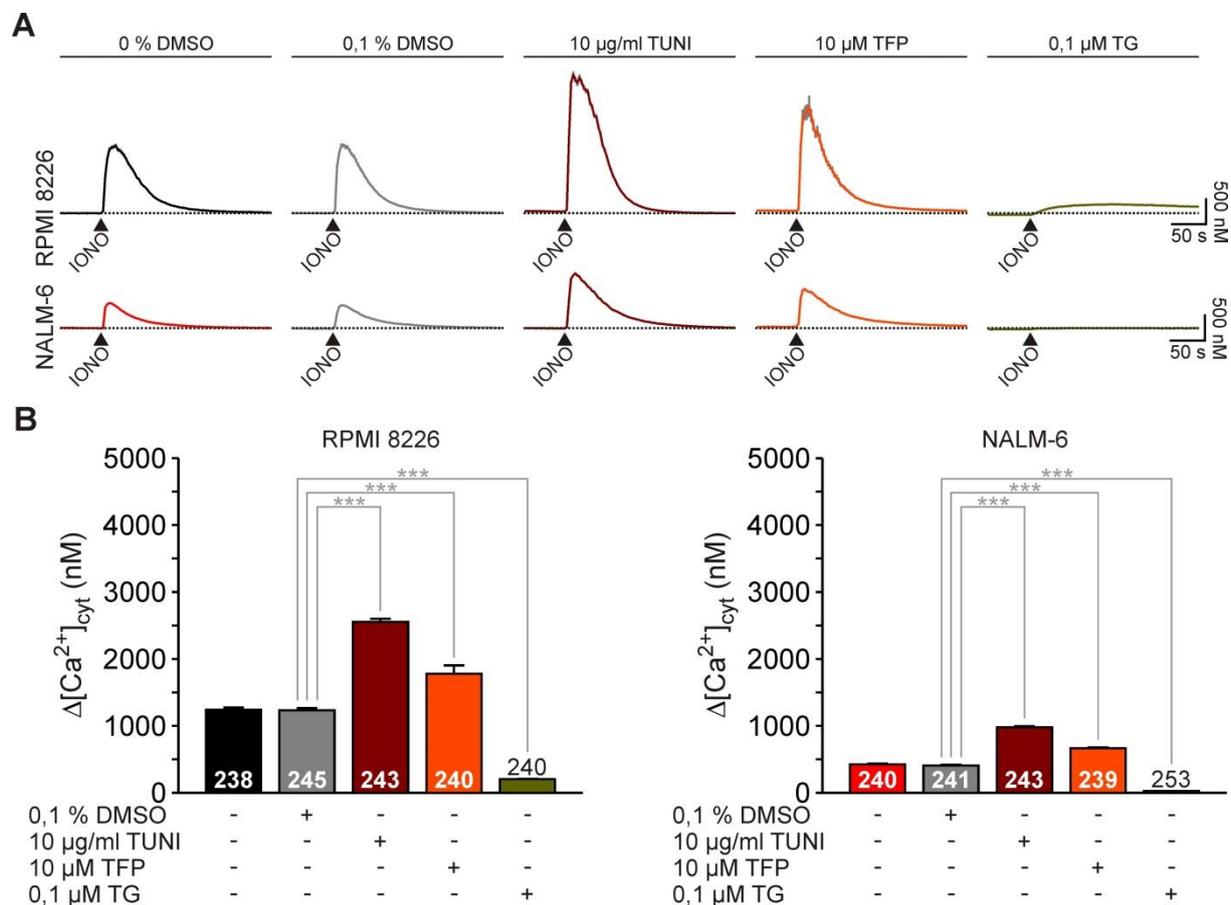


Abbildung 4.14. Effekt der Langzeitinkubation von TUNI und TFP auf den Ca^{2+} -Gehalt in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Experimente wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit jeweils 4 μM und 8 μM Fura-2 AM für 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 beladen. (A) RPMI 8226 (obere Graphen) und NALM-6 Zellen (untere Graphen) wurden entweder mit 0 % DMSO, 0,1 % DMSO, 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI, 10 μM TFP oder 0,1 μM TG für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Um den Ca^{2+} -Gehalt zu messen, wurde eine Minute nach Beginn der Messung 10 μM IONO (gefüllte Pfeilspitze) hinzugegeben. Die gestrichelte Linie repräsentiert die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ der 0 % DMSO-behandelten Zellen vor IONO-Zugabe. (B) Dargestellt ist die statistische Auswertung der in A gezeigten Graphen der RPMI 8226 (links) und NALM-6 Zellen (rechts). Die Anzahl der analysierten Zellen ist angegeben. Die Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. von 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit den 0,1 % DMSO-behandelten Zellen als Kontrolle erhoben und ist dargestellt als $p < 0,001$ ***.

4.6 Untersuchung der Viabilität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit Xenobiotika

Die Ca^{2+} -Imaging-Versuche haben gezeigt, dass die Plasmazelllinie RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen einen stärkeren Ca^{2+} -Efflux aufweist und dass dieser hinsichtlich des $\text{Sec61}\alpha$ -vermittelten Ca^{2+} -Efflux durch $\text{Sec61}\alpha$ -Modulatoren beeinflusst werden kann (Abb. 4.9 und 4.11). Eine 24-stündige Behandlung mit TUNI oder TFP verursacht vermutlich in beiden Zelllinien eine vermehrte Ca^{2+} -Aufnahme des ERs und den Mitochondrien, was aus der erhöhten Ca^{2+} -Mobilisierung nach IONO-Zugabe ersichtlich wird (Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Eine solch veränderte Ca^{2+} -Homöostase in diesen Organellen kann zur Beeinflussung wichtiger anti-apoptotischer Signalwege führen (siehe Kapitel 2.6). Um die Hypothese zu überprüfen, ob Zellen mit einem hohen $\text{Sec61}\alpha$ -Gehalt und stärkeren Ca^{2+} -Efflux anfälliger auf Störungen der ER-Homöostase oder des Energiehaushalts reagieren, wurden die Zellen für die Zeiträume 1, 4, 8, 16, 24 und 48 h mit verschiedenen Substanzen (die $\text{Sec61}\alpha$ -Modulatoren mit eingeschlossen) in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert, anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Zusätzlich wurde daneben mit Hilfe des „Countess®Automated Cell Counter“ das relative Wachstum der Zellen gemessen (siehe Kapitel 3.2.2.4). Etwa 10 % der RPMI 8226 Zellen ohne jegliche Behandlung weisen bereits eine positive PI-Färbung auf, wohingegen bei den NALM-6 Zellen dieser Wert nur 2-3 % betrug (Abb. 4.15). Es konnte weder bei den Viabilitäts- noch bei den Proliferationsversuchen in beiden Zelllinien ein Unterschied zwischen unbehandelten und 0,1 % DMSO/ H_2O behandelten Zellen festgestellt werden. Zunächst wurden die Zellen mit den Translationsinhibitoren CHX und EME behandelt (Abb. 4.15 A und B), welche die globale Proteinsynthese inhibieren und gleichzeitig den Ca^{2+} -Efflux reduzieren. Beide Inkubationen führten zu einem vermehrten Zelltod der RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen. Nach 48-stündiger Behandlung mit CHX betrug der Anteil der toten Zellen der RPMI 8226 Zelllinie ~60 %, welcher in NALM-6 Zellen um die Hälfte verringert war. Allerdings führte die Behandlung mit EME in RPMI 8226 Zellen bereits nach 8 h zu einem deutlich stärkeren Anstieg der toten Zellen und nach 48 h waren bereits ~87 % PI-positiv, wobei nur ~36 % der NALM-6 Zellen eine positive PI-Färbung aufwiesen. Die Langzeitinkubation mit den $\text{Sec61}\alpha$ -Modulatoren TUNI und TFP erhöhen in beiden Zelllinien den $\text{Sec61}\alpha$ -vermittelten Ca^{2+} -Efflux. Hinsichtlich des Zelltodes jedoch konnte kein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden, (Abb. 4.15 C und D), was dafür spricht, dass der beobachtete Zelltod in den Zellen nicht allein aus der erhöhten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem

ER resultiert. Der detektierte Zelltod als Antwort auf TUNI oder TFP fällt schwächer aus als der Effekt von EME. Nach 48-stündiger Inkubation mit 0,1 μM TG wiesen beide Zelllinien ~50 % PI-positiv gefärbte Zellen auf, wobei der Proteasominhibitor Bortezomib (BTZ) mit einer Konzentration von 10 μM einen Zelltod von ~85 % zur Folge hatte (Abb. 4.15 E und F).

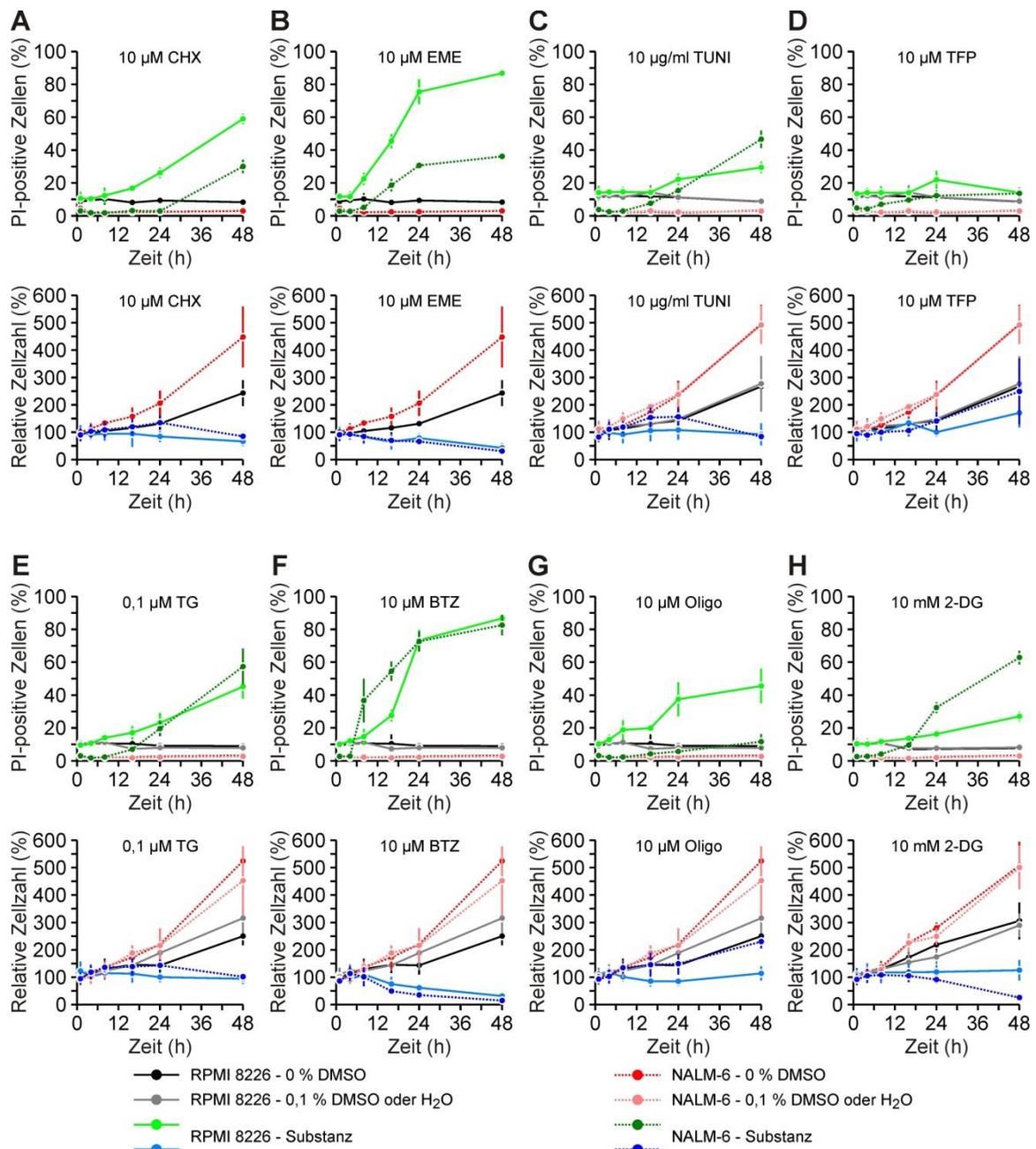


Abbildung 4.15. Kinetik der Viabilität und Proliferation von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit Xenobiotika. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 1-48 h mit 10 μM CHX (A), 10 μM EME (B), 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI (C), 10 μM TFP (D), 0,1 μM TG (E), 10 μM Bortezomib (BTZ, F), 10 μM Oligomycin A (Oligo A, G) und 10 mM 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG, H) in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen an den entsprechenden Zeitpunkten mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (Guava easyCyte 8HT) detektiert. Daneben wurde die Proliferation mittels einer Trypan-Blau-Färbung und der „Countess®Automated Cell Counter“ gemessen. Die oberen Graphen repräsentieren die Viabilitäts- und die korrespondierenden Proliferationsversuche sind in den unteren Graphen dargestellt. Die Viabilität wurde in Duplikaten und die Proliferation in Replikaten gemessen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt (PI - Propidiumiodid, n = 4 für Viabilitätsversuche, n = 3 für Proliferationsversuche).

4. Ergebnisse

In den vorherigen Ergebnissen konnte im Einklang zur Literatur gezeigt werden, dass in Zellen mit einer gesteigerten Proteinsyntheserate (RPMI 8226 Zellen) ein erhöhtes ER-Volumen mit einem höheren Energiebedarf einhergeht, um die enorme Kapazität der Proteinfaltung zu gewährleisten (Abb. 4.1) (Kirk *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Resultate und der Tatsache, dass eine veränderte $[Ca^{2+}]_{mito}$ die ATP-Synthese beeinflussen kann (siehe Kapitel 2.6.5), wurden die Zellen mit Inhibitoren der ATP-Synthese inkubiert. Zum einen wurden die Zellen mit Oligomycin A (Oligo) behandelt, welches an die F_0 -Untereinheit der mitochondrialen F_1-F_0 -ATP-Synthase bindet (Symersky *et al.*, 2012). Da die Zelle jedoch auch die im Cytosol ablaufende Glykolyse zur ATP-Gewinnung nutzt (Lunt und Vander Heiden, 2011), wurden die Zellen zusätzlich mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) inkubiert. Interessanterweise war in den RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen der Anteil der toten Zellen nach Behandlung mit Oligo A um das ~4-fache erhöht (Abb. 4.15 G), wobei nach einer 48-stündiger Behandlung mit 2-DG die NALM-6 Zellen einen ~2-fach höheren Anteil toter Zellen aufwiesen (Abb. 4.15 H). Dies lässt vermuten, dass die RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen ATP hauptsächlich aus den Mitochondrien beziehen, was mit deren erhöhten Anzahl korreliert (Abb. 4.1).

Aufgrund der unterschiedlich hohen Anzahl toter Zellen im unbehandelten Zustand (RPMI 8226: ~10 %, NALM-6: ~2-3 %), wurde im Folgenden zum besseren Vergleich die Anzahl der Substanz-induzierten PI-positiven Zellen von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert (Abb. 4.16). Diese Darstellung erlaubt die Visualisierung des Netto-Anstiegs der zusätzlichen toten Zellen, welche für die folgenden Experimente fortgeführt wird. Hierbei wird nochmals deutlich, dass sich beide Zelllinien bei ER-Stress, verursacht durch 10 μ g/ml TUNI, 10 μ M TFP oder 0,1 μ M TG, zumindest im Zeitrahmen von 24 h nicht dramatisch hinsichtlich der Viabilität unterscheiden, da bei diesen Konzentrationen der Anteil toter Zellen bei ~10-17 % lag (Abb. 4.16 C, D und E). Außerdem kommt es bei NALM-6 Zellen nach Behandlung mit 10 μ M BTZ schon nach 8 h zu einem hohen Anstieg PI-positiver Zellen auf ~35 % (Abb. 4.16 F), wobei nach 24 h beide Zelllinien den gleichen Netto-Wert von ~70 % erreichen. Die Unterschiede nach der Inhibierung der ATP-Synthese im Mitochondrium (Oligo) oder im Cytosol (2-DG) bleiben auch hier weiterhin bestehen (Abb. 4.16 G und H). Hier liegen die Werte nach Behandlung mit 10 μ M Oligo bei ~30 % für RPMI 8226 und bei ~4 % für NALM-6 Zellen. Die Behandlung mit 10 mM 2-DG hatte jeweils einen Anstieg der PI-positiven Zellen von ~9 % und ~31 % zur Folge.

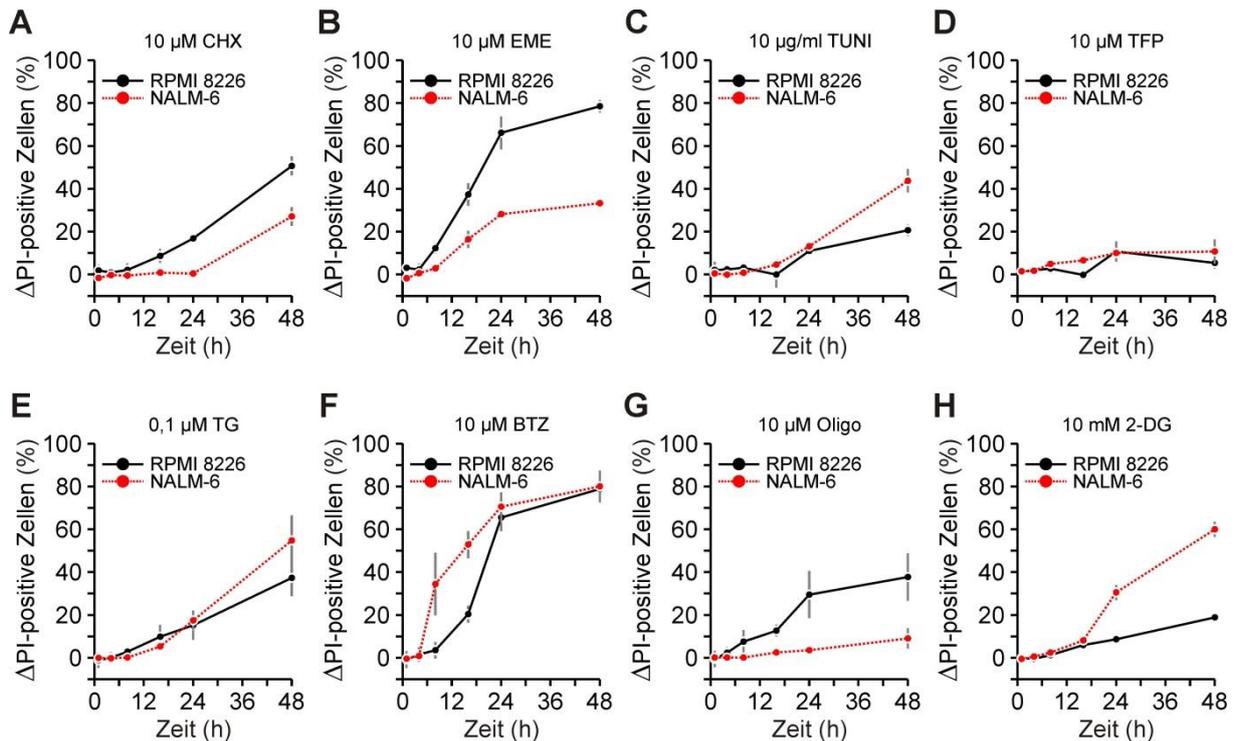


Abbildung 4.16. Die Zunahme des Netto-Wertes der toten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit Xenobiotika. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 1-48 h mit 10 μM CHX, 10 μM EME, 10 μg/ml TUNI, 10 μM TFP, 0,1 μM TG, 10 μM Bortezomib (BTZ), 10 μM Oligomycin A (Oligo) und 10 mM 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen an den entsprechenden Zeitpunkten mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (Guava easyCyte 8HT) detektiert. Nach der Detektion wurden die Werte der behandelten Zellen von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert, um somit den direkten Vergleich der Netto-Werten der PI-positiven Zellen zu erhalten (ΔPI-positive Zellen). Die Viabilität wurde in Duplikaten gemessen. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass entgegen der Hypothese die RPMI Zellen nicht anfälliger auf eine TUNI-, TFP- oder TG-induzierte Störung der ER-Homöostase reagieren. Des Weiteren weisen die NALM-6 Zellen eine schnellere Kinetik hinsichtlich der PI-positiven Zellen bei Behandlung mit BTZ auf. Interessanterweise scheinen die RPMI 8226 Zellen sensitiver auf die Inhibierung der mitochondrialen ATP-Synthase zu reagieren, wohingegen die NALM-6 Zellen vermehrt bei einer Hemmung der Glykolyse PI-positive Zellen aufweisen.

4.6.1 Untersuchung der Sensitivität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen gegenüber veränderter Ca^{2+} -Mobilisierung

In den vorangegangenen Ergebnissen lag der Fokus der Behandlung der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen mit Xenobiotika auf dem zeitlichen Ablauf bei gleichbleibender Konzentration (Abb. 4.16). Hier wiesen die Zellen überraschenderweise vor allem nach 24 h keinen dramatischen Unterschied nach Behandlung mit TUNI, TFP und TG im Hinblick auf PI-positive Zellen auf. Aufgrund dessen sollte im nächsten Schritt untersucht werden, in wie fern sich die Zellen in der Sensitivität, d.h. bei gleicher Zeit, aber unterschiedlichen Konzentrationen, unterscheiden. Da in dieser Arbeit der Fokus auf der Ca^{2+} -Mobilisierung lag, wurden die Zellen zunächst mit verschiedenen Konzentrationen von TG und IONO für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Da auch hier unbehandelte Zellen eine PI-positive Färbung von ~10 % (RPMI 8226) bzw. 2-3 % (NALM-6) aufwiesen (siehe Anhang, Abb. 6.1), wurde auch hier zum besseren Vergleich die Werte von der jeweiligen Kontrolle abgezogen, damit eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den beiden Zelllinien gegeben ist.

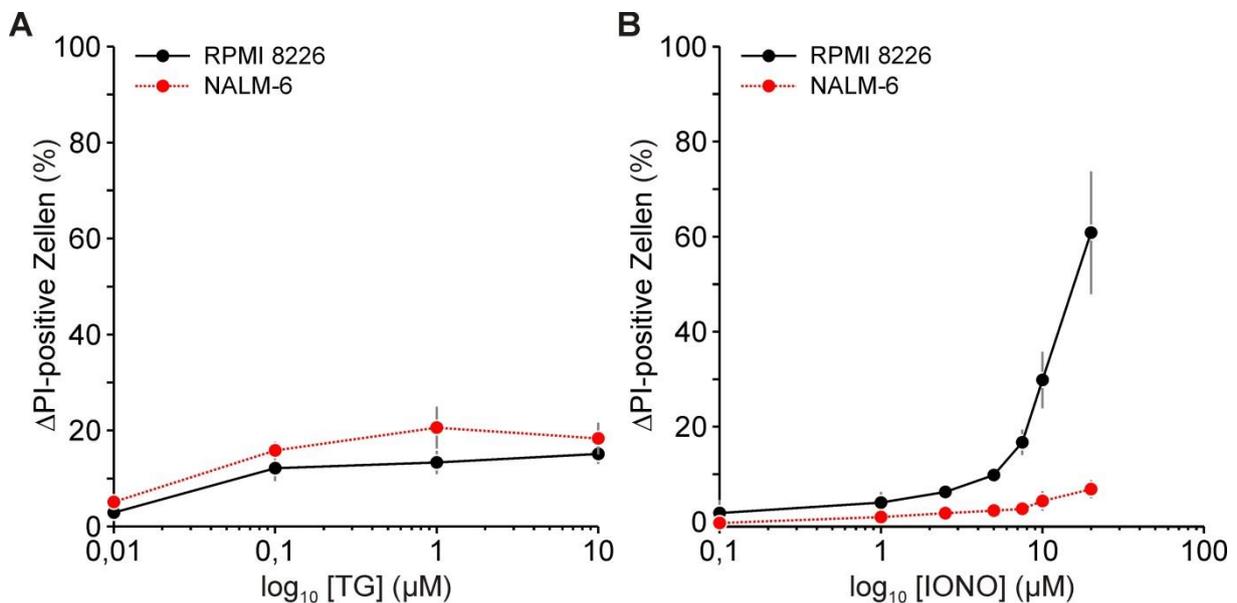


Abbildung 4.17. Die Zunahme des Netto-Wertes der toten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Behandlung mit TG oder IONO. A) Die Zellen wurden entweder mit 0 %, 0,1 % DMSO oder mit den angegebenen Konzentration von TG für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in Kulturmedium inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). (B) Die Zellen wurden wie in A behandelt mit der Ausnahme, dass IONO anstelle von TG verwendet wurde. Die Werte der TG- und IONO-behandelten Zellen wurden zuvor von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert, um somit den Netto-Anstieg der toten Zellen zu erhalten (ΔPI -positive Zellen). Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Interessanterweise war die Anzahl PI-positiver Zellen nach Behandlung mit 0,01 μM TG im Vergleich zur Kontrolle in beiden Zelllinien unwesentlich verändert, wohingegen die Behandlung mit 0,1 μM TG einen sichtbaren Anstieg auf 10-15 % verursachte (Abb. 4.17 A). Außerdem bewirkte eine zusätzliche 10- bzw. 100-fache Erhöhung der Konzentration keinen weiteren Anstieg der PI-positiven Zellen, woraufhin in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bei Konzentrationen von 0,1-10 μM TG der prozentuale Anteil der toten Zellen bei jeweils 12-15 % und 15-20 % lag.

Da durch eine SERCA-Inhibition mit TG lediglich die Ca^{2+} -Homöostase des ERs durch eine gehemmte Ca^{2+} -Aufnahme gestört wird, wurden die Zellen als nächstes mit dem Ca^{2+} -Ionophor IONO behandelt, um eine globale Ca^{2+} -Mobilisierung zu bewirken (Abb. 4.17 B). Hierbei konnte ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der PI-positiven RPMI 8226 Zellen beobachtet werden, wohingegen nur eine leichte Zunahme in NALM-6 Zellen bei Konzentrationen von 7,5-20 μM IONO detektiert wurde. Der prozentuale Anteil der PI-positiven RPMI 8226 Zellen bei maximaler IONO-Konzentration (20 μM) entspricht dem ~3,5-fachen der toten Zellen nach Behandlung mit 0,1-10 μM TG. Somit betrug der prozentuale Anteil toter Zellen bei maximaler IONO-Konzentration von 20 μM in RPMI 8226 Zellen ~60 % und bei NALM-6 Zellen lediglich ~7 %. Dies lässt vermuten, dass die RPMI 8226 Zellen zwar sensitiver auf Veränderungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase reagieren, jedoch gleichzeitig die ER- Ca^{2+} -Homöostase im Hinblick auf das Überleben der Zellen innerhalb von 24 h eine marginale Rolle spielt.

4.6.2 Untersuchung der Sensitivität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen gegenüber ER-Stress

Die Fragestellung dieser Arbeit bestand darin, ob ein erhöhter Sec61 α -Gehalt die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst und ob eine funktionale Störung des Sec61-Komplexes inklusive dessen akzessorischer Proteine einen erhöhten Zelltod verursacht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die RPMI 8226 Zellen einen ~5-fach erhöhten Sec61 α -Gehalt und einen ~10-fach stärkeren Ca^{2+} -Efflux als die NALM-6 Zellen aufweisen (Abb. 4.3 und 4.4). Zusätzlich kann der Ca^{2+} -Efflux in RPMI 8226 Zellen durch Verwendung von Faltungsantagonisten wie TUNI oder DTT, sowie eine Behandlung mit dem CaM-Inhibitor TFP moduliert werden (Abb. 4.9 und 4.11). Die bisherigen Resultate haben gezeigt, dass sich die Anzahl der toten Zellen der RPMI 8226 und NALM-6 Zelllinie bei ER-Stress (TUNI, TFP) und veränderter

4. Ergebnisse

ER-Ca²⁺-Homöostase (TG) bei einer Behandlungsdauer von 24 h nur unwesentlich voneinander unterscheiden (Abb. 4.16 und 4.17). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die RPMI 8226 Zellen sensitiver auf ER-Stress reagieren. Darum wurden die beiden verwendeten Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von TUNI, TFP, DTT oder BTZ in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Wie schon zuvor zeigten unbehandelte Zellen eine positive PI-Färbung von ~10 % (RPMI 8226) und 1-2 % (NALM-6) (siehe Anhang, Abb. 6.2), weshalb auch hier die Werte von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert wurden. Hierbei konnte jedoch zwischen beiden Zelllinien kein Unterschied bei jeder verwendeten Konzentration von TUNI festgestellt werden (Abb. 4.18 A). Der maximale Anstieg der toten Zellen betrug bei einer Konzentration von 100 µg/ml TUNI ~23 %, wodurch die erste Beobachtung, nämlich dass beide Zelllinien mit gleicher Sensitivität bei einer 24-stündigen Behandlung mit TUNI reagieren (Abb. 4.16), bestätigt werden. Deutlichere Unterschiede konnte nach der Behandlung mit TFP beobachtet werden. NALM-6 Zellen sind bei einer TFP-Behandlung bei Konzentrationen von 24-100 µM fast zu 100 % tot, wohingegen der Wert bei RPMI 8226 Zellen bei 40-85 % liegt (Abb. 4.18 B). Somit reagieren NALM-6 im Vergleich zu RPMI 8226 Zellen sensitiver auf TFP. Die Behandlung mit DTT jedoch führte bei RPMI 8226 Zellen ab einer Konzentration von 2,5 mM zu einem vermehrten Anstieg der toten Zellen, wohingegen der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen bei beiden Zelllinien bei Konzentrationen von 8-10 mM ~85 % betrug (Abb. 4.18 C). Da NALM-6 Zellen jedoch bei Konzentrationen ≤2,5 mM sensitiver reagieren, kann die Konzentration von 2 mM als Schnittstelle betrachtet werden, bei der sich die Sensitivität der Zellen umgekehrt. NALM-6 Zellen reagieren darüber hinaus bei einer Behandlung mit BTZ ab einer Konzentration von 100 nM sensitiver (~60 %), da hier im Vergleich zu RPMI 8226 Zellen (~35 %) ein deutlicher Anstieg der toten Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 4.18 D). Allerdings beträgt dieser Wert bei Konzentrationen von 10-20 µM in beiden Zelllinien 52-60 %. Jedoch gilt es hier anzumerken, dass die BTZ-induzierte Akkumulierung von fehlgefalteten Proteinen zunächst einmal cytosolischen Stress auslöst und es danach ebenso zu einem erhöhten ER-Stress kommt, was als eine UPR-Aktivierung interpretiert wurde (Starheim *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2009; Obeng *et al.*, 2006; Kane *et al.*, 2003). Dies lässt vermuten, dass die NALM-6 Zellen anfälliger auf zellulären Stress reagieren als die RPMI 8226 Zellen.

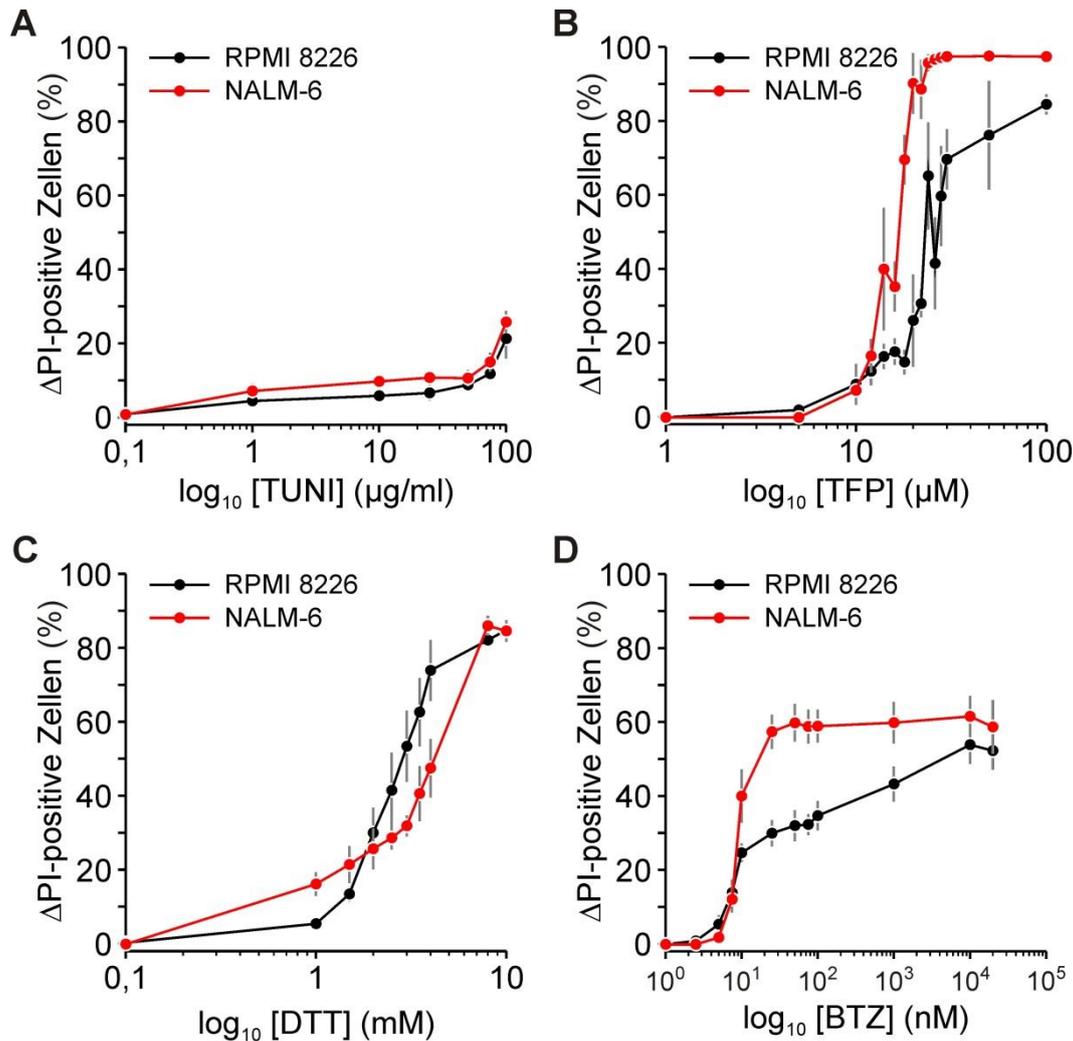


Abbildung 4.18. Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven Zellen nach Behandlung mit ER-Stressoren. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von TUNI (A), TFP (B), DTT (C) oder BTZ (D) für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Die Daten wurden dann von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert, um den Netto-Anstieg der PI-positiven Zellen zu visualisieren (Δ PI-positive Zellen). Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass RPMI 8226 und NALM-6 Zellen gleichermaßen auf ER-Stress reagieren. Jedoch hängt die Sensitivität von dem jeweiligen ER-Stressor ab. Wird die *N*-Glykosylierung durch TUNI inhibiert, so reagieren darauf beide Zelllinien zu gleichen Teilen. Werden die Zellen jedoch mit TFP oder BTZ inkubiert, zeigen die NALM-6 Zellen eine konzentrationsabhängige Sensitivität, da bei geringen Konzentrationen der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen im Vergleich mit RPMI 8226 Zellen nahezu gleich ist, aber bei höheren Konzentration die NALM-6 Zellen deutlich höhere Werte aufweisen. DTT bildet hier eine Ausnahme, da erst ab einer Konzentration von 2,5 mM die RPMI 8226 einen deutlich höheren Anstieg toter Zellen aufweisen als NALM-6 Zellen.

4.6.3 Untersuchung der Viabilität von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Störung des mitochondrialen Energiehaushaltes

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass nach einer 24-stündigen Behandlung mit TUNI, TFP oder TG sowohl die RPMI 8226, als auch die NALM-6 Zellen einen veränderten Ca^{2+} -Gehalt im ER und den Mitochondrien aufweisen (Abb. 4.13 und 4.14). Eine Induktion von ER-Stress oder Störung der ER- Ca^{2+} -Homöostase verursacht entgegen der Annahme generell keinen stärkeren Zelltod in RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen (Abb. 4.17 und 4.18). Da in Plasmazelllinien gezeigt werden konnte, dass diese anfälliger als B-Zelllinien auf mitochondriale Inhibitoren wie Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) reagieren (Kurtoglu *et al.*, 2010) und die RPMI 8226 Zellen sensitiver für Störungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase sind (Abb. 4.17), wurde im nächsten Schritt die mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase und der Energiehaushalt moduliert. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Substanz für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Da wieder die Kontrolle der RPMI 8226 Zellen eine 10 %ige und die NALM-6 Zellen eine 1-2 %ige Zunahme der PI-positiven Zellen aufwiesen (siehe Anhang, Abb. 6.3), wurde auch hier die Darstellung der Kontroll-subtrahierten Werte zum Vergleich beider Zelllinien ausgewählt.

Eine Inkubation mit dem Protonophor CCCP bewirkt eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, wodurch indirekt die ATP-Synthese gestört wird (Miyata *et al.*, 2014; Nieminen *et al.*, 1994). RPMI 8226 Zellen weisen bei einer Konzentration von 5 μM CCCP einen deutlicheren Anstieg PI-positiver Zellen von ~16 % im Vergleich zu NALM-6 Zellen (~2 %) auf, wobei bei höheren Konzentrationen (>50 μM) sich die Werte beider Zelllinien bei ~90 % annähern (Abb. 4.19 A). Eine Behandlung mit Oligo führt wie oben schon beschrieben zu einer ATP-Synthase-Inhibition, welche in NALM-6 Zellen erst ab einer Konzentration von 50 μM zu einem Anstieg der toten Zellen auf ~30 % führte, wobei bei 100 μM dieser Wert um weitere 10 % anstieg (Abb. 4.19 B). Im Gegensatz dazu stieg der prozentuale Anteil der toten Zellen auf ~50 % bei den RPMI 8226 Zellen schon bei einer Konzentration von 0,1 μM , wobei dieser Wert auf ~30 % bei einer Konzentration von 10 μM zurückfiel und sich dann wieder bei einer 10-fach höheren Konzentration verdoppelte. Ru360 stellt einen Sauerstoffgekoppelten dinukleären Ruthenium-Amin-Komplex dar und inhibiert durch direkte Bindung an den MCU hoch spezifisch ($\text{IC}_{50} = 184 \text{ pM}$) die Ca^{2+} -Aufnahme der Mitochondrien (Cao *et*

al., 2017; Matlib *et al.*, 1998). Allerdings hatte eine Behandlung mit Ru360 keine Beeinflussung der Viabilität zur Folge, was in Übereinstimmung mit der Literatur steht (Bauckman *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2010b) (Abb. 4.19 C). Daneben wurden die Zellen mit Rutheniumrot (RR) behandelt, welches ebenfalls die Ca^{2+} -Aufnahme der Mitochondrien inhibiert (Bae *et al.*, 2003; Gunter *et al.*, 2000; Kruman und Mattson, 1999). Jedoch hat RR keine spezifische Wirkung auf die mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme. So werden zusätzlich RyR (Xu *et al.*, 1998) und TRP-Kanäle (Cahusac, 2009), vor allem die Unterfamilie der TRPV-Kanäle inhibiert (Bouron *et al.*, 2015). Die Behandlung mit RR hatte keine Wirkung in NALM-6 Zellen (Abb. 4.19 D). Allerdings zeigten die RPMI 8226 Zellen den maximalen prozentualen Anteil toter Zellen von ~25 % bei einer Konzentration von 50 μM RR, wobei eine weitere Erhöhung der Konzentration eine Erniedrigung der PI-positiven Zellen auf bis zu ~4 % zur Folge hatte. Eine Behandlung mit Carboxyatractyloside (C-ATR) hat eine Inhibierung der ATP/ADP-Translokase zur Folge, wodurch der Transport von ATP aus dem Mitochondrium in das Cytosol und ADP vom Cytosol in das Mitochondrium verhindert wird (Maldonado und Lemasters, 2014; Pebay-Peyroula *et al.*, 2003; Luciani *et al.*, 1971). Jedoch hatte C-ATR wie Ru360 keinerlei Wirkung auf die Viabilität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen (Abb. 4.19 E). Da die NALM-6 Zellen sensitiver auf den cytosolischen Glykolyse-Inhibitor 2-DG reagierten (Abb. 4.16), wurde in diesem Fall überprüft, welche Zelllinie sensitiver auf Veränderungen des cytosolischen Energiehaushaltes reagiert. Niedrige Konzentrationen (0,1-10 mM) von 2-DG verursachten nur einen geringfügigen Anstieg der toten RPMI 8226 Zellen (~2-8 %), wobei der maximale Wert von ~13 % bei Konzentration von 50-100 mM erreicht wurde (Abb. 4.19 F). Im Gegensatz dazu stieg der Wert bei NALM-6 Zellen bereits bei einer Konzentration von 5 mM auf ~12 % und erreichte sein Maximum bei ~30 % bei einer Konzentration von 50 mM. Allerdings halbierte sich der Anteil der PI-positiven Zellen bei einer Verdopplung der Konzentration.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass mit einem erhöhten ER-Volumen (Abb. 4.1) und einem erhöhten Sec61 α -induzierten Ca^{2+} -Efflux (Abb. 4.4, 4.9 und 4.11) eine erhöhte Sensitivität gegenüber Veränderungen des mitochondrialen Energiehaushaltes in RPMI 8226 Zellen einhergeht. Diese Zellen weisen im Vergleich zu NALM-6 Zellen schon bei geringen Konzentrationen von CCCP, Oligo und RR einen erhöhten Anteil PI-positiver Zellen auf. Im Gegensatz dazu scheinen NALM-6 Zellen sensitiver auf Störungen der Glykolyse zu reagieren.

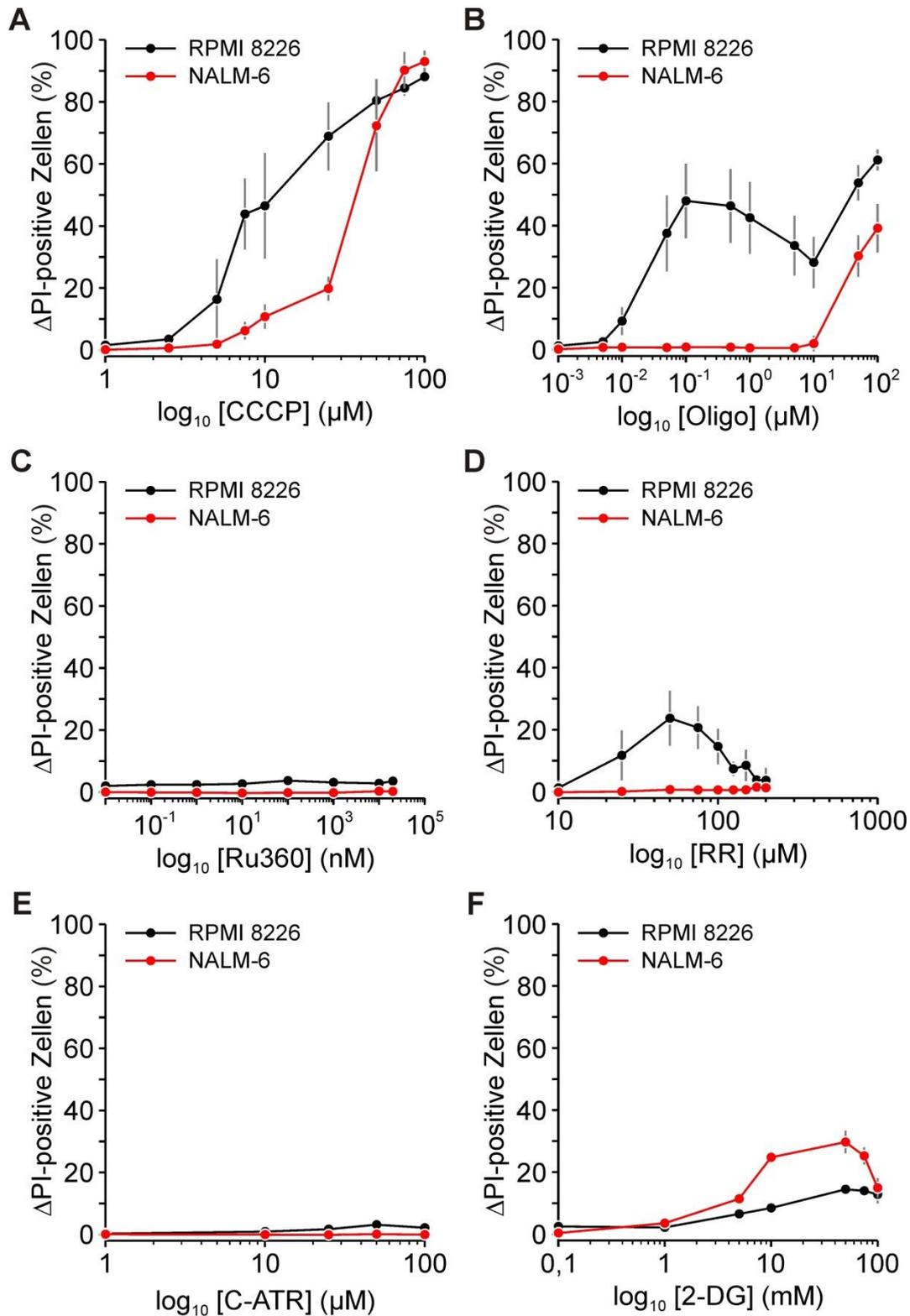


Abbildung 4.19. Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Beeinflussung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase und des Energiehaushaltes. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von CCCP (A), Oligo (B), Ru360 (C), RR (D), C-ATR (E) oder 2-DG (F) für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in Kulturmedium inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Angegeben sind die Kontrolle-subtrahierten Werte (Δ PI-positive Zellen), die in Abbildung 4.21 gezeigt sind. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

4.6.4 Effekt von Emetin auf die Viabilität von ER-Stressoren-behandelten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Frühere Studien haben gezeigt, dass EME die Translation am Ribosom inhibiert und dadurch die naszierende Polypeptidkette im Sec61 α -Kanal arretiert werden soll und somit den Sec61 α -induzierten Ca²⁺-Efflux limitiert (Myasnikov *et al.*, 2016; Garreau de Loubresse *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2014; Lang *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2007b). In den vorangegangenen Experimenten konnte zum einen gezeigt werden, dass EME den Ca²⁺-Efflux erniedrigt (Abb. 4.8) und zum anderen, dass EME den erhöhten TUNI- und TFP-induzierten Ca²⁺-Efflux in RPMI 8226 Zellen aufheben kann (Abb. 4.9 und 4.11). Um nun zu untersuchen, ob EME ebenso den ER-Stress-induzierten Zelltod verhindern kann, wurden die Zellen vor der Behandlung mit TUNI, TFP oder TG für eine Stunde mit EME inkubiert, da innerhalb dieser Zeit EME bei Konzentrationen von 10-100 nM die Proteinsynthese bereits um 70 % erniedrigt (Batista *et al.*, 2017; Mukhopadhyay *et al.*, 2016; Grollman, 1968) und somit der Ribosom-Polypeptid-Sec61-Komplex den Kanal für Ca²⁺ verschließen sollte. Dafür musste jedoch zuerst überprüft werden, welche Konzentrationen von EME für diesen Zeitraum geeignet ist. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen für eine Stunde in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 min verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als nächstes wurde der prozentuale Anteil der toten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Daneben wurde die Proliferation mittels einer Trypan-Blau-Färbung mit Hilfe des „Countess®Automated Cell Counter“ detektiert (siehe Kapitel 3.2.2.4). Die Anzahl toter Zellen war in beiden Zelllinien bis zu einer Konzentration von 500 nM EME unverändert, wobei die RPMI 8226 Zellen bei höherer Konzentration einen deutlich höheren Anteil toter Zellen aufwiesen als die NALM-6 Zellen (Abb. 4.20 A). Eine Abnahme der Proliferation beider Zelllinien konnte schon bei einer Konzentration 100 nM EME beobachtet werden (Abb. 4.20 B). EME zeigt selbst 24 h nach dem Waschen der Zellen einen cytotoxischen Effekt, da EME im Gegensatz zu CHX irreversibel an das Ribosom bindet (Rebelo *et al.*, 2008; Grollman, 1968).

4. Ergebnisse

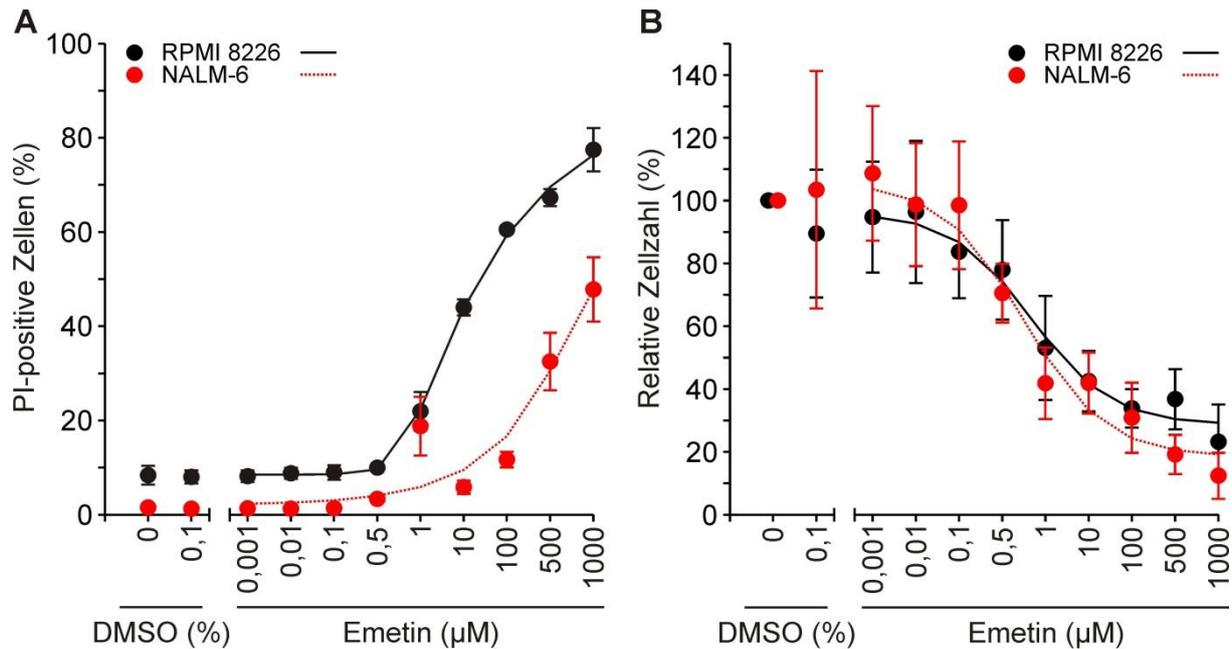


Abbildung 4.20. Effekt einer einstündigen prä-Inkubation von EME auf die Viabilität und Proliferation in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. (A) Die Zellen wurden entweder mit 0 %, 0,1 % DMSO oder den angegebenen Konzentrationen von EME für eine Stunde in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden dann in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis von 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Guava easyCyte 8HT). (B) Die Zellen wurden wie in A behandelt und die Proliferation wurde mittels einer Trypan-Blau-Färbung und der „Countess® Automated Cell Counter“ detektiert. Die Viabilität wurde in Duplikaten und die Proliferation in Replikaten gemessen. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Für die weiteren Versuche wurden die Konzentrationen 1, 10, 100 und 500 nM EME ausgesucht, da die Zellen bei höheren Konzentrationen, wie in den Ca²⁺-Imaging-Versuchen (100-1000 µM), aufgrund der Irreversibilität von EME nicht überleben (Abb. 4.20 A) und gleichzeitig Konzentrationen im Bereich von 10-100 nM EME immer noch die Proteinsynthese inhibiert (Batista *et al.*, 2017; Mukhopadhyay *et al.*, 2016; Grollman, 1968). Die Zellen wurden mit den verschiedenen Konzentrationen für eine Stunde behandelt und danach mit TUNI, TFP, TG oder die Kombination aus TG + TUNI und TG + TFP für weitere 24 h inkubiert. Aufgrund der unterschiedlichen Werte der unbehandelten Zellen (RPMI 8226: ~10 %, NALM-6: 1-2 %) (siehe Anhang, Abb. 6.4), wurden die Werte von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Keine der verwendeten Konzentrationen von EME konnte allerdings den Zelltod der behandelten Zellen signifikant verhindern (Abb. 4.21). Überraschenderweise war eine erhöhte Anzahl PI-positiver RPMI 8226 Zellen (~40 %) im Vergleich zu NALM-6 Zellen (~30 %) nach Behandlung mit TG + TUNI zu beobachten.

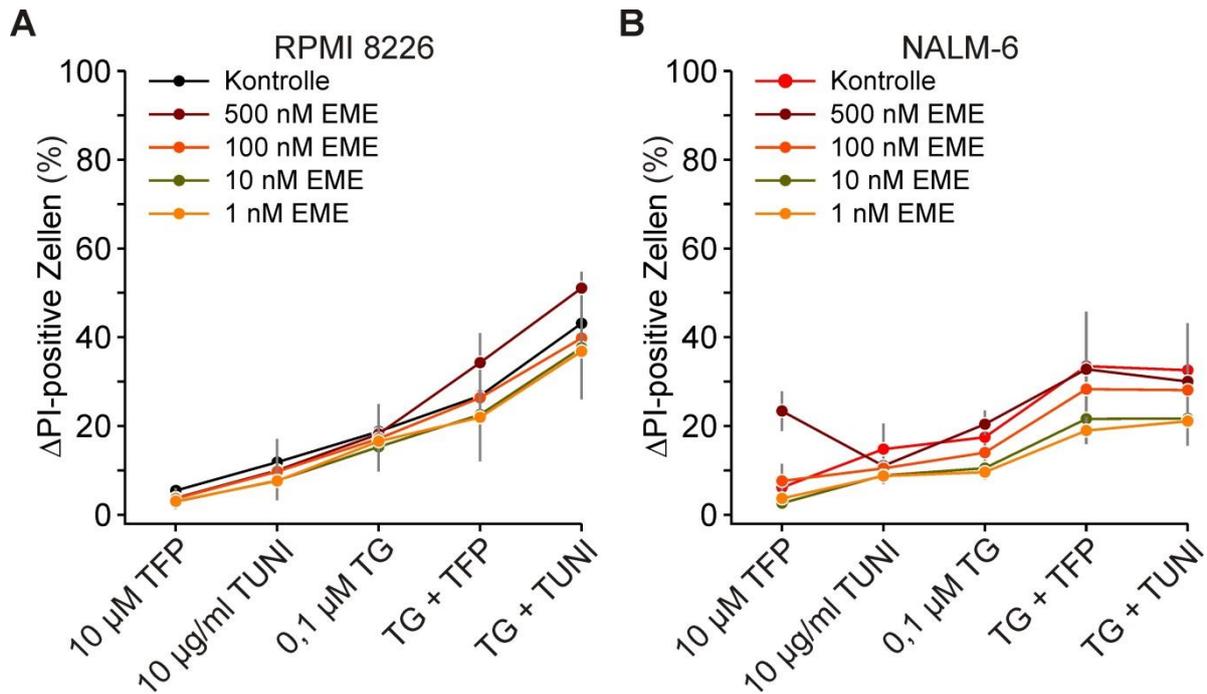


Abbildung 4.21. Zunahme der PI-positiven Zellen nach Subtraktion der Kontrollwerte (Netto-Werte) nach Behandlung mit ER Stressoren. Die RPMI 8226 (A) und NALM-6 Zellen (B) wurden für eine Stunde mit 1, 10, 100 oder 500 nM EME in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und für 24 h mit 0 %, 0,2 % DMSO, 10 µg/ml TUNI, 10 µM TFP, 0,1 µM TG oder die Kombination TG + TUNI oder TG + TFP bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis von 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Guava easyCyte 8HT). Zur Auswertung wurden die Werte der ER-Stressoren-behandelten Zellen von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert, wodurch der Netto-Anstieg der PI-positiven Zellen nach Behandlung abgelesen werden kann (ΔPI-positive Zellen). Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Zelltod nur geringfügig durch die Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER während dem pharmakologisch induzierten ER-Stress ausgelöst wird und dass der Verschluss von Sec61α durch den EME-induzierten arretierten Ribosom-Polypeptid-Komplex den Zelltod, im Vergleich zum TUNI- oder TFP-induzierten erhöhten Ca²⁺-Efflux (Abb. 4.9 und 4.11), nicht verhindern kann. Diese Resultate sprechen gegen die Hypothese, dass Zellen mit einer erhöhten Proteinsyntheserate, einem Sec61-Gehalt und Ca²⁺-Efflux anfälliger auf ER-Stress reagieren. Dies lässt vermuten, dass diese Zellen einen entsprechenden Schutzmechanismus besitzen, welcher im folgenden Kapitel untersucht wurde.

4.6.5 Untersuchung protektiver Proteine gegen ER-Stress in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Die vorherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass kein Unterschied im Hinblick auf den ER-Stress-induzierten Zelltod zumindest nach 24-stündiger Behandlung mit TUNI oder TFP zwischen RPMI 8226 und NALM-6 vorliegt (Abb. 4.16). Wird spezifisch in die ER-Ca²⁺-Homöostase mittels TG eingegriffen, so besteht ebenso kein Unterschied, jedoch nach Inkubation der Zellen mit IONO, welches die globale Ca²⁺-Homöostase beeinflusst (Abb. 4.17). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die RPMI 8226 und/oder NALM-6 Zellen vor pharmakologisch induziertem ER-Stress geschützt sind. In der Tat hängt der programmierte Zelltod von den Interaktionen zwischen anti- (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1) und proapoptotischen Proteinen (BIM, BAD, BAK, BAX) aus der Bcl-2-Familie ab (Czabotar *et al.*, 2014; Chipuk *et al.*, 2010; Adams und Cory, 2007). All diese Proteine besitzen die Bcl-2-Homologie-Motive (BH-Motive) 1-4, wobei die anti-apoptotischen Proteine das BH3-Motiv der pro-apoptotischen Proteine bindet und diese somit im inaktiven Zustand gehalten werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in humanen multiplen Myelom-Zelllinien anti-apoptotische Proteine, vor allem Mcl-1, überexprimiert werden und somit für das Überleben wichtig sind (Wuillème-Toumi *et al.*, 2005; Gomez-Bougie *et al.*, 2004; Derenne *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Dies wurde durch weitere Studien unterstützt, in denen durch Verwendung von hoch-affinen niedermolekularen Verbindungen (engl. small molecules) wie ABT-737 oder Navitoclax (Nav), welche selektiv Bcl-2 und Bcl-X_L inhibieren, Apoptose in verschiedenen multiple Myelom-Zelllinien induziert werden konnte (Bodet *et al.*, 2011; Tse *et al.*, 2008; Chauhan *et al.*, 2007; Oltersdorf *et al.*, 2005) (Kline *et al.*, 2007). Allerdings reicht schon die alleinige Inhibition von Bcl-2 durch Venetoclax (Ven) aus, um den programmierten Zelltod in humanen Myelom-Zelllinien und primären Zellen aus Patienten einzuleiten (Touzeau *et al.*, 2014). Zusätzlich bewirkt eine Inkubation mit BTZ in Kombination mit Ven in einer B-Lymphozyten-Zelllinie nach einer Xenotransplantation eine stärkere Apoptose als BTZ allein, sowie einen Rückgang des Tumolvolumens (Punnoose *et al.*, 2016).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde überprüft, ob Proteine aus der Bcl-2-Familie wichtig für das Überleben von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen sind. Aus diesem Grund wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nav (Inhibitor von Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w), Ven (selektiver Bcl-2-Inhibitor), A-1155463 (A-11, selektiver Bcl-X_L-Inhibitor) oder A-1210477 (A-12, Mcl-1-Inhibitor) für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels

Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Auch hier wiesen die RPMI 8226 ~10 % und die NALM-6 Zellen ~1-2 % PI-positive Zellen auf (siehe Anhang, Abb. 6.5), weshalb die Werte zur besseren Darstellung von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert wurden. Die Inkubation mit Nav hatte eine Zunahme der PI-positiven Zellen in beiden Zelllinien zur Folge (Abb. 4.22 A). Allerdings scheinen RPMI 8226 Zellen bei Konzentrationen von 0,5-1 μM sensibler zu reagieren, wobei ab einer Konzentration von 5 μM der prozentuale Anteil toter NALM-6 Zellen annähernd gleich ist (~50-60 %). Das gleiche Muster ist auch nach Behandlung mit Ven zu beobachten. Bei Konzentrationen von 1-10 μM Ven weist die RPMI 8226 Zelllinie eine erhöhte Sensitivität auf, wohingegen bei maximaler verwendeter Konzentration (20 μM Ven) sich der Wert beider Zelllinien bei ~50 % annähert (Abb. 4.22 B). Die selektive Inhibition von Bcl-X_L durch A-11 bewirkte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der toten Zellen in der RPMI 8226 Zelllinie auf ~35 %, wohingegen der maximale Wert bei NALM-6 Zellen lediglich ~10 % betrug (Abb. 4.22 C). Im Gegensatz dazu hat eine Inhibition von Mcl-1 durch A-12 in NALM-6 Zellen keinen Effekt, wobei in RPMI 8226 Zellen lediglich die höchste Konzentration von 20 μM einen Anstieg auf ~20 % zur Folge hatte (Abb. 4.22 D).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die RPMI 8226 Zellen die anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie zum Überleben benötigen, da diese Zellen anfälliger (d.h. bei niedrigeren Konzentrationen) auf eine Inhibition der Proteine reagieren. Allerdings scheint alleinig Bcl-2 sowohl in RPMI 8226, als auch in NALM-6 eine wichtige Rolle zu spielen, da der prozentuale Anteil der PI-positiven Zellen nahezu dem Anteil nach Inhibition von Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w entspricht. Zusätzlich kommt für Bcl-X_L zum Überleben der RPMI 8226 Zellen eine eher untergeordnete Rolle zu. Außerdem scheint Mcl-1 für das Überleben von NALM-6 Zellen keine Rolle zu spielen.

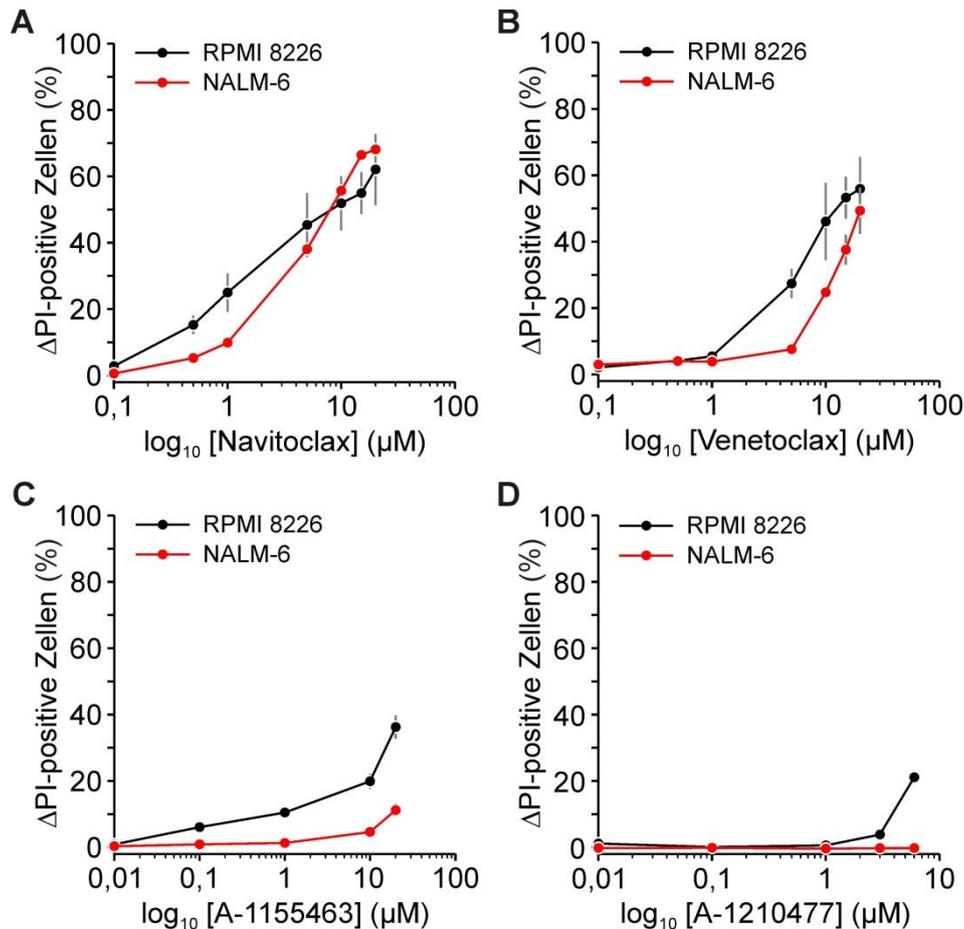


Abbildung 4.22. Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Inhibition der anti-apoptischen Proteine aus der Bcl-2-Familie. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Navitoclax (Nav, Inhibitor von Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w), Venetoclax (Ven, selektiver Bcl-2-Inhibitor), A-1155463 (A-11, selektiver BCL-X_L-Inhibitor) oder A-1210477 (A-12, Mcl-1-Inhibitor) für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Angegeben sind die Kontrolle-subtrahierten Werte, die in Abbildung 4.26 gezeigt sind. Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass ER-Stress in Myelom-Zelllinien durch die Inhibition von Bcl-2 durch Ven einen vermehrten Zelltod zur Folge hat (Gomez-Bougie *et al.*, 2016; Punnoose *et al.*, 2016), wurden die Zellen mit ausgewählten Konzentration von Nav, Ven, A-11 und A-12 in Kombination mit 1 µM TG, 2,5 µM IONO, 25 µg/ml TUNI, 2 mM DTT oder 12 µM TFP in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Diese Konzentrationen der ER-Stressoren wurden gewählt, da hier ein ähnlicher prozentualer Anteil PI-positiver Zellen in beiden Zelllinien detektiert werden konnte (Abb. 4.17 und 4.18). Die Zellen wurden zusätzlich mit Nav in den Konzentrationen 100 und 500 nM, Ven mit 500 nM und 1 µM, A-11 mit 10 nM und 100 nM oder A-12 mit 1 und 3 µM behandelt, da die niedrigen

Konzentrationen annähernd keinen Effekt auf die Viabilität hatten (Abb. 4.22) und mit den jeweils höheren Konzentrationen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der toten Zellen überprüft werden sollte. Wie schon zuvor konnte eine initiale PI-positivie Färbung in 10 % der RPMI 8226 und 1-2 % der NALM-6 Zellen beobachtet werden (siehe Anhang, Abb. 6.6), weshalb die Werte zum besseren Vergleich von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert wurden. Davon ausgehend (siehe Anhang, Abb. 6.7) wurden die Werte normalisiert, indem die Kontrolle-subtrahierten Werte der alleinigen Behandlung mit den ER-Stressoren auf den Wert 1 gesetzt und dazu die Werte der zusätzlichen Behandlung mit den Bcl-Inhibitoren in Relation gesetzt wurden (Abb. 4.23).

Die Behandlung mit 1 μM TG in Kombination mit Nav oder Ven bewirkte eine ~2-3-fache, mit A-11 eine ~2-fache und mit A-12 eine ~1,3-fache Zunahme toter RPMI 8226 Zellen (Abb. 4.23 A). Diese Werte waren jedoch in den NALM-6 Zellen deutlich erhöht. Die zusätzliche Behandlung mit Nav resultierte in einer 6-13-fachen, mit Ven 9-11-fachen, mit A-11 3-4-fachen Zunahme der PI-positiven Zellen, wohingegen die Werte sich nach Behandlung mit A-12 halbierten. Extreme Unterschiede konnten nach Inkubation mit 2,5 μM IONO und Nav oder Ven beobachtet werden (Abb. 4.23 B). Hierbei wiesen die RPMI 8226 Zellen eine ~4-8-fache Zunahme der toten Zellen auf, wohingegen in NALM-6 Zellen die Werte um das bis zu ~80-fache erhöht waren. Mildere Effekte wurden nach zusätzlicher Inkubation mit A-11 beobachtet, da diese Werte in RPMI 8226 Zellen um das ~3-6-fache und in NALM-6 Zellen um das ~7-11-fache gestiegen war. Lediglich die höchste verwendete Konzentration von A-12 (3 μM) bewirkte eine Verdopplung der toten RPMI 8226 Zellen, wohingegen der IONO-induzierte Zelltod in NALM-6 Zellen durch die Inhibition von Mcl-1 verhindert werden konnte. Auch nach Behandlung mit 25 $\mu\text{g/ml}$ TUNI in Kombination mit Nav oder Ven wiesen die RPMI 8226 Zellen im Vergleich zu den NALM-6 Zellen eine geringere Zunahme der toten Zellen auf (Abb. 4.23 C). Somit erfuhren die RPMI 8226 Zellen eine Zunahme nach zusätzlicher Behandlung mit Nav oder Ven jeweils um das ~4-7-fache und ~5-fache, wohingegen in NALM-6 Zellen diese Zunahme das ~4-13-fache bzw. ~15-fache betrug. Die Zunahme PI-positiver Zellen nach zusätzlicher Inhibition von Bcl-X_L mit A-11 war in RPMI 8226 Zellen um das ~3-5-fache leicht erhöht im Vergleich zu NALM-6 Zellen (~2-3-fach). Auch hier bewirkte lediglich die Inkubation mit 3 μM A-12 in RPMI 8226 Zellen eine weitere Zunahme (~1,3-fach), wobei im Gegensatz dazu der Wert in NALM-6 Zellen wieder um die Hälfte verringert war. Eine Zunahme um das ~2-3-fache konnte nach

4. Ergebnisse

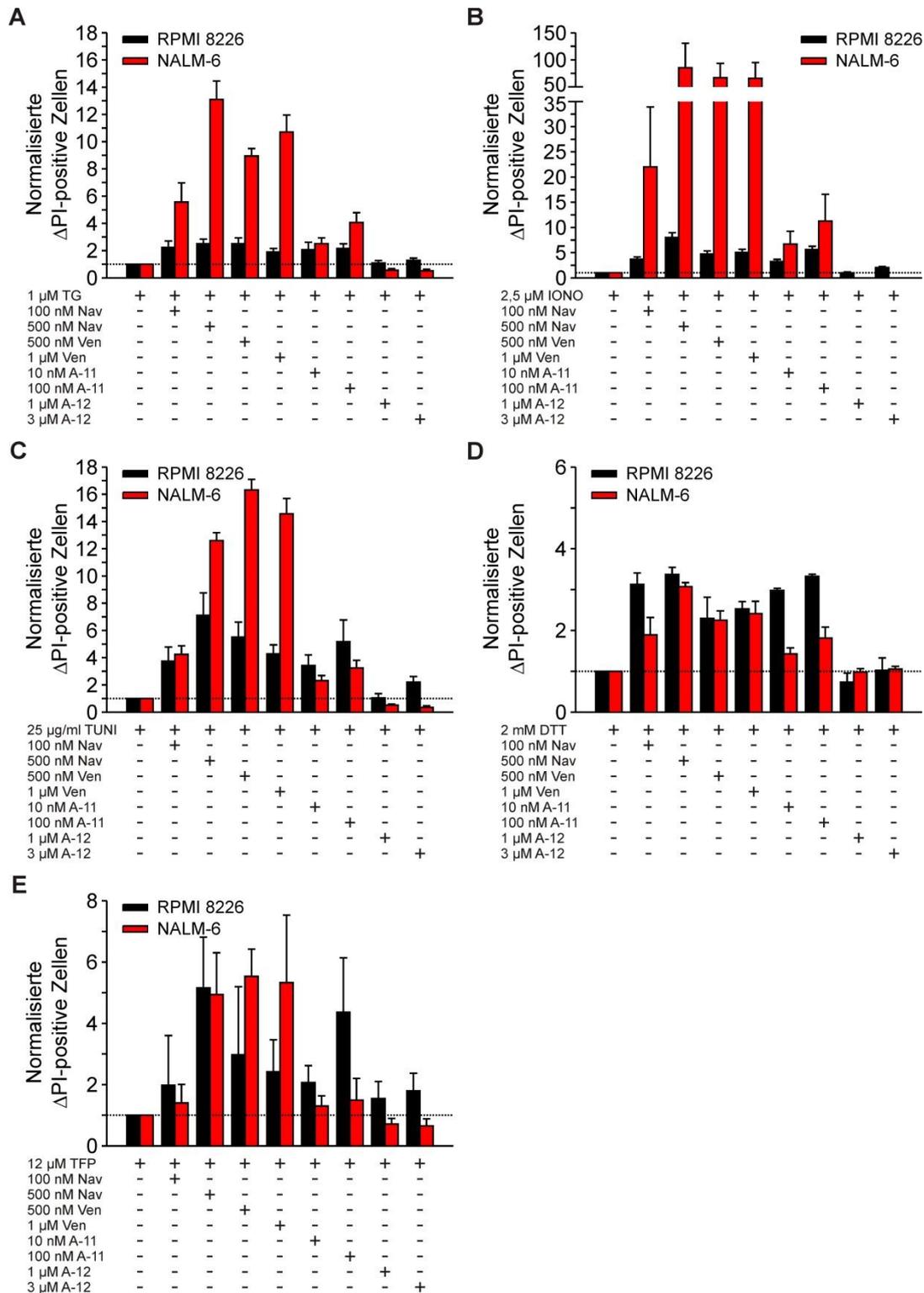


Abbildung 4.23. Normalisierte Darstellung der Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach pharmakologisch-induzierten ER-Stress und additionaler Inhibition der anti-apoptotischen Proteine aus der Bcl-2-Familie. Die Zellen wurden mit 1 μM TG (A), 2,5 μM IONO (B), 25 μg/ml TUNI (C), 2 mM DTT (D) oder 12 μM TFP (E) in Kombination mit Nav (100 oder 500 nM), Ven (500 nM oder 1 μM), A-11 (10 oder 100 nM) oder A-12 (1 oder 3 μM) in Kulturmedium für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Zur Auswertung wurden die Kontrolle-subtrahierten Werte (Abb. 4.29) der ER-Stressoren auf den Wert 1 und dazu die Werte der zusätzlichen Behandlung mit den Bcl-Inhibitoren in Relation gesetzt. Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

Behandlung mit 2 mM DTT in Kombination mit Nav oder Ven in beiden Zelllinien beobachtet werden (Abb. 4.23 D). Alleinig die Behandlung mit A-11 hatte eine stärkere Zunahme in RPMI 8226 (~3-fach) im Vergleich zu NALM-6 Zellen (~1,5-fach) zur Folge. Die Inhibition von Mcl-1 durch A-12 hatte bei keiner verwendeten Konzentration eine drastische Zunahme der toten Zellen zur Folge. Die Inkubation mit 12 µM TFP und Nav bewirkte in beiden Zelllinien einen Anstieg der toten Zellen um das ~2-5-fache (Abb. 4.23 E). Jedoch zeigten die RPMI 8226 Zellen nach zusätzlicher Behandlung mit Ven eine ~3-fache Zunahme, wohingegen NALM-6 Zellen einen ~5-fachen Anstieg aufwiesen. Im Gegensatz dazu resultierte aus der zusätzlichen Inkubation mit A-11 eine Zunahme um das ~2-4-fache in RPMI 8226 und um das 1,5-fache in NALM-6 Zellen. Die Behandlung mit A-12 verursachte in RPMI 8226 wiederum nur einen leichten Anstieg (~1,2-fach), wohingegen in NALM-6 Zellen dieser Wert verringert war (~0,5).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass je nach induziertem ER-Stress unterschiedliche Proteine aus der Bcl-2-Familie für eine protektive Rolle wichtig sind. So scheint in NALM-6 Zellen hauptsächlich Bcl-2 für das Überleben wichtig zu sein, da eine spezifische Inhibition von Bcl-2 einen ähnlichen prozentualen Anteil toter Zellen wie die gleichzeitige Inhibition von Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w hervorruft. Auf der anderen Seite scheint neben Bcl-2 auch Bcl-X_L in RPMI 8226 Zellen einen anti-apoptotischen Effekt zu haben. Während die zusätzliche Inhibition von Mcl-1 den Zelltod in NALM-6 Zellen meistens verhindert hat, spielt der protektive Effekt von Mcl-1 in RPMI 8226 Zellen gegen pharmakologisch induzierten ER-Stress eine eher untergeordnete Rolle.

4.6.6 Untersuchung der Viabilität verschiedener Zelllinien nach Behandlung mit Eeyarestatin

Eeyarestatin 1 (ES1) und Eeyarestatin 2 (ES2) sind niedermolekulare Verbindungen, welche ursprünglich als Inhibitoren des Proteintransports vom ER in das Cytosol für eine proteasomale Degradation entdeckt wurden (Fiebiger *et al.*, 2004). Weitere Studien haben gezeigt, dass ES1 die AAA-ATPase p97 inhibiert, welche wichtig für den retrograden Transport vom ER ins Cytosol während ERAD ist (siehe Kapitel 2.5) und somit eine Akkumulierung von polyubiquitinierten Proteinen hervorruft (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008). Eine solche ES1-induzierte Akkumulierung von nicht-translozierten Proteinen im Cytosol kann die UPR aktivieren und somit den programmierten Zelltod einleiten, wobei hier

vermutlich die 5-Nitrofurandomäne eine entscheidende Rolle spielt (McKibbin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). *In vitro* und *in vivo* Studien in HeLa Zellen haben gezeigt, dass ES1 den cotranslationalen Proteintransport auf der Ebene von Sec61-Komplexen inhibiert (Cross *et al.*, 2009). Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit ES1 oder dessen Analogon ES24 (enthält nur die 5-Nitrofurandomäne) zu einem verstärkten Sec61 α -induzierten Ca²⁺-Efflux in stabil D1ER-exprimierenden HEK-293 Zellen führt (Gamayun *et al.*, 2018). Hierbei zeigt ein drittes Analogon, ESR35 (enthält nur die aromatische Domäne), keinerlei Effekte weder auf die Akkumulierung von polyubiquitinierten Proteinen, noch auf den Sec61 α -induzierten Ca²⁺-Efflux (Gamayun *et al.*, 2018; Cross *et al.*, 2009). Somit sollte die Rolle von ES1 und dessen Analoga im Hinblick auf den Ca²⁺-induzierten Zelltod untersucht werden. Um dies zu untersuchen wurden 4 im Labor befindliche, etablierte Zelllinien ausgewählt, welche hinsichtlich der Viabilität nach Behandlung mit TG sensitiv und nicht sensitiv reagierten. Zur Überprüfung der Sensitivität wurden die HEK-293, HeLa, INS-1 und NALM-6 Zelllinie mit 1 μ M TG für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen, um mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 3.2.3) den prozentualen Anteil der toten Zellen in allen Zelllinien nach direkter Störung der ER-Ca²⁺-Homöostase zu ermitteln (Abb. 4.24). Hierbei hatte diese Behandlung keinen Effekt in HEK-293 (118 %) und HeLa Zellen (106 %), wohingegen die Viabilität um 20-25 % in INS-1 (81 %) und NALM-6 Zellen (75 %) gesunken ist. Somit weisen die INS-1 und NALM-6 Zellen im Vergleich zu HEK-293 und HeLa Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber TG auf. Falls ein höherer prozentualer Anteil nach Behandlung mit ES1 und dessen Analoga zu beobachten ist, kann somit eine Korrelation zwischen Ca²⁺ und Zelltod hergestellt werden.

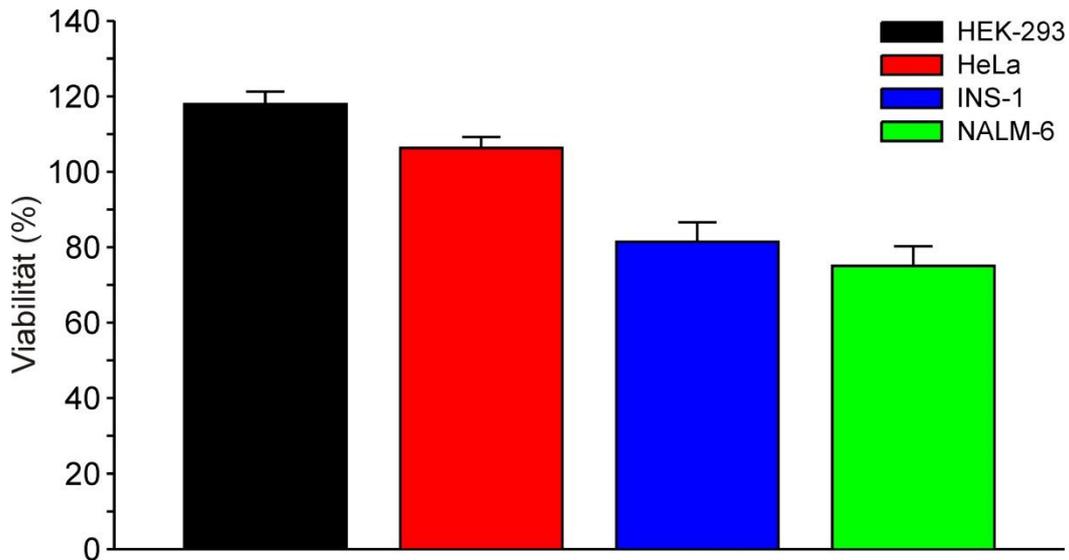


Abbildung 4.24. Untersuchung der Viabilität verschiedener Zelllinien nach Störung der ER- Ca^{2+} -Homöostase. HEK-293, HeLa, INS-1 oder NALM-6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{M}$ TG in Kulturmedium für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen ($n = 3$).

Aus diesem Grund wurden die Zellen mit den Konzentrationen 0,1, 1, 5, 10 und $20 \mu\text{M}$ ES1, ES24 oder ESR35 für 24 h in Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen ebenfalls mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Zur Darstellung der Viabilität wurde der Wert der jeweiligen Kontrolle auf 100 % und die Substanz-induzierte Veränderung in Relation gesetzt. Hierbei zeigten die HEK-293 und NALM-6 Zellen die höchste Sensitivität gegenüber ES1 auf, da die Viabilität mit der höchsten verwendeten Konzentration auf bis zu 3-5 % reduziert wurde. Im Gegensatz dazu betrug dieser Wert bei INS-1 ~15 % und bei HeLa Zellen lediglich ~52 % (Abb. 4.25 A). Wie schon oben beschrieben hat ESR35 keinen Effekt auf die Polyubiquitinierung von Proteinen oder den Sec61 α -induzierten Ca^{2+} -Efflux. Damit übereinstimmend hatte ESR35 in allen untersuchten Zelllinien keinen nennenswerten Einfluss auf die Viabilität. Ebenso wenig wurde die Viabilität von HEK-293 und HeLa Zellen durch die Inkubation mit ES24 verändert, wodurch die Werte mit denen nach der Behandlung mit ESR35 gleichzusetzen waren. Allerdings konnte in INS-1 und NALM-6 Zellen nach Inkubation mit $20 \mu\text{M}$ ES24 eine reduzierte Viabilität von jeweils ~63 % und ~37 % beobachtet werden. Als nächstes wurde die Viabilität nach Behandlung mit $20 \mu\text{M}$ ES24 gegen die Viabilität nach Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ TG aufgetragen, wobei letzteres als entsprechendes Pendant zu einem verstärkten Ca^{2+} -

4. Ergebnisse

Efflux angesehen werden kann (Abb. 4.25 B). Hierbei konnte eine lineare Korrelation zwischen TG- und ES24-sensitiven Zellen festgestellt werden.

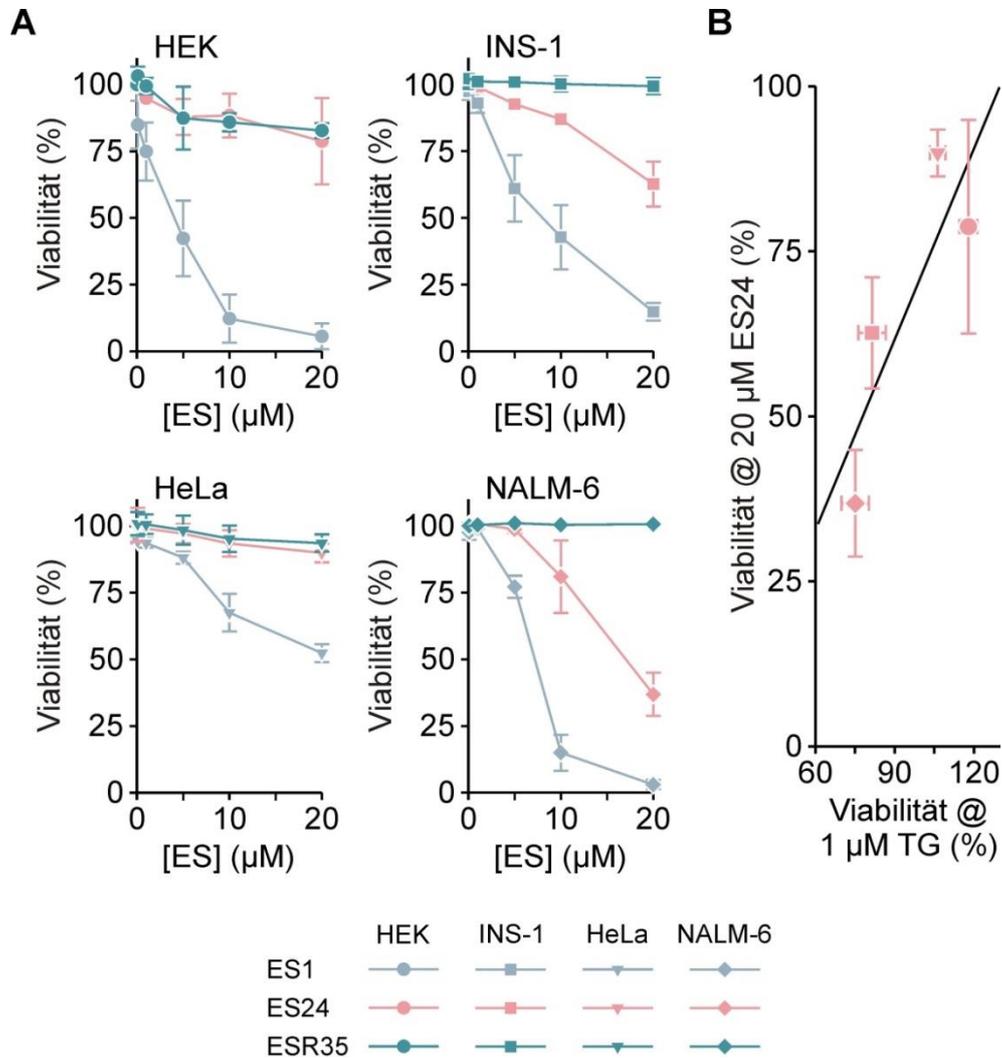


Abbildung 4.25. Untersuchung der Viabilität von verschiedenen Zelllinien nach Behandlung mit ES1, ES24 und ESR35. HEK-293, HeLa, INS-1 oder NALM-6 Zellen wurden mit 0,1, 1, 5, 10 oder 20 µM ES1, ES24 oder ESR35 in Kulturmedium für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. A) Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). B) Dargestellt sind die Viabilität nach Behandlung mit 20 µM ES24 und 1 µM TG (Abb. 4.31), wodurch eine lineare Korrelation dargestellt wird. Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (n = 3) (übernommen und verändert nach Gamayun *et al.*, 2018).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine lineare Korrelation zwischen TG- und ES24-sensitiven Zellen (INS-1 und NALM-6) vorliegt, jedoch nicht für ES1 oder ESR35. Somit liegt es nahe, dass der TG- und ES24-induzierte Zelltod von einer veränderten Ca²⁺-Homöostase oder -Mobilisierung bestimmt wird, wohingegen die Effekte bei einer ES1-Inkubation durch die p97-Inhibition dominiert wird.

4.7 Untersuchungen der Ca^{2+} -Homöostase in ER-Subkompartimenten mittels GcAMP

In dieser Arbeit wurde bisher die Ca^{2+} -Mobilisierung in humanen Zellen mittels TG- und IONO-Zugabe mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 gemessen. Fura-2 lässt allerdings aufgrund der cytosolischen Lokalisation nur eine indirekte Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ zu. In Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} entspricht der Ca^{2+} -Efflux aus dem ER der gemessenen TG-Antwort, was aus dem Produkt einer Konstanten (K_{Efflux}) und der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ berechnet werden kann. Jedoch kann durch Verwendung von GECIs (engl. genetically encoded calcium indicators) der Ca^{2+} -Efflux, abhängig von der Lokalisation, direkt bestimmt werden. Zu diesen Indikatoren zählen die GCaMPs (siehe Kapitel 3.2.6). Diese Einzel-Fluorophor-Sensoren bestehen, wie der Name schon sagt, aus nur einem Fluorophor (meist GFP) und einem Komplex aus CaM und einer Mutante des CaM-bindenden Peptides der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (M13) (Broussard *et al.*, 2014; Nagai *et al.*, 2001). Eine Bindung bzw. Dissoziation von Ca^{2+} an den CaM-M13-Komplex verursacht eine Konformationsänderung, wodurch die Intensität variiert und als Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ interpretiert wird (de Juan-Sanz *et al.*, 2017; Broussard *et al.*, 2014; Nagai *et al.*, 2001). Es wurden bereits einige Konstrukte beschrieben, welche eine Lokalisation in der ER-Membran oder im ER-Lumen zulassen. So wurde die Signalsequenz von Calreticulin (CRT) mit dem N-Terminus von GCaMP und an den C-Terminus das ER-Retentionssignal von BiP fusioniert, um eine ER-lumenale Lokalisation zu ermöglichen (de Juan-Sanz *et al.*, 2017; Henderson *et al.*, 2015). In einer Studie konnte ebenso mittels GCaMP6f, aufgrund dessen schnellen Kinetik, hohen Affinität und exzellentem Kontrast, einzelne Aktionspotentiale in Nervenzellen und Ca^{2+} -Fluktuationen in den Dornenfortsätzen (engl. dendritic spines) von Nervenzellen gemessen werden (Chen *et al.*, 2013). In einer anderen Arbeit konnte durch die Fusion von GCaMP6f an Triadin 1 oder Junctin, welche mit RyR in Skelettmuskelzellen assoziiert sind und diese aktivieren, schnelle Ca^{2+} -Fluktuationen (~63 ms), die auf eine fokale Region innerhalb der Zelle begrenzt waren (Breite: ~540 nm), detektiert werden (Shang *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2009; Goonasekera *et al.*, 2007; Vassilopoulos *et al.*, 2005; Györke *et al.*, 2004). Durch Verwendung unterschiedlicher GCaMP6f-Konstrukte, die zum einen in der ER-Membran und zum anderen in der Plasmamembran lokalisiert sind, konnten weiterhin die Ca^{2+} -Signale in Astrozyten in einer subzellulären Auflösung detektiert werden, was die zukünftige Bedeutsamkeit dieser Ca^{2+} -Sensoren unterstreicht (Niwa *et al.*, 2016).

ERAD beschreibt den Prozess, bei dem fehlgefaltete Proteine vom ER-Lumen in das Cytosol für den proteasomalen Abbau transportiert werden (siehe Kapitel 2.5). Es konnte gezeigt werden, dass vermutlich diese Qualitätskontrolle und Retrotranslokation in einem Subkompartiment des ERs, ERQC genannt (engl. ER quality compartment), stattfindet (Kamhi-Nesher *et al.*, 2001). Hierbei konnte anhand des Vorläufersubstrates des humanen Asialoglykoproteinrezeptors H2a gezeigt werden, dass fehlgefaltete Proteine in diesem Kompartiment akkumulieren. Nach der Synthese assoziiert H2a mehr und mehr mit der Sec61 β -Untereinheit, was für eine weitere Rolle des Sec61-Komplexes in der Retrotranslokation spricht, was zusätzlich durch eine Akkumulierung von HRD1, p97 und Ubiquitin in diesem Kompartiment untermauert wird (Kondratyev *et al.*, 2007). H2a ist ein etabliertes ERAD-Substrat, welches endogen von Hepatozyten exprimiert wird und dort die membran-gebundene Form in eine sezernierungsfähige Form gespalten wird (D'Souza und Devarajan, 2015). Wird H2a jedoch in anderen Zelltypen exprimiert, kann das Substrat nicht mehr gespalten werden und wird demnach durch ERAD proteasomal abgebaut (Leitman *et al.*, 2013; Kamhi-Nesher *et al.*, 2001; Tolchinsky *et al.*, 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Vorläufersubstrat der ungespaltenen, membrangebunden Form von H2a normal transloziert wird und keine UPR auslöst (Ayalon-Soffer *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte in diesem Kompartiment nach Inhibition des Proteasoms höhere Konzentrationen der Chaperonen CRT und Calnexin (CNX), aber nicht von BiP oder PDI, beobachtet werden (Frenkel *et al.*, 2004; Kamhi-Nesher *et al.*, 2001). Das Protein Herp spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der Membran-Assoziation von Komponenten der ERAD-Maschinerie im ERQC, wie z.B. der UPR-Stresssensor PERK oder HRD1, welches Substrate für ERAD vorbereitet (Leitman *et al.*, 2014). Da in diesem Kompartiment eine Anreicherung von Sec61 β beobachtet wurde, liegt es nahe, dass der Sec61-Komplex eine Rolle in diesem Kompartiment spielen könnte. Da neben der Hauptfunktion, nämlich die Proteintranslokation über und die Integration in die ER-Membran, der Sec61-Komplex als ubiquitärer Ca²⁺-permeabler Kanal beschrieben wurde (Lang *et al.*, 2011) und keine Daten über Ca²⁺-Mobilisierung im ERQC bekannt sind, sollte dies in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Dr. Gerardo Lederkremer (Tel Aviv Universität, Tel Aviv, Israel) untersucht werden.

Hierfür wurden HEK-293 mit dem Plasmid H2a-GFP (Abb. 4.26 A) mittels Lipofektion transfiziert (siehe Kapitel 3.2.2.3) und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Transfektion und die ER-Morphologie der Zellen mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (ZEISS) dokumentiert (Abb. 4.26 B).

Dadurch konnte bestätigt werden, dass H2a im ER exprimiert wird. Am selben Tag wurden des Weiteren Zellen neben der Kontrolle mit dem irreversiblen Proteasom-Inhibitor Lactacystin (Lac) in einer Konzentration von 15 μM für 6 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 behandelt (Abb. 4.26 C). Die Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren bewirkt eine Akkumulierung von H2a-GFP im ERQC (Leitman *et al.*, 2013; Kondratyev *et al.*, 2007; Frenkel *et al.*, 2004; Kamhi-Nesher *et al.*, 2001). Tatsächlich konnte bei einer Behandlung mit Lac eine Akkumulierung in der Nähe des Nukleus beobachtet werden, was vermutlich dem ERQC entspricht (Abb. 4.26 C c-d). Durch dieses Protokoll ist es gelungen in HEK-293 Zellen durch das Plasmid H2a-GFP und die Behandlung mit Lac das ERQC sichtbar zu machen.

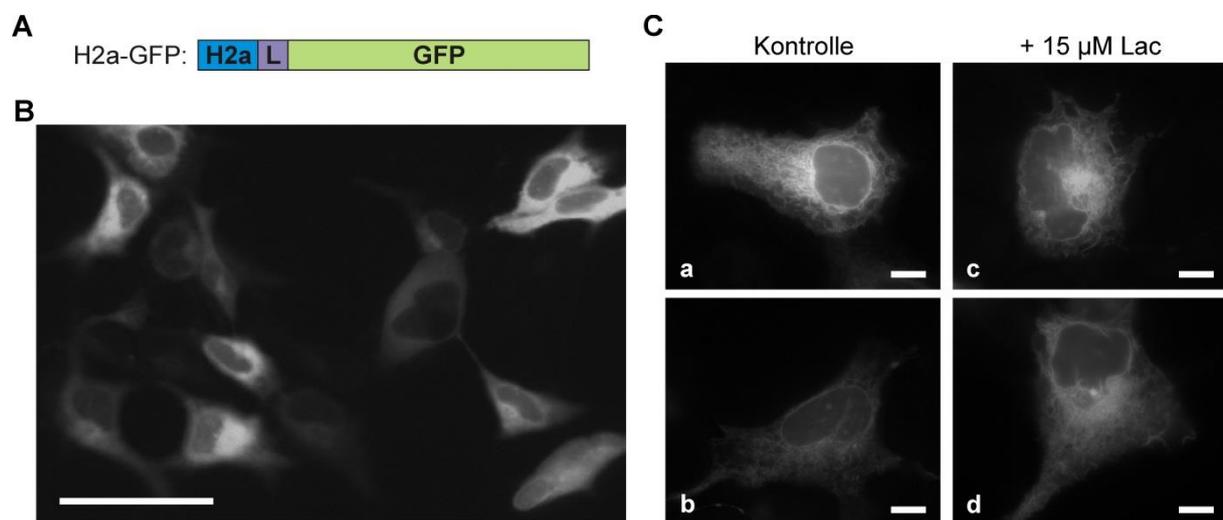


Abbildung 4.26. Lokalisation von H2a-GFP transfizierten HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofektion mit dem Plasmid H2a-GFP transfiziert und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. A) Schematische Darstellung des H2a-GFP Plasmids. Um eine ER-Lokalisation zu gewährleisten, befindet sich am Ende des H2a-Proteins das ER-Retentionssignal von BiP (KDEL). H2a ist durch einen Linker (L) an GFP fusioniert. B) Fluoreszenzaufnahme der transfizierten HEK-293 Zellen. Skalierungsbalken: 50 μm . C) In einer vergrößerten Ansicht sind Kontroll-Zellen (a-b) und Lactacystin (Lac)-behandelte Zellen (c-d) dargestellt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 15 μM Lac für 6 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Skalierungsbalken: 10 μm .

Als nächstes wurden die HEK-293 Zellen mittels Lipofektion mit dem Plasmid ER-GCaMP-150 transfiziert (siehe Kapitel 3.2.2.3) und für 48 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert (Abb. 4.27 A). ER-GCaMP-150 wird ebenso wie H2a-GFP im ER-Lumen durch eine Fusion mit der Signalsequenz von CRT und dem ER-Retentionssignal von BiP exprimiert. Allerdings lassen sich durch diesen Sensor Ca^{2+} -Fluktuationen im ER detektieren. Um auch hier das Expressionsmuster von ER-GCaMP-150 zu kontrollieren, wurde 48 h nach Transfektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops die Lokalisation des Ca^{2+} -Sensors

Um nun Ca^{2+} -Fluktuationen innerhalb des ERQC zu ermöglichen, wurden HEK-293 Zellen als nächstes mit dem Plasmid 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert (siehe Kapitel 3.2.2.3) und für 24-48 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert (Abb. 4.28 A). Dieses Plasmid wurde durch Verwendung der beiden Plasmide H2a-GFP und ER-GCaMP-150 hergestellt (siehe Kapitel 3.1.4). Transfizierte Zellen zeigen auch hier eine ER-typische Expression (Abb. 4.28 B, links: Kontrolle). Wie schon oben erwähnt führt eine Inkubation mit einem Proteasom-Inhibitor zu einer Akkumulierung von H2a im ERQC. Um zu überprüfen, ob dies auch mit diesem Konstrukt der Fall ist, wurden die Zellen für 7 h mit 15 μM Lac in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert (Abb. 4.28 B, rechts: + 15 μM Lac). Hier konnte eine deutliche Akkumulierung des Konstruktes in der Nähe des Nukleus beobachtet werden (gelbe Pfeile), wohingegen eine reduzierte Fluoreszenz in der Peripherie detektiert wurde (rote Pfeile). Um hier näher die IONO-induzierte Änderung der ERQC-Morphologie zu untersuchen, wurden Zellen nach der 7-stündiger Behandlung mit 15 μM Lac zusätzlich mit 10 μM IONO in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ inkubiert (Abb. 4.28 C). Auch hier konnte im unbehandelten Zustand eine Akkumulierung nahe des Nukleus (gelbe Pfeile) und eine geringere Fluoreszenz des peripheren ERs (rote Pfeile) beobachtet werden (Abb. 4.28 C, Kontrolle). Jedoch scheint eine IONO-induzierte Fragmentierung des ERs lediglich das periphere ER zu betreffen, wohingegen das ERQC nur geringe morphologische Änderung in einem Zeitraum von 4 min nach IONO-Zugabe aufweist (Abb. 4.28 C, Mitte, rechts). Somit zeigen die Ergebnisse, dass das Plasmid 150-GCaMP-H2a im ER-Lumen exprimiert wird und vermutlich die Funktion des Ca^{2+} -Sensors durch die Kopplung an H2a nicht gestört wird.

4. Ergebnisse

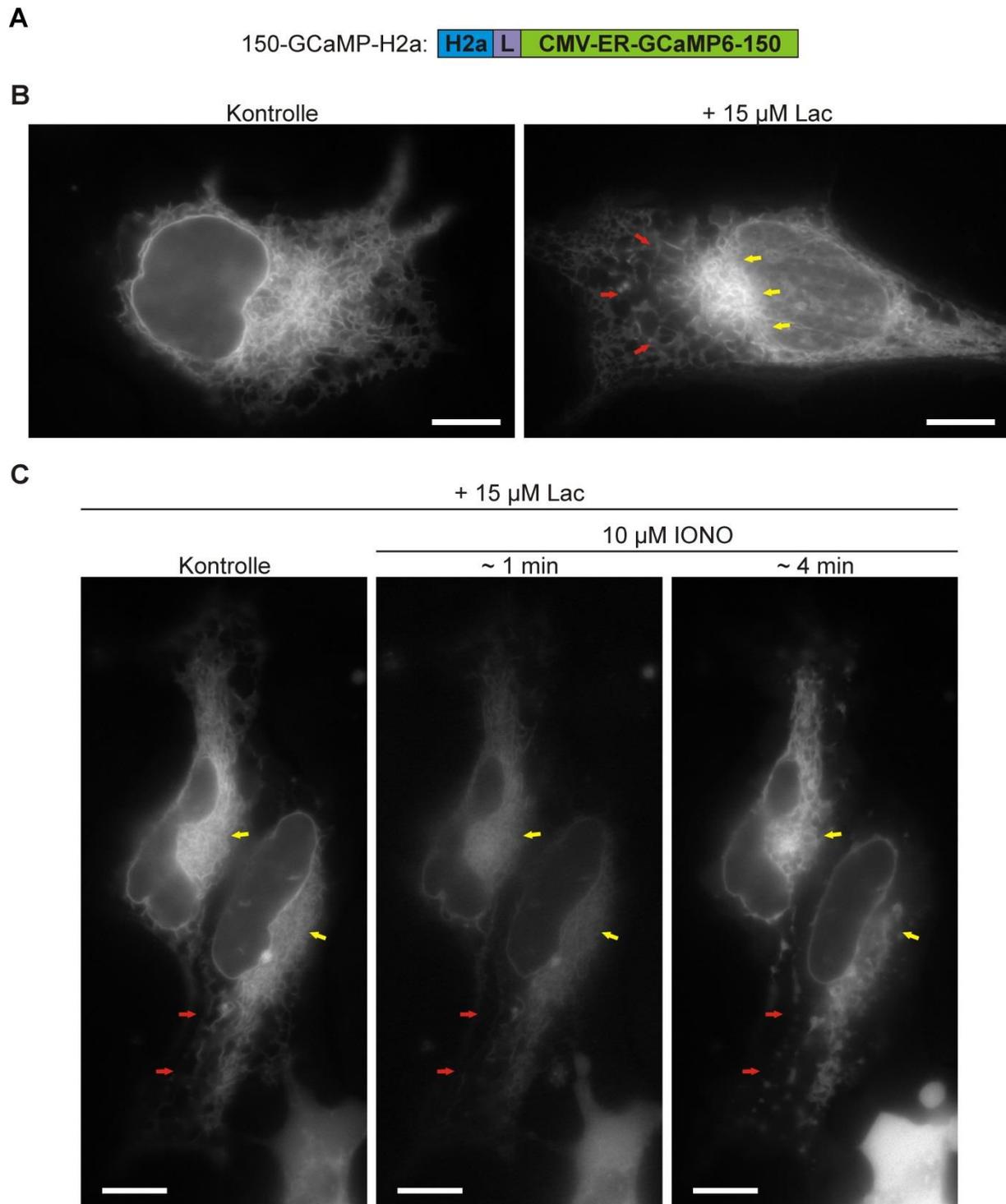


Abbildung 4.28. Lokalisierung von 150-GCaMP-H2a in HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit dem Konstrukt 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert und für 24-48 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. A) Schematische Darstellung des Plasmids 150-GCaMP-H2a. Dieses Konstrukt wurde aus den beiden Plasmiden H2a-GFP und ER-GCaMP-150 hergestellt. B) Unbehandelte, transfizierte HEK-293 Zelle (Kontrolle) und für 7 h mit 15 μ M Lac in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelte Zelle (+ 15 μ M Lac). Gelbe Pfeile deuten auf ERQC und rote Pfeile auf reduzierte Fluoreszenz des peripheren ERs hin. C) Lac-behandelte Zellen (Kontrolle) und zusätzlich mit 10 μ M IONO in Anwesenheit von 1 mM [Ca²⁺]_{ext} für 1-4 min inkubierte Zellen. Gelbe Pfeile deuten auf ERQC und rote Pfeile auf reduzierte Fluoreszenz des peripheren ERs hin. Skalierungsbalken: 10 μ m.

Da die grundlegende Idee darin bestand zu überprüfen, ob generell eine Messung von Ca^{2+} -Fluktuationen im ERQC möglich ist, wurden als nächstes die HEK-293 Zellen mit dem Plasmid 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert (siehe Kapitel 3.2.2.3) und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Ca^{2+} -Mobilisierung der Zellen mit Hilfe des iMIC Fluoreszenzmikroskops mit entsprechendem Filterset für GFP (Exzitation: 480 nm, Emission: ≥ 515 nm) und entsprechender Software der Firma TILL photonics in Verbindung mit dem Polychrome V detektiert. Da die Belichtungszeit und Dauer des Experimentes von der jeweiligen Expressionsstärke und des Versuchsaufbaus abhing, wurden keine einheitlichen Parameter bei den Experimenten verwendet.

Der Coverslip, auf dem die Zellen gewachsen sind, wurde in die Messkammer eingespannt und 300 μl der entsprechenden Messlösung hinzugegeben. Im ersten Versuch wurde die Messung in nom. frei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ gestartet und nach 1 min 300 μl der TG-Lösung in einer finalen Konzentration von 1 μM hinzugegeben (Abb. 4.29 A). Hier konnte eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz-Intensität beobachtet werden. Nach weiteren 7 min wurde 600 μl der IONO-Lösung in einer Konzentration von 10 μM in Anwesenheit von 5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ appliziert, um alle Membranen zu permeabilisieren und eine Erhöhung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ zu erreichen, was durch eine ansteigende Fluoreszenz-Intensität bestätigt wurde. Im nächsten Versuch wurden die Zellen für 6-7 h mit 10 nM BTZ in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 prä-inkubiert, wodurch 150-GCaMP-H2a im ERQC akkumulieren und so eine Messung der Ca^{2+} -Mobilisierung ermöglicht werden soll. Tatsächlich konnten 3 Zellen gemessen werden, bei denen das ERQC vom restlichen ER abgegrenzt werden konnte (Abb. 4.29 B). Da die Intensität des peripheren ERs aufgrund des tubulären Netzwerks gering erscheint, weist das ERQC eine deutlich höhere Fluoreszenz auf. Auch hier bewirkte 1 μM TG in nom. frei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ einen deutlichen Rückgang der Intensität, welche durch Zugabe von 10 μM IONO in Anwesenheit von 5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ wieder erhöht werden konnte. Im nächsten Schritt wurde der basale Wert der Zellen in nom. frei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ für 1 min gemessen und anschließend 10 μM IONO in Anwesenheit von 25 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ appliziert, um eine maximale Erhöhung der Intensität zu erreichen (Abb. 4.29 C). Durch dieses Protokoll konnte eine 1,5-4-fache Zunahme der Fluoreszenz-Intensität im Vergleich zum basalen Wert der gesamten ER-Fläche erreicht werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Messung der TG- und IONO-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung innerhalb des ERQC mit der Expression von 150-GCaMP-H2a in HEK-293 Zellen möglich ist.

4. Ergebnisse

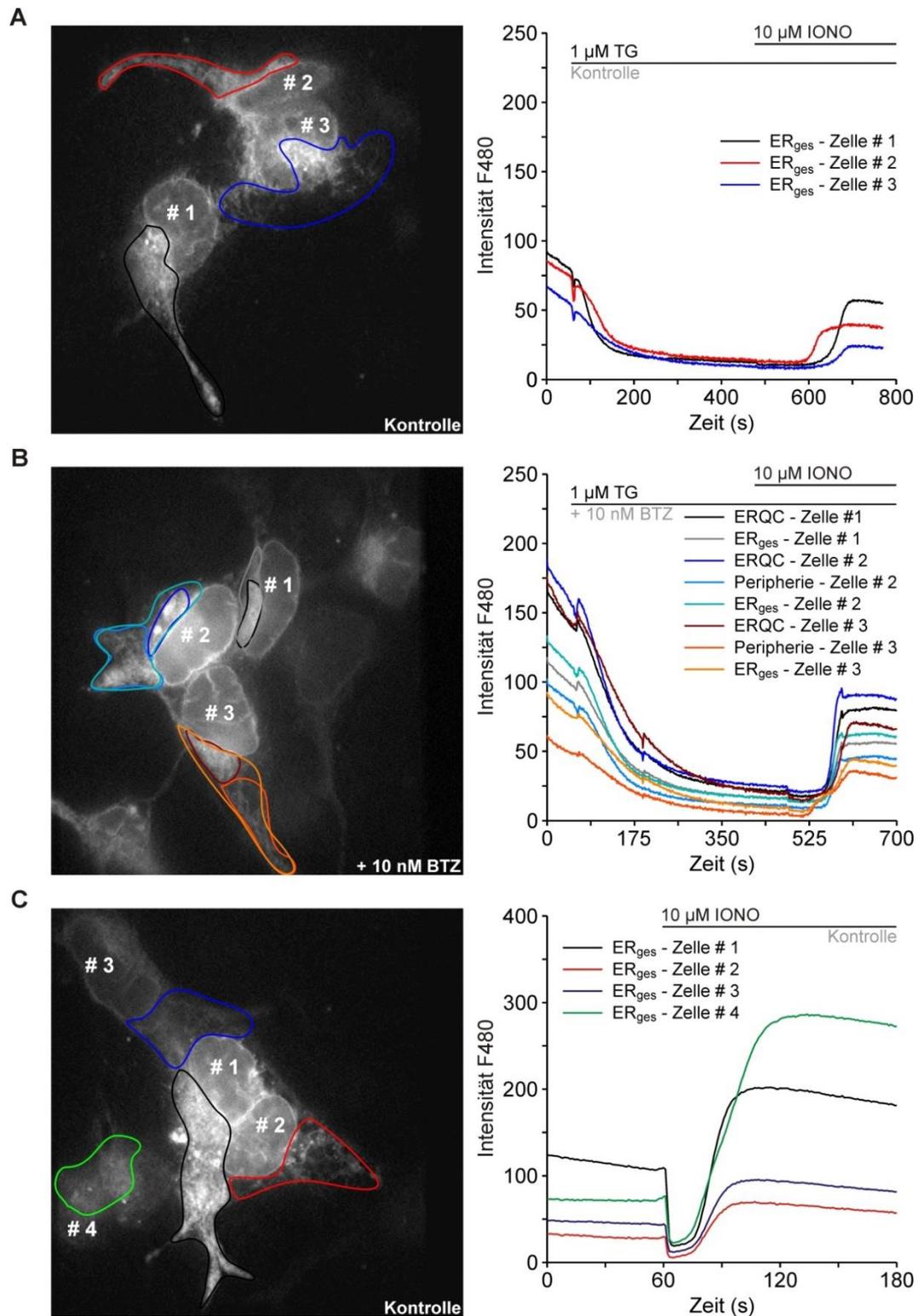


Abbildung 4.29. TG- und IONO-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in 150-GCaMP-H2a transfizierten HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit dem Plasmid 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. A) Links: Fluoreszenzaufnahme un behandelter Zellen (Kontrolle) mit markierten Bereich, welcher zur Messung der Ca^{2+} -Änderungen verwendet wurde. Verschiedene Zellen sind durch # 1, # 2 usw. dargestellt. Die gleiche Farbkodierung wurde für die Fluoreszenzaufnahmen und Graphen (rechts) ausgewählt. Rechts: Intensitätsänderungen des Ca^{2+} -Sensors der im linken Bild dargestellten Bereiche nach Zugabe von 1 μM TG (nom. frei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) und 10 μM IONO (5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$). B) Darstellung wie in A, mit der Ausnahme, dass die Zellen mit 10 nM BTZ für 6-7 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 präinkubiert worden sind (+ 10 nM BTZ). C) Darstellung wie in A, nur dass eine Ca^{2+} -Mobilisierung allein mit 10 μM IONO in Anwesenheit von 25 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ hervorgerufen wurde. ERQC - engl. ER quality compartment, Peripherie - peripheres ER, ER_{ges} - gesamte ER-Fläche.

Da durch die Verwendung von TG der passive Ca^{2+} -Efflux aus dem ER gemessen wurde, sollte im nächsten Schritt der aktive Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER detektiert werden. Hierzu wurde Carbachol (CCH) verwendet, was die Muskarinrezeptoren aktiviert, die wiederum durch G_q -Protein gekoppelte Rezeptoren PLC induzieren und somit durch die Spaltung von PIP_2 in DAG und IP_3 eine IP_3R -vermittelte Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER ermöglicht wird (Ishii und Kurachi, 2006). In HEK-293 Zellen konnte dadurch in Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} CCH-induzierte Oszillationen beobachtet werden (Luo *et al.*, 2001; Shuttleworth und Thompson, 1998). Diese Oszillationen resultieren aus dem IP_3R -vermittelten Ca^{2+} -Efflux aus dem ER und dem Wiederauffüllen durch die SERCA (Jafri und Keizer, 1995). Für diese Versuche wurden die Zellen wieder mit dem Plasmid 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert (siehe Kapitel 3.2.2.3) und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Messung wurde erst nach der Zugabe von 100 μM CCH in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ gestartet (Abb. 4.30). Unbehandelte Zellen wiesen hierbei deutliche Ca^{2+} -Oszillationen auf, wobei die Amplitude über die Zeit leicht abnahm (Abb. 4.30 A, Kontrolle). Daneben wurden die Zellen entweder mit 20 nM BTZ (Abb. 4.37 B, + 20 nM BTZ) oder 15 μM Lac (Abb. 4.30 C, + 15 μM Lac) für 6-7 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 prä-inkubiert, um Ca^{2+} -Oszillationen innerhalb des ERQC messen zu können. BTZ-behandelte Zellen wiesen vergleichsweise geringe Oszillationen auf, was vermutlich aus der geringen initialen Fluoreszenz-Intensität resultiert. Im Gegensatz dazu wies das ERQC und das gesamte ER von Lac-behandelten Zellen Ca^{2+} -Oszillationen auf, welche mit denen von unbehandelten Zellen vergleichbar war. Durch diese Ergebnisse wird weiterhin unterstützt, dass unabhängig von der Art und Weise wie eine Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER induziert wird, Ca^{2+} -Fluktuationen innerhalb des ERs und speziell ERQC mit Hilfe des 150-GCaMP-H2a Konstruktes gemessen werden können.

4. Ergebnisse

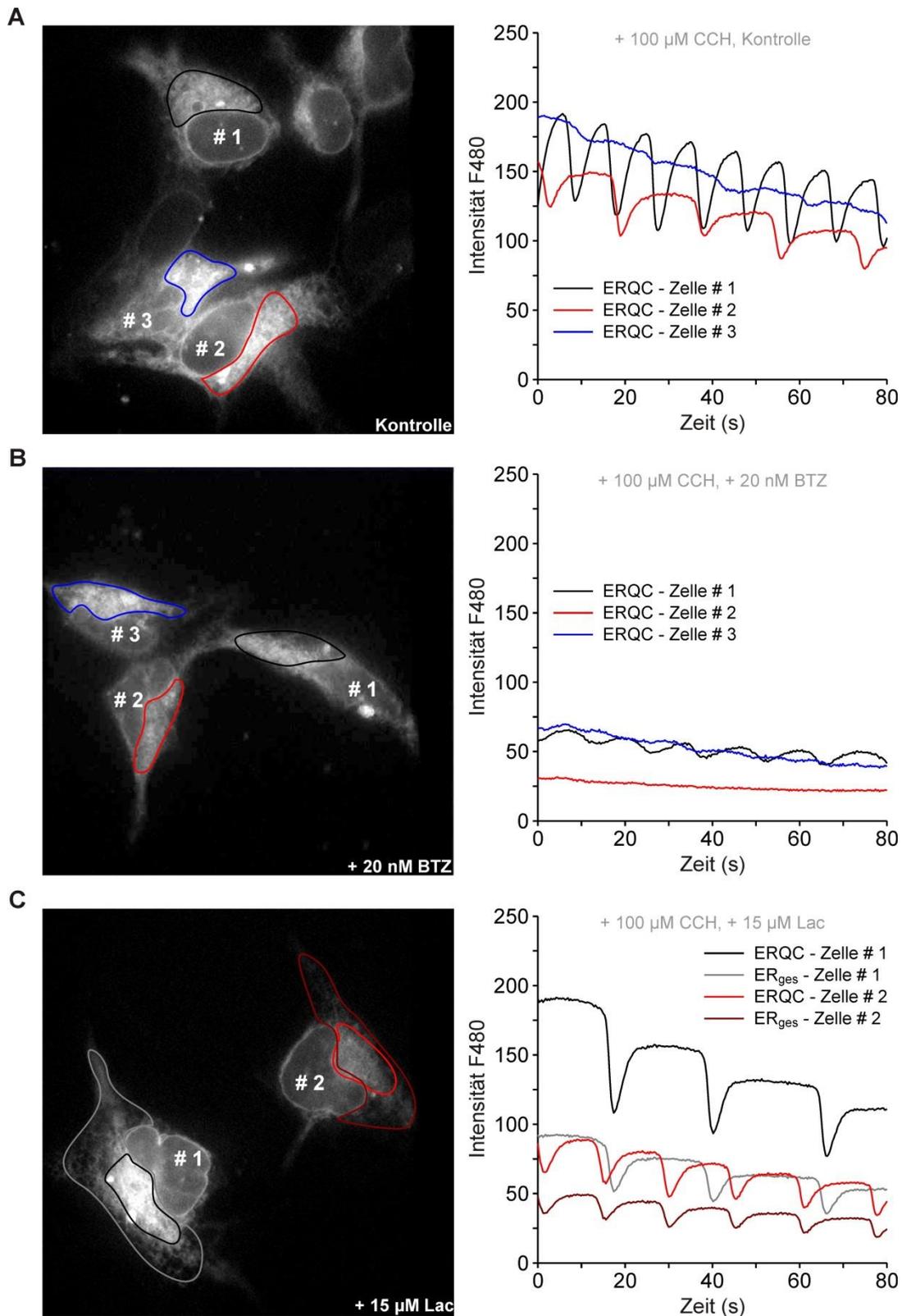


Abbildung 4.30. Carbachol-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in 150-GCaMP-H2a transfizierten HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit dem Plasmid 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Messungen wurden an unbehandelten Zellen (A) oder für 6-7 h mit 20 nM BTZ (B) oder 15 μM Lac (C) prä-inkubierten Zellen durchgeführt. Links: Fluoreszenzaufnahme der gemessenen Zellen mit markierten Bereich, welcher zur Messung der Ca^{2+} -Änderungen verwendet wurden. Unterschiedliche Zellen sind durch # 1, # 2 usw. dargestellt. Rechts: Die gleiche Farbkodierung wurde für die Fluoreszenzaufnahmen und Graphen (rechts) ausgewählt. Die Zellen wurden vor Start der Messung mit 100 μM Carbachol (CCH) in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ behandelt und erst dann wurden die Ca^{2+} -Änderungen für 80 s detektiert. ERQC - engl. ER quality compartment, ER_{ges} - gesamte ER-Fläche.

Im nächsten Versuch wurde der basale Wert für 60 s gemessen und dann 100 μM CCH in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ hinzugegeben (Abb. 4.31). Nach weiteren 200 s wurde 1 μM TG appliziert, um eine Ca^{2+} -Entleerung des ERs zu ermöglichen, wodurch die CCH-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen unterbunden wurden. Unbehandelte Zellen wiesen hierbei deutliche Oszillationen und eine TG-induzierte Abnahme der Fluoreszenz-Intensität auf. Dies konnte auch in mit 15 μM Lac prä-inkubierten Zellen bestätigt werden, in denen zusätzlich das ERQC gemessen wurde. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass mit dem Ca^{2+} -Sensor 150-GCaMP-H2a, in Verbindung mit der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren wie BTZ oder Lac, die Messung von TG-, IONO- oder CCH-induzierter Ca^{2+} -Mobilisierung in dem ER-Subkompartiment ERQC möglich ist.

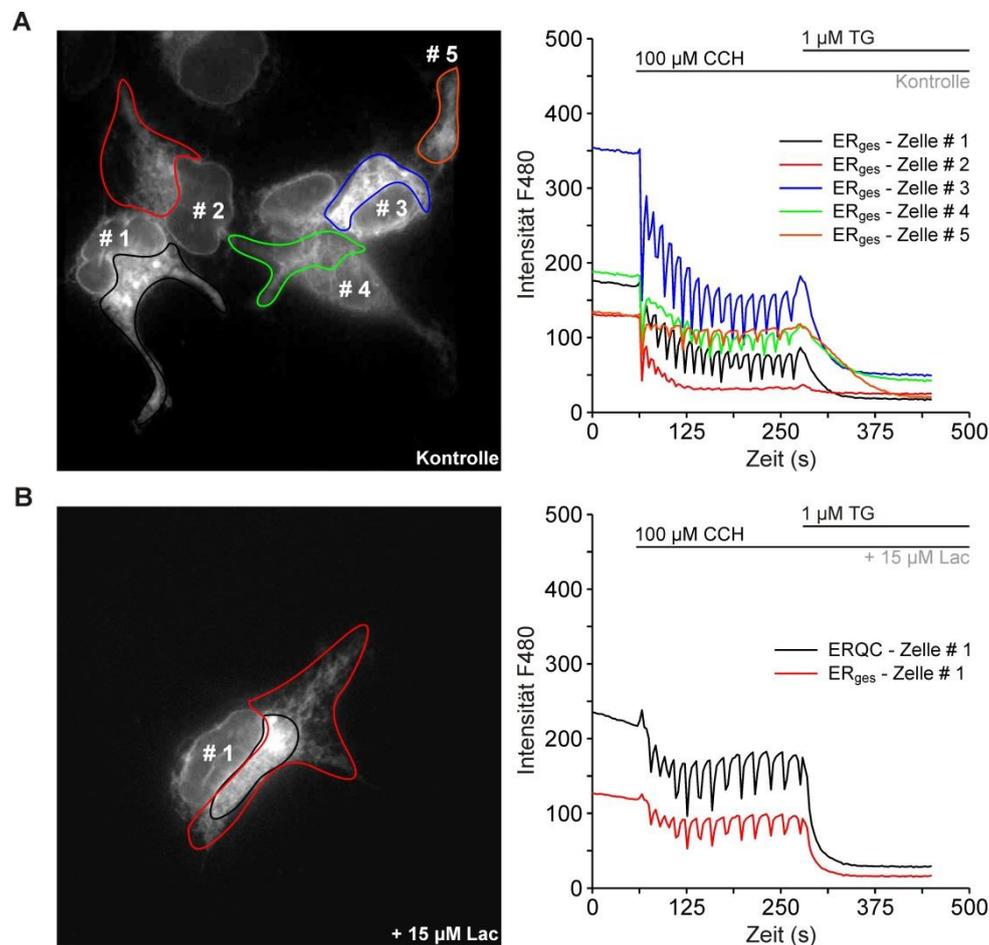


Abbildung 4.31. CCH- und TG-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in 150-GCaMP-H2a transfizierten HEK-293 Zellen. Die Zellen wurden mit dem Plasmid 150-GCaMP-H2a mittels Lipofektion transfiziert und für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Messungen wurden an unbehandelten Zellen (A) oder für 6-7 h mit 15 μM Lac (B) prä-inkubierten Zellen durchgeführt. Links: Fluoreszenzaufnahme der gemessenen Zellen mit markierten Bereich, welcher zur Messung der Ca^{2+} -Änderungen verwendet wurden. Unterschiedliche Zellen sind durch # 1, # 2 usw. dargestellt. Die gleiche Farbkodierung wurde für die Fluoreszenzaufnahmen und Graphen (rechts) ausgewählt. Rechts: Nach 60 s wurde 100 μM CCH in Anwesenheit von 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ appliziert und nach weiteren 200 s 1 μM TG. Nach insgesamt 450 s endete die Aufnahme. ERQC - engl. ER quality compartment, ER_{ges} - gesamte ER-Fläche.

5. Diskussion

Die eukaryotische Zelle besitzt evolutionär bedingt mehrere Reaktionsräume innerhalb des Cytosols. Durch diese Kompartimentierung können zum einen gleichzeitig spezialisierte Funktionen ablaufen und zum anderen Ca^{2+} -Konzentrations-Gradienten aufrechterhalten werden, die für diese Funktionen benötigt werden. So hat Ca^{2+} pleiotrope Funktionen inne, die von Proliferation bis hin zum programmierten Zelltod reichen (siehe Kapitel 2.6). Das ER ist nicht nur essentiell für die Proteinsynthese und -modifikation, sondern dient der Zelle zusätzlich als Hauptcalciumspeicher. Die zentrale Komponente des Proteintransports stellt der ER-membranständige Sec61-Komplex dar (siehe Kapitel 2.2). Darüber hinaus wurde die Sec61 α -Untereinheit als Ca^{2+} -Leak-Kanal beschrieben, welcher durch mehrere Proteine reguliert wird (siehe Kapitel 2.6.3). In dieser Arbeit sollte die Ca^{2+} -Homöostase von Zellen mit viel und wenig ER untersucht werden und dahingehend der Sec61 α -induzierte Ca^{2+} -Leak miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollte überprüft werden, in wie fern sich ein veränderter Ca^{2+} -Leak oder eine Beeinflussung der Funktion von Komponenten des Sec61-Komplexes auf die Viabilität der Zellen auswirkt.

5.1 Anpassung von Immunzellen an eine hohe Proteinsyntheserate

In dieser Arbeit wurden die beiden Zelllinien RPMI 8226 und NALM-6 verwendet, welche jeweils als Plasmazell- und prä-B-Zell-Modell verwendet werden (siehe Kapitel 3.1.6). Die RPMI 8226 Zellen sezernieren große Mengen an λ -leichte Ketten von Igs und sollten somit im Vergleich zu NALM-6 Zellen ein größeres ER-Volumen aufweisen. Um dies zu überprüfen wurde mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie gezeigt, dass in der Tat die RPMI 8226 Zellen deutlich mehr ER-Fläche aufweisen und damit eine erhöhte „ER sheet“ Länge und Anzahl der ER-Membran-assoziierten Ribosomen einhergeht (Abb. 4.1 F-H). Darüber hinaus scheinen die RPMI 8226 Zellen ihren Energiehaushalt an die hohe Proteinsynthese-Maschinerie angepasst zu haben, da diese Zellen eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien, sowie eine gesteigerte Zahl von Cristae pro Zelle aufweisen (Abb. 4.1 D und 4.2 I), in denen die mitochondriale ATP-Synthase lokalisiert ist (Cogliati *et al.*, 2016; Gilkerson *et al.*, 2003; Paumard *et al.*, 2002).

Es ist bereits bekannt, dass während der Differenzierung einer B-Zelle das ER eine starke Umstrukturierung erfährt. So konnte in murinen und humanen primären B-Zellen und B-Zelllinien gezeigt werden, dass mit einer Differenzierung neben der Volumen-Zunahme des ERs, die generelle Zellgröße zunimmt, die Proteinsynthese gesteigert ist und die Anzahl der Ribosomen erhöht ist (Kirk *et al.*, 2010; Shaffer *et al.*, 2004; Wiest *et al.*, 1990), was mit den Ergebnissen in dieser Arbeit übereinstimmt (Abb. 4.1). Die Expansion des ERs scheint eng an die UPR geknüpft zu sein, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass XBP-1 vermutlich entscheidend für die Volumen-Zunahme des ERs und die Differenzierung in Plasmazellen ist (Todd *et al.*, 2009; Shaffer *et al.*, 2004; Calame *et al.*, 2003; Iwakoshi *et al.*, 2003; Calfon *et al.*, 2002; Reimold *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 1999). Allerdings spielt in diesem Zusammenhang das Protein Blimp-1 (engl. B lymphocyte induced maturation protein-1) eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass XBP-1 zwar in NALM-6 und RPMI 8226 Zellen exprimiert wird (Jiang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2012; Mimura *et al.*, 2012), jedoch wird Blimp-1 nur in RPMI 8226 Zellen exprimiert, was generell in Plasmazellen hochreguliert wird und für die Induktion von XBP-1 während der irreversiblen Differenzierung eine Rolle spielt (Nasir *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2002; Shaffer *et al.*, 2002; Angelin-Duclos *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 1994). Auch wenn in NALM-6 Zellen bisher nur der mRNA-Gehalt von XBP-1 detektiert wurde, kann vermutet werden, dass der aktive Transkriptionsfaktor XBP-1s in RPMI 8226 Zellen auf Proteinebene in größerer Menge vorhanden ist (Jiang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016).

Zudem scheint mit der Expansion des ERs während der Differenzierung eine erhöhte Ig-Synthese und erhöhte Menge cytosolischer Proteine einherzugehen (Wiest *et al.*, 1990). Es ist jedoch bekannt, dass eine solche Erhöhung der Kapazität des ERs der anschließend folgenden hohen Ig-Syntheserate vorausgeht. So wurde gezeigt, dass ER-residente und mitochondriale Proteine nach Stimulation hochreguliert werden, bevor die eigentliche Ig-Synthese stattfindet, um somit der Faltungskapazität und metabolischen Anforderungen der hohen Proteinsyntheserate gerecht zu werden (Kirk *et al.*, 2010; van Anken *et al.*, 2003). In diesem Zuge konnte ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 4.1 E), dass sich während der Differenzierung die Anzahl der Mitochondrien erhöht (Kirk *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde ein Anstieg der mitochondrialen Masse beschrieben (Shaffer *et al.*, 2004; Wiest *et al.*, 1990), was mit den in dieser Arbeit verwendeten Zellmodellen nicht bestätigt werden konnte (Abb. 4.2 F). Jedoch ist anzunehmen, dass, nichtsdestotrotz, die

RPMI 8226 Zellen an den Energiebedarf angepasst sind, da die Anzahl der Cristae pro Zelle erhöht sind (Abb. 4.2 I), in denen wie schon oben erwähnt die ATP-Synthase lokalisiert ist.

Für die Anpassung an die hohe Proteinsyntheserate müssen entsprechende Proteine hochreguliert werden. In dieser Arbeit konnte mittels Western-Blot (siehe Kapitel 3.2.1) auf Proteinebene nachgewiesen werden, dass in den RPMI 8226 Zellen mit der Zunahme des ER-Volumens und Energiebedarfs ein höherer Gehalt von ER-residenten Proteinen und dem mitochondrialen Strukturprotein MIC19 korreliert (Abb. 4.3). Diese Zunahme von MIC19 stimmt mit der erhöhten Anzahl von Mitochondrien in den RPMI 8226 Zellen überein (Abb. 4.1 E). Auch wenn Sec61 α schon in verschiedenen primären Immunzellen und Zelllinien detektiert wurde (Baron *et al.*, 2016; Zehner *et al.*, 2015; Rock, 2006), wurde die Änderung des Sec61 α -Gehaltes während der Differenzierung von B-Zellen weder untersucht noch quantifiziert. Bisher lag der Fokus auf der generellen Erhöhung des ER-Volumens, Anstieg der synthetisierten Proteine und die jeweiligen benötigten Chaperone während der Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen. In dieser Arbeit konnte erstmals eine quantitative Bestimmung des Sec61 α -Gehalts in Zellen mit niedriger und hoher Proteinsyntheserate bestimmt werden. Hierbei konnte in den RPMI 8226 Zellen eine ~5-fache Zunahme von Sec61 α im Vergleich zu NALM-6 Zellen detektiert werden (Abb. 4.3 C). Dieser Anstieg des Sec61 α -Gehalts ist für diese Zellen von großer Bedeutung, da mit einer gesteigerten Proteinsynthese die Translokationskapazität erhöht werden muss, um zellulären Stress zu vermeiden, welche in Apoptose münden könnte (Calame *et al.*, 2003). Außerdem konnte im Einklang mit der Literatur in der Plasmazelllinie RPMI 8226 ein erhöhter Proteingehalt von BiP, GRP94 und PDI detektiert werden (Rosenbaum *et al.*, 2014; Liu und Li, 2008; van Anken *et al.*, 2003; Gass *et al.*, 2002; Mezghrani *et al.*, 2001; Markus und Benezra, 1999; Paver *et al.*, 1989). Daneben ist beschrieben, dass weitere ER-residente Proteine wie GRP170, CRT und CNX ebenfalls während der Differenzierung hochreguliert werden (van Anken *et al.*, 2003). Im Vergleich dazu scheint Sec62 und Sec63 in gleicher Menge in beiden Zelllinien vorzuliegen (Abb. 4.3).

Eine mögliche Interpretation wäre, dass die beiden Proteine in NALM-6 Zellen hochreguliert sind, da wie oben beschrieben gegensätzlich andere ER-residente Proteine wie BiP, GRP94 und PDI in geringeren Mengen vorliegen. Der Sec62/Sec63-Komplex spielt eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Translokation von naszierenden Polypeptiden (siehe Kapitel 2.2). Welche Transportroute das Substrat einschlägt, hängt von verschiedenen Parametern wie

Größe des Substrats und Hydrophobizität der Signalsequenz ab, jedoch ist der Sec61-Komplex für beide Transportrouten essentiell. Da bisher keine Daten zum Gehalt für Sec62 und Sec63 in Immunzellen vorhanden sind, kann spekuliert werden, dass sich während der Differenzierung und der damit einhergehenden Änderung der Proteinsynthese ebenso die Transportroute ändert. Dies wird dahingehend unterstützt, dass die schwere- und leichte-Kette von Antikörpern, wie sie Plasmazellen synthetisieren, cotranslational über die ER-Membran transloziert werden (Haryadi *et al.*, 2015; Feige *et al.*, 2010; Bergman und Kuehl, 1979). Mit dieser cotranslationalen Transportroute und der in diesem Zusammenhang stehenden Steigerung der Proteinsynthese, werden auch zur Erhöhung der Ig-Faltungskapazität spezielle Chaperone wie z.B. BiP, GRP94 und PDI benötigt, welche in RPMI 8226 Zellen (Abb. 4.3) um das ~5-fache erhöht waren (Feige *et al.*, 2010; Melnick *et al.*, 1994; Roth und Pierce, 1987; Bole *et al.*, 1986; Haas und Wabl, 1983). Somit könnte der gleiche Proteingehalt von Sec62 und Sec63 in beiden Zelllinien für einen Wechsel der Transportroute während der Differenzierung stehen, wobei in RPMI 8226 Zellen zusätzlich Sec61 α hochreguliert wird.

Da während der Differenzierung neben dem ER auch andere Organellen wie Mitochondrien oder der Golgi-Apparat eine Umstrukturierung bzw. Expansion erfahren (Kirk *et al.*, 2010; Shaffer *et al.*, 2004; Wiest *et al.*, 1990), wurde der Proteingehalt von unterschiedlichen cytosolischen und nukleären Proteinen überprüft (Abb. 4.3). In Korrelation mit einer erhöhten Anzahl von Ribosomen an der ER-Membran (Abb. 4.1 H), konnte eine 1,5-2-fache Erhöhung der ribosomalen Proteine der kleinen und großen Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 4.3 C), was die höhere Proteinsynthese der RPMI 8226 Zellen weiterhin untermauert. Da p68 vermutlich eine Rolle in der Zellproliferation spielt (Yang *et al.*, 2007a; Yang *et al.*, 2005) und die RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 langsamer wachsen, könnte der verminderte p68-Gehalt in den RPMI 8226 Zellen (Abb. 4.3 C) diesen Sachverhalt widerspiegeln. In beiden verwendeten Zelllinien war jedoch der GAPDH-Gehalt unverändert, was mehrere Ursachen haben kann. Zum einen wird GAPDH oft als sogenanntes „housekeeping“-Protein als Ladekontrolle für Western-Blots verwendet, was eine gleiche Menge an GAPDH in unterschiedlichen Zellen oder Bedingungen voraussetzt (Wu *et al.*, 2012). Daneben scheint jedoch GAPDH in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Apoptose, DNA-Reparatur oder Autophagie involviert zu sein (Azam *et al.*, 2008; Colell *et al.*, 2007; Hara und Snyder, 2006), was aufgrund diesen multiplen Funktionen keine exakte Begründung für den gleichen Proteingehalt in den beiden verwendeten Zelllinien zulässt. GAPDH ist jedoch auch in die Glykolyse involviert, da dieses Enzym Glyceraldehyd-3-Phosphat in D-Glycerat 1,3-

Bisphosphat in Anwesenheit von NAD^+ und anorganischen Phosphaten konvertiert und somit die Bildung von NADH und ATP begünstigt (Tristan *et al.*, 2011; Ralser *et al.*, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von GAPDH in murinen peritonealen Makrophagen die aerobe Glykolyse und deren immunologische Aktivierung verhindert wird, weshalb GAPDH eine Rolle in der Regulation von Immunzellen zugesprochen wird (Kornberg *et al.*, 2018; Takaoka *et al.*, 2014). Durch diese Ergebnisse lässt sich spekulieren, dass aufgrund der unterschiedlichen energetischen Bedürfnisse der beiden Zelllinien, vermutlich der Proteingehalt von GAPDH an den entsprechenden Energiehaushalt angepasst wird. Somit können die beiden Zelllinien RPMI 8226 und NALM-6 im Hinblick auf die Morphologie des ERs und der entsprechenden Proteinen als Modell für jeweils ausdifferenzierte und nicht-differenzierte B-Zellen betrachtet werden, was mit einem veränderten Sec61 α -Gehalt korreliert.

5.2 Anpassung der Ca^{2+} -Homöostase an die hohe Proteinsyntheserate in Immunzellen

Eine der Hauptzielsetzungen dieser Arbeit war die Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase in Zellen mit viel und wenig ER. Hierbei lag der Fokus auf dem Sec61 α -induzierten Ca^{2+} -Leak und dessen Involvierung in die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Sec61 α wurde bereits auf molekularer Ebene als ubiquitärer Ca^{2+} -permeabler Kanal beschrieben und wird durch mehrere Proteine reguliert und kann pharmakologisch moduliert werden (siehe Kapitel 2.6.3). Die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen wurden zur Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 AM beladen und die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ mit einem entsprechenden Mikroskop und Software detektiert (siehe Kapitel 3.2.6.1).

5.2.1 Erhöhte Ca^{2+} -Mobilisierung in Zellen mit expandiertem ER

Bisher ist in der Literatur über eine vergleichende Charakterisierung von Zellen mit viel und wenig ER nur wenig bekannt, weshalb in dieser Arbeit zum ersten Mal die Änderung der Ca^{2+} -Homöostase in solchen Zellen gezeigt werden konnte. Speziell von Plasmazellen bzw. RPMI 8226 Zellen sind keine Ca^{2+} -Imaging-Daten vorhanden. Für NALM-6 Zellen existieren nur geringfügig solche Daten, wobei die meisten Experimente nicht kalibriert wurden, im Kontext einer Antigen-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung stehen oder der TG-induzierte Ca^{2+} -

Leak zwar gemessen wurde, aber nicht im Fokus lag (Abdoul-Azize *et al.*, 2017; Hermanson *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2000; Kuwahara *et al.*, 1996). Somit ist eine ausführliche Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase, vor allem im Zusammenhang mit ER-Volumen oder Sec61 α -Gehalt, auch in NALM-6 Zellen nicht existent. Um eben eine solche Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen durchzuführen, wurden hierfür zunächst gängige Messprotokolle zur

- a) Demaskierung des undefinierten Ca^{2+} -Leaks aus dem ER mittels TG,
- b) Bestimmung der totalen zellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ durch IONO und
- c) Messung des SOCE durch Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} nach einer TG-induzierten Speicherentleerung

angewandt. Hierbei zeigten die RPMI 8226 Zellen in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (zero $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) im Vergleich zu NALM-6 Zellen einen durch 1 μM TG-induzierten ~ 10 -fach stärkeren Ca^{2+} -Leak und ~ 6 -fach höheren Ca^{2+} -Gehalt nach Applikation von 10 μM IONO (Abb. 4.4 A-D). Daneben waren ebenso die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher in RPMI 8226 Zellen signifikant erhöht, was durch eine TG- und anschließende IONO-Zugabe bestimmt wurde (Abb. 4.4 E-G). Gleichzeitig besitzen die RPMI 8226 Zellen einen ~ 7 -fach stärkeren SOCE (Abb. 4.6 C und D).

Der Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran ist hauptsächlich durch den Ca^{2+} -Gradienten zwischen ER-Lumen und Cytosol zu erklären (Karlstad *et al.*, 2012). Dies bedeutet im Umkehrschluss, je höher die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ist, umso stärker müsste der Ca^{2+} -Leak sein. Daher könnte in RPMI 8226 Zellen durch das erhöhte ER-Volumen (Abb. 4.1 G) gleichzeitig die Ca^{2+} -Speicherkapazität des ERs zunehmen und somit der größere Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran zustande kommen (Abb. 4.4 A). Es konnte in Autophagie-defizienten T-Zellen gezeigt werden, dass das ER vergrößert ist und damit ein erhöhter zellulärer Ca^{2+} -Gehalt, gemessen an der IONO-Antwort, einhergeht (Jia *et al.*, 2011). Jedoch war der durch TG demaskierte Ca^{2+} -Leak unverändert, was darauf hindeutet, dass es diesbezüglich Zelltyp-spezifische Unterschiede geben könnte. Eine erhöhte Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem ER könnte weiterhin in Verbindung mit der Hochregulierung der Ca^{2+} -bindenden Proteinen BiP, GRP94 und PDI stehen (siehe Kapitel 2.6.2), welche die totale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ erhöhen könnten und bei einer pharmakologisch-induzierten Ca^{2+} -Mobilisierung das gebundene Ca^{2+} von den jeweiligen Chaperonen dissoziiert. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Funktion von diesen Chaperonen Ca^{2+} -abhängig ist und nach einer Speicherentleerung die Interaktionen

zwischen Chaperonen gestört ist, welche in verschiedenen Schritten der Proteintranslokation und -modifikation benötigt werden (Coe und Michalak, 2009; Michalak *et al.*, 2002; Corbett *et al.*, 1999). BiP limitiert zwar den Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Leak, jedoch führt dessen Überexpression nicht zwangsläufig zu einem verminderten Ca²⁺-Leak (Schäuble *et al.*, 2012). Des Weiteren kann die [Ca²⁺]_{ER} von der Expression unterschiedlicher SERCA-Isoformen abhängen. Hierbei zeigten jedoch beide Zelllinien eine gleiche Expression von SERCA2 (Abb. 4.3). Es ist bekannt, dass während der Differenzierung von Granulozyten und Megakaryozyten der Proteingehalt von SERCA2 ab- und von SERCA3 zunimmt und gleichzeitig der Ca²⁺-Gehalt in SERCA3-abundanten Zellen höher ist (Papp *et al.*, 2012; Lacabartz-Porret *et al.*, 2000; Launay *et al.*, 1999; Lacabartz-Porret *et al.*, 1998; Papp *et al.*, 1991). Auch wenn der SERCA3-Proteingehalt aufgrund von fehlenden Antikörpern in dieser Arbeit nicht bestimmt wurde, könnte SERCA3 somit in RPMI 8226 Zellen zur erhöhten [Ca²⁺]_{ER} und Aufrechterhaltung der Funktionen beitragen. Die Bestimmung der totalen [Ca²⁺] und der TG-insensitiven Ca²⁺-Speicher wurde mit Hilfe des Ca²⁺-Ionophors IONO durchgeführt. Werden die Zellen nur mit IONO inkubiert (Abb. 4.4 C), wird durch die Permeabilisierung aller Membranen die gesamte Ca²⁺-Mobilisierung der Zelle gemessen (Smith *et al.*, 1989), wohingegen eine IONO-Applikation nach einer TG-induzierten Speicherentleerung (Abb. 4.4 E) eine Ca²⁺-Mobilisierung des restlichen Ca²⁺ in der Zelle verursacht (Bergling *et al.*, 1998). Da die Mitochondrien als transients Ca²⁺-Speicher bekannt (siehe Kapitel 2.6.5) und deren Anzahl in RPMI 8226 Zellen signifikant erhöht sind (Abb. 4.1 E), könnten die Mitochondrien neben dem ER, wie in Abbildung 4.4 gezeigt, zur Erhöhung der totalen [Ca²⁺] beitragen und der Zelle als großer transienter Ca²⁺-Speicher dienen.

Die Ca²⁺-Homöostase der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen lässt sich insofern gut miteinander vergleichen, da beide Zelllinien die gleiche Morphologie aufweisen, was vor allem die Geometrie betrifft (Abb. 4.1 A). Mit einer TG-induzierten Erhöhung der [Ca²⁺]_{cyt} um 40-100 nM sind die Werte der NALM-6 Zellen mit denen von primären humanen und murinen T-Zellen und T-Zelllinien (DT40 und Jurkat) vergleichbar (Kircher *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018; Miederer *et al.*, 2015; Kalra *et al.*, 2000; Sugawara *et al.*, 1997). Aufgrund der gleichen Morphologie (wenig ER) und dem annähernd gleichen Durchmesser (6-7 μ m) lässt sich die Ca²⁺-Mobilisierung von B- und T-Zellen gut gegenüberstellen (Kono *et al.*, 2013; Strokotov *et al.*, 2009; Matter *et al.*, 1972). Ca²⁺-Imaging-Experimente mit Indo-1 (ratiometrischer Ca²⁺-Indikator mit niedrigerer Affinität für Ca²⁺ als Fura-2) lassen aufgrund

der fehlenden Kalibrierung des Systems lediglich die Vermutung zu, dass primäre murine B-Zellen ebenfalls einen geringen TG-induzierten Ca^{2+} -Leak aufweisen (Matsumoto *et al.*, 2011). Gleichzeitig konnte in reifen murinen B-Zellen ein TG-induzierter Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von ~ 70 nM detektiert werden (Benschop *et al.*, 2001). Somit entspricht der in dieser Arbeit gemessene Ca^{2+} -Leak der NALM-6 Zellen dem von primären murinen B-Zellen bzw. humanen T-Zellen, was mit deren gleicher Morphologie einhergeht. Da wie schon oben erwähnt keine Ca^{2+} -Imaging-Daten zu Plasmazellen oder speziell zu RPMI 8226 Zellen bekannt sind, muss der TG-induzierte Ca^{2+} -Leak dieser Zellen mit anderen Zelltypen verglichen werden. In dieser Arbeit konnte ein TG-induzierter Ca^{2+} -Anstieg von 250-400 nM in RPMI 8226 Zellen detektiert werden. Diese Werte konnten ebenso in HEK-293 und HeLa Zellen gemessen werden (Linxweiler *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2011; Meves, 2008; Nemeth *et al.*, 2001), was aber ein Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Morphologie (Durchmesser 15-22 μm) der Zellen erschwert (Dietmair *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 1993). Ebenso weisen die großen Megakaryozyten (Durchmesser 50-100 μm) einen vergleichbaren Wert der Ca^{2+} -Mobilisierung von ~ 250 nM auf, die wichtig für deren Funktion zu sein scheint (Di Buduo *et al.*, 2014; Pang *et al.*, 2005; den Dekker *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu besitzen die kleinen Thrombozyten (Durchmesser ≤ 3 μm) einen TG-induzierten Anstieg von ~ 300 nM (Noris *et al.*, 2014; den Dekker *et al.*, 2001). Diese Zellen besitzen keinen Zellkern, dafür aber ein spezialisiertes ER, dessen Ca^{2+} -Freisetzung für deren Funktion essentiell ist (Varga-Szabo *et al.*, 2009; Zucker-Franklin, 1996). Auch wenn hier nur die Größe der Zellen betrachtet wurde und das ER-Volumen oder der Proteingehalt von Proteinen nicht berücksichtigt wurde, welche in die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase oder des Ca^{2+} -Leaks involviert sind, können vermutlich Zellen unabhängig von deren Größe und ER-Volumen unterschiedliche $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ besitzen, was sich in einem erhöhten Ca^{2+} -Leak widerspiegelt und mit deren speziellen Funktion korreliert. Im Falle der RPMI 8226 Zellen könnte die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ und der stärkere Ca^{2+} -Leak eine Adaption an die erhöhte Proteinsyntheserate im Vergleich zu NALM-6 Zellen darstellen.

Neben dem Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran wurde die sogenannte „ Ca^{2+} -Clearance“ (siehe Kapitel 2.6.1) in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen detektiert, indem, nach Speicherentleerung durch TG, extrazelluläres Ca^{2+} hinzugegeben wurde und nach einer definierten Zeit EGTA appliziert wurde, um somit bei gleicher initialen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ die „ Ca^{2+} -Clearance“ bestimmen zu können (Abb. 4.5). Hierbei zeigte sich kein Unterschied, gemessen an dem reziproken τ -Wert, in der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Transports aus dem Cytosol (siehe Kapitel 4.2). Für die

„Ca²⁺-Clearance“ sind vor allem die PMCA ($K_D = 0,1-0,2 \mu\text{M}$) und NCX ($K_D = \sim 0,2 \mu\text{M}$) zuständig (siehe Kapitel 2.6.1). Da in den Zellen der Proteingehalt der PMCA oder NCX nicht bestimmt wurde, kann nur vermutet werden, dass in beiden Zelllinien dieses Ergebnis in dem Vorhandensein der äquivalenten Aktivität beider Proteine begründet liegt. Ein anderes Szenario könnte durch die unterschiedlichen Affinitäten der PMCA-Isoformen erklärt werden. Alternatives Splicen der PMCA führt zum einen zu unterschiedlichen Affinitäten für Ca²⁺-CaM und zum anderen ändert sich die Aktivierungs-Kinetik (Strehler, 2015; Caride *et al.*, 1999; Elwess *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 1992). Der NCX spielt vermutlich in diesem Zusammenhang weniger eine tragende Rolle, da alternatives Splicen nur in der nieder-affinen CBD2-Domäne vorkommt, während die hoch-affine CBD1-Domäne in allen NCX-Orthologen und -Isoformen konserviert zu sein scheint (Giladi *et al.*, 2016; Tal *et al.*, 2016; Giladi *et al.*, 2012; Hilge *et al.*, 2009; Hilge *et al.*, 2006; Nicoll *et al.*, 2006). Somit könnte zum einen die gleiche „Ca²⁺-Clearance“-Geschwindigkeit in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen durch einen gleichen Proteingehalt der relevanten Proteine oder zum anderen durch unterschiedliche Menge an verschiedenen Isoformen und Affinitäten erklärt werden.

Wie in Kapitel 2.6.4 erläutert, führt eine Ca²⁺-Mobilisierung aus dem ER zur Aktivierung von SOCE, wobei dieser Mechanismus wahrscheinlich konserviert ist. Auch hier sind bisher in der Literatur nur wenig quantifizierte Daten über die mögliche Funktion des SOCE in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bekannt. Aus diesem Grund wurde hierfür in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen das ER durch TG entleert und anschließend durch Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ der SOCE detektiert, welcher in RPMI 8226 Zellen um das ~7-fache erhöht war (Abb. 4.6 C und D). Der mRNA-Gehalt dieser beiden Proteine war in RPMI 8226 Zellen erhöht (Abb. 4.7), was unter der Annahme, dass mit diesem erhöhten mRNA- auch ein gesteigerter Proteingehalt einhergeht, der Grund für den erhöhten SOCE sein könnte. Außerdem ist der mRNA-Gehalt in RPMI 8226 Zellen vergleichbar mit dem von primären humanen CD4⁺ T-Zellen und der Jurkat Zelllinie, welche beide einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ von 0,8-2 μM nach Applikation von 500 μM extrazellulärem Ca²⁺ aufweisen (Alansary *et al.*, 2015; Miederer *et al.*, 2015). Mit einem Anstieg von ~1,7 μM nach Applikation von 1 mM extrazellulärem Ca²⁺ sind auch HEK-293 (siehe Anhang, Abb. 6.8) mit den RPMI 8226 Zellen vergleichbar, allerdings scheint der mRNA-Gehalt von STIM1 und Orai1 in HEK-293 Zellen deutlich geringer zu sein (Alansary *et al.*, 2015). Hinzu kommt, dass die HEK-293 Zellen wie schon oben beschrieben, deutlich größer sind als die verwendeten Zelllinien und der mRNA-Gehalt nicht zwangsläufig den Proteingehalt in den Zellen widerspiegelt. Primäre

murine B-Zellen zeigen einen SOCE-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ von $\sim 1,3 \mu M$ nach Applikation von $2 mM$ extrazellulärem Ca^{2+} , wobei hier Unterschiede des Proteingehalts zwischen Mäusen und Mensch durchaus denkbar sind (Gwack *et al.*, 2008). Somit lässt sich vermuten, dass die RPMI 8226 im Vergleich zu den NALM-6 Zellen aufgrund des höheren Ca^{2+} -Gehalts und größeren Ca^{2+} -Leaks (Abb. 4.4) einen stärkeren SOCE benötigen, um die Funktion des ERs und vor allem der Chaperone für die Anforderungen der hohen Proteinsyntheserate aufrechterhalten zu können.

5.2.2 Sec61 α -vermittelter Ca^{2+} -Leak in Zellen mit viel ER

In dieser Arbeit stand der Sec61 α -induzierte Ca^{2+} -Leak im Mittelpunkt, welcher bereits als ubiquitärer Ca^{2+} -permeabler Kanal beschrieben wurde (siehe Kapitel 2.6.3). Hierbei kann jedoch Ca^{2+} nur kurz vor und nach der Translokation eines Polypeptides den Sec61 α -Kanal passieren. Während der Translokation hält vor allem der „pore-ring“ die Barriere für kleine Moleküle aufrecht (siehe Kapitel 2.3). Dieser Ca^{2+} -Leak wird zudem durch mehrere Proteine reguliert bzw. limitiert. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Ribosom mit Sec61 nach der Translokation assoziiert ist oder nicht, da sich zwischen diesen beiden Proteinen ein Spalt befindet, welcher groß genug für das Passieren von Ca^{2+} ist (siehe Kapitel 2.6.3). Da eine genetische Manipulation zur Modulierung der Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leaks in den verwendeten Zelllinien nicht erfolgreich war, wurde der Ca^{2+} -Leak pharmakologisch moduliert. Hierbei stellte sich die Frage, ob Zellen mit mehr Sec61 α -Proteingehalt anfälliger auf solche Modulationen des Ca^{2+} -Leaks reagieren. Durch Verwendung der Translationsinhibitoren CHX und EME, welche beide die Elongation der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom verhindern (Myasnikov *et al.*, 2016; Garreau de Loubresse *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2014), wodurch die Polypeptidkette im Sec61 α -Kanal arretiert und der Ca^{2+} -Leak limitiert werden soll (Lang *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2007b), konnte ein Rückgang des Ca^{2+} -Leaks in RPMI 8226 Zellen von $\sim 28 \%$ (CHX) und $\sim 36 \%$ (EME) detektiert werden (Abb. 4.8). Die beiden Antibiotika Puromycin und Pactamycin verursachen jeweils eine vorzeitige Beendigung der Translation und eine Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten, was beides zu einem Ca^{2+} -Verlustes des ERs führt, was schließlich auf die Sec61 α -Untereinheit zurückgeführt werden konnte (Lang *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2007b; Van Coppenolle *et al.*, 2004; Lomax *et al.*, 2002). Hierbei konnte gezeigt werden, dass EME den Effekt von Puromycin aufheben kann, was ein Hinweis darauf ist, dass EME den Sec61 α -Leak modulieren kann (Amer *et al.*, 2009; Ong *et*

al., 2007b). Gleichzeitig ändert eine Inkubation mit EME nicht die totale $[Ca^{2+}]$ (Abb. 4.8), weshalb der verringerte Ca^{2+} -Leak in RPMI 8226 Zellen sehr wahrscheinlich durch einen Verschluss von Sec61 α und nicht durch einen Ca^{2+} -Verlust des ERs hervorgerufen wird. Jedoch hatte die Inkubation weder mit CHX, noch mit EME einen Effekt auf den Ca^{2+} -Leak oder Ca^{2+} -Gehalt in NALM-6 Zellen (Abb. 4.8), was durch den geringeren Sec61 α -Gehalt (Abb. 4.3) und deren geringere Proteinsyntheserate erklärt werden könnte.

Des Weiteren ist bekannt, dass der Sec61 α -induzierte Ca^{2+} -Leak durch Faltungsantagonisten wie TUNI oder DTT, sowie durch die CaM-Inhibitoren Ophio A und TFP verstärkt werden kann (siehe Kapitel 2.6.3). Hierbei bewirkt TUNI und DTT eine Dissoziation von BiP vom Sec61-Komplex, um die Faltungskapazität zu erhöhen, wodurch Ca^{2+} die Pore passieren kann. Auch hier konnte im Gegensatz zu NALM-6 Zellen bei allen 4 Modulatoren ein signifikant höherer Ca^{2+} -Leak in RPMI 8226 Zellen detektiert werden (Abb. 4.9 und 4.11). Im Falle von TUNI und DTT scheint dies plausibel, da die RPMI 8226 Zellen große Mengen von Ig synthetisieren und diese 1-2 Glykosylierungsstellen und mehrere Disulfidbrücken besitzen, welche für die Funktion der Antikörper wichtig sind, wodurch die RPMI 8226 Zellen für TUNI und DTT anfälliger sein könnten (Lam und Bhattacharya, 2018; Anelli und van Anken, 2013; Goldfinger *et al.*, 2011; Masciarelli und Sitia, 2008; Thornton, 1981). Da in RPMI 8226 Zellen zusätzlich eine ~5-fache Erhöhung des BiP-Proteingehalts vorliegt (Abb. 4.3 A und C) und eine BiP-Überexpression in HeLa Zellen den Ca^{2+} -leak nicht reduziert (Schäuble *et al.*, 2012), trägt die vergleichsweise große Menge an BiP, die potentiell von Sec61 α dissoziieren kann, möglicherweise zum erhöhten Ca^{2+} -Leak nach einer TUNI- oder DTT-Applikation bei. Auch bei der Inkubation mit den CaM-Inhibitoren Ophio A und TFP scheint die Korrelation von erhöhtem Ca^{2+} -Leak und höherem Sec61 α -Gehalt in RPMI 8226 Zellen am logischsten. Da CaM den Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leak in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise limitiert, könnte eine hohe Dichte von Sec61 α zu Mikrodomänen mit ausreichender Ca^{2+} -Konzentration führen, um eine Bindung von Ca^{2+} -CaM an Sec61 α zu gewährleisten (Schäuble *et al.*, 2012). Nach Applikation von TFP konnte auch in NALM-6 Zellen eine leichte Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_{cyt}$ beobachtet werden, was entweder durch einen erhöhten Ca^{2+} -Leak oder durch einen TFP-induzierten Ca^{2+} -Ausstrom über IP₃R erklärt werden könnte (Kang *et al.*, 2017; Erdmann *et al.*, 2011). Letzteres scheint in diesem Fall jedoch plausibler, da kein signifikanter Anstieg der $[Ca^{2+}]_{cyt}$ nach anschließender TG-Applikation in NALM-6 Zellen detektiert werden konnte (Abb. 4.11 C und D). Es wurde gezeigt, dass eine siRNA-vermittelte Depletion von Sec62 in HeLa Zellen den Effekt der CaM-Inhibitoren imitiert und Sec62 somit den Sec61 α -

vermittelten Ca^{2+} -Leak limitiert (Linxweiler *et al.*, 2013). Des Weiteren führte eine Sec62-Überexpression zu keinem verminderten Ca^{2+} -Leak. Wie in Kapitel 5.1 erläutert könnte Sec62 in NALM-6 im Vergleich zu RPMI 8226 Zellen hochreguliert sein, was wiederum für eine Zelltyp-spezifische negative Regulation des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leaks sprechen könnte. Wie oben beschrieben verhindert EME den Effekt von Puromycin (Amer *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2007b). In dieser Arbeit konnte durch eine prä-Inkubation mit EME der Effekt der Faltungsantagonisten und CaM-Inhibitoren verhindert werden, wodurch bestätigt wurde, dass in RPMI 8226 Zellen dieser veränderte Ca^{2+} -Leak durch Sec61 α vermittelt wird. Der Ca^{2+} -Leak durch eine vergleichsweise geringere Anzahl von Sec61 α -Molekülen könnte unter der Detektionsgrenze der in dieser Arbeit verwendeten Methode liegen, weshalb in NALM-6 Zellen keine Veränderung messbar war. Dies würde bedeuten, dass ein bestimmter Schwellenwert erreicht werden müsste, um den Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leak überhaupt messen zu können, was mit dessen Proteingehalt und $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ in Verbindung zu stehen scheint.

5.2.3 Mögliche Ca^{2+} -Leak-Kandidaten neben Sec61 α

Da selbst nach einer prä-Inkubation mit EME in beiden Zelllinien noch ein Ca^{2+} -Leak messbar war (Abb. 4.8 B), stellt sich hier die Frage, welche Proteine für den verbleibenden Ca^{2+} -Leak in den beiden Zelllinien verantwortlich sein könnten. Wie in Kapitel 2.6.3 erläutert, wurden bereits mehrere Proteine als potentielle Ca^{2+} -permeable Kanäle in der ER-Membran beschrieben. Preseniline werden bevorzugt in Neuronen exprimiert, sind dort in der ER-Membran lokalisiert, bilden aber auch einen Komplex mit der γ -Sekretase in der Plasmamembran, um das APP (engl. Amyloid precursor protein) zu prozessieren (Fukumori *et al.*, 2006; Chyung *et al.*, 2005; Berridge, 2002; Cupers *et al.*, 2001; Busciglio *et al.*, 1997), was die Preseniline als potentieller Ca^{2+} -permeabler Kanal in der ER-Membran in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen eher ausschließt. Für TRPC1 wurden verschiedene Expressionsstudien durchgeführt, welche drauf hindeuten, dass in Abhängigkeit von der Interaktion mit anderen Proteinen aus der TRP-Familie, TRPC1 in der ER- oder Plasmamembran exprimiert wird (Alfonso *et al.*, 2008). Jedoch konnte in Studien die Funktion als Ca^{2+} -permeabler Leak-Kanal nur bei einer Überexpression von TRPC1 beobachtet werden (Berbey *et al.*, 2009), was auch diesen Kandidaten vernachlässigbar macht. Auch bei den in der Plasmamembran lokalisierten Pannexinen konnte erst ein Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran nach einer Überexpression detektiert werden (Penuela *et al.*, 2013; Ishikawa *et al.*, 2011; Vanden Abeele *et al.*, 2006).

Trunkierte Isoformen von SERCA1 (S1T) wurden als homodiemere Ca^{2+} -permeable Leak-Kanäle beschrieben, welche zusätzlich einen erhöhten Ca^{2+} -Transfer vom ER zu den Mitochondrien erlauben (Chami *et al.*, 2008; Chami *et al.*, 2001), was in RPMI 8226 Zellen ein Grund für den höheren Ca^{2+} -Gehalt in den Mitochondrien sein könnte (Abb. 4.4 E und G). Auch wenn keine Informationen in der Literatur zur Expression von SERCA1 in Immunzellen vorhanden sind, so konnte dieses Protein bereits in Pankreas, Leber, Niere, Lunge und Plazenta nachgewiesen werden (Chami *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte in Myozyten ein reverser Ca^{2+} -Transport der SERCA-Pumpen detektiert werden (Shannon *et al.*, 2000). Der TMCO1 könnte ebenso an dem Ca^{2+} -Leak in den beiden verwendeten Zelllinien verantwortlich sein, da dieses Protein bei einer Ca^{2+} -Überladung des ERs Oligomere bildet, jedoch auch im Ruhezustand in der ER-Membran Di- und Trimere detektiert wurden, welche einen Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran zulassen könnten (Wang *et al.*, 2016). Ein weiterer Kandidat könnte BI-1 sein, da dieser durch eine Interaktion mit IP_3R einen Ca^{2+} -Efflux über die ER-Membran induzieren kann und in Immunzellen wichtig für die adaptive Immunantwort ist (Lisak *et al.*, 2016; Bultynck *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014; Kiviluoto *et al.*, 2013; Bultynck *et al.*, 2012; Kiviluoto *et al.*, 2012; Sano *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008). Im Falle einer Überexpression von Bcl-2 konnte ebenso ein Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran detektiert werden (Bonneau *et al.*, 2013; Palmer *et al.*, 2004; Vanden Abeele *et al.*, 2002; Foyouzi-Youssefi *et al.*, 2000; Pinton *et al.*, 2000; Minn *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997). Dieser Ca^{2+} -Leak wurde unter anderem durch eine Runterregulierung von SERCA2 erklärt (Vanden Abeele *et al.*, 2002). Jedoch gibt es in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen keine Unterschiede des Proteingehaltes von SERCA2 (Abb. 4.3 A und C). In dieser Studie konnte in dem verwendeten Zellsystem kein SERCA3 detektiert werden, was wie oben beschrieben eventuell in Immunzellen eine wichtige Rolle spielen könnte. Bcl-2 wird jedoch nicht ausschließlich in der ER-Membran exprimiert (Popgeorgiev *et al.*, 2018; Akao *et al.*, 1994). Dennoch ist Bcl-2 in den RPMI 8226 und NALM-6 Zellen vorhanden, da eine spezifische Inhibition zu einem Verlust der Viabilität führt (Abb. 4.22). Da der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Leak in Abhängigkeit eines Translokationszyklus erfolgt, konnte wahrscheinlich dieser Ca^{2+} -Efflux in NALM-6 Zellen aufgrund des geringen Sec61 α -Gehaltes und Proteinsyntheserate nicht innerhalb von Minuten moduliert werden.

Um zu untersuchen, ob eine Langzeitregulierung des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leaks mit begleitendem ER-Stress eine Modulierung der Ca^{2+} -Homöostase auch in NALM-6 Zellen ermöglicht, wurden die Zellen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI oder 10 μM TFP für 24 h inkubiert.

Danach wurden mittels Ca^{2+} -Imaging-Versuche entweder der Ca^{2+} -Leak und der TG-insensitive Ca^{2+} -Pool (Abb. 4.13) oder die totale $[\text{Ca}^{2+}]$ in den Zellen gemessen (Abb. 4.14). Hierbei konnte in beiden Zelllinien ein erhöhter Ca^{2+} -Leak und höherer Ca^{2+} -Pool, sowie ein erhöhter totaler Ca^{2+} -Gehalt nach TUNI- oder TFP-Behandlung detektiert werden. Die veränderte Ca^{2+} -Homöostase in NALM-6 Zellen kann vermutlich jedoch nicht mehr alleine auf einen Sec61 α -Effekt zurückgeführt werden, da bereits in der Jurkat Zelllinie und in humanen Mastzellen gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation für 16-48 h mit TUNI die posttranslationale Glykosylierung von Orai1 und STIM1 inhibiert und dadurch der TG-induzierte Ca^{2+} -Leak und SOCE signifikant erhöht wird (Dörr *et al.*, 2016; Czyz *et al.*, 2009). Eine Mutation in der einzigen Glykosylierungsstelle in Orai1 (Orai1N223A) bewirkte ebenso einen Anstieg des SOCE, was durch eine gestörte Interaktion von Orai1 mit Lectinen erklärt wurde (Dörr *et al.*, 2016). Somit könnte der TUNI-induzierte erhöhte Ca^{2+} -Gehalt und vermutlich der damit einhergehende größere Ca^{2+} -Leak in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen aus einem verstärkten SOCE resultieren. Des Weiteren kann eine Änderung der Glykosylierung zu einer veränderten Funktion von Spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanälen, sowie von Proteinen aus der TRP-Familie führen, wodurch die Diffusion von Untereinheiten, Kinetik der Inaktivierung, Öffnungsmechanismen, Ionentransport, Multimerisation oder der Protein-„Turnover“ beeinflusst werden kann, was zusätzlich zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom führen könnte (Baycin-Hizal *et al.*, 2014; Syam *et al.*, 2014; Leunissen *et al.*, 2013; Cha *et al.*, 2008; Eler *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2002; Khanna *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte in einem Glioblastoma-Zellmodell gezeigt werden, dass eine Inkubation mit TFP den Ca^{2+} -Efflux über IP₃R induziert (Kang *et al.*, 2017). Da NALM-6 Zellen potentiell differenzieren können und dies über einen BCR-gesteuerten Ca^{2+} -Flux durch IP₃R erfolgt (siehe Kapitel 2.6.6), könnte der erhöhte Ca^{2+} -Leak (Abb. 4.13) durch eine TFP-stimulierte, IP₃R-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung erklärt werden. Aufgrund des höheren Ca^{2+} -Gehalts im Vergleich zur Kontrolle in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen (Abb. 4.14), könnte eine 24-stündige Inkubation mit TFP ebenfalls den SOCE erhöhen. Darüber hinaus wird der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Leak durch TFP erhöht (Erdmann *et al.*, 2011), was ebenfalls zu einem stärkeren SOCE beitragen könnte. TFP inhibiert CaM durch eine direkte Bindung der zwei hydrophoben Bindetaschen, was eine ähnliche Konformationsänderung wie die Bindung von Ca^{2+} hervorruft (Vandonselaar *et al.*, 1994). CaM ist an der Regulierung vieler Ionen-Kanäle beteiligt, was eine Erklärung für die TFP-induzierte Änderung der Ca^{2+} -Homöostase erschwert. CaM reguliert negativ die IP₃R und RyR (Marshall *et al.*, 2015; Lau *et al.*, 2014; Buratti *et al.*, 1995; Ikemoto *et al.*, 1995; Tripathy *et al.*, 1995; Fuentes *et al.*, 1994), wodurch

TFP einen gesteigerten Ca^{2+} -Efflux erlauben würde. Auf der anderen Seite senkt eine Bindung von CaM an die PMCA deren Affinität für Ca^{2+} um das bis zu 100-fache (siehe Kapitel 2.6.1), wodurch die Effizienz der „ Ca^{2+} -Clearance“ beeinträchtigt wäre. Somit könnte TFP zum einen eine Stimulierung von Ca^{2+} -permeablen Kanälen hervorrufen, die einen Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol erlauben und zum anderen die „ Ca^{2+} -Clearance“ beeinträchtigen, wodurch zusätzlich die $[\text{Ca}^{2+}]$ erhöht werden könnte. Somit konnte anhand dieser Ergebnisse gezeigt werden, dass die RPMI 8226 Zellen sensitiver auf akute pharmakologische Änderungen des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leaks reagieren, was mit einem erhöhten ER-Volumen (Abb. 4.1), größeren Ca^{2+} -Leak und totalem Ca^{2+} -Gehalt (Abb. 4.4), sowie einem ~5-fach höheren Sec61 α -Proteingehalt (Abb. 4.3) korreliert.

In dieser Arbeit wurde bisher mit Hilfe des cytosolischen Ca^{2+} -Indikators Fura-2 die Ca^{2+} -Veränderungen im kompletten Cytosol gemessen, um somit indirekt den Ca^{2+} -Leak über die ER-Membran zu detektieren. Daneben existieren weitere Möglichkeiten intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ zu messen. Der genetische Ca^{2+} -Indikator DIER kann zur direkten Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ verwendet werden. Jedoch blieb eine Transfektion der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen erfolglos. Der Einzel-Fluorophor-Sensor GCaMP kann durch eine definierte Fusion mit einem anderen Protein in das gewünschte Kompartiment zielgerichtet exprimiert werden (siehe Kapitel 4.7). Diese Sensoren besitzen Eigenschaften, wodurch Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ bei einzelnen Aktionspotenzialen in Nervenzellen möglich sind (Chen *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden HEK-293 Zellen mit einem Konstrukt, bei dem GCaMP mit H2a fusioniert wurde (150-GCaMP-H2a), wodurch eine gezielte Expression im ERQC gewährleistet ist (D'Souza und Devarajan, 2015; Leitman *et al.*, 2013; Kamhi-Nesher *et al.*, 2001; Tolchinsky *et al.*, 1996) und somit Rückschlüsse auf Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ in diesem Kompartiment während ERAD zulässt. Hierbei konnte erfolgreich gezeigt werden, dass mit diesem Konstrukt zum einen der Ca^{2+} -Leak durch eine Fluoreszenzänderung gemessen und durch die Fluoreszenzmikroskopie das ERQC sichtbar gemacht werden kann (Abb. 4.28 B und 4.31). Aufgrund dieser hoch effizienten Einsatzmöglichkeiten von GCaMP, könnte eine Fusion mit Sec61 α dazu genutzt werden, um in zukünftigen Experimenten den Ca^{2+} -Leak anderer Ca^{2+} -permeabler Kanäle auszuschließen. Durch die lokal begrenzte Detektion der Ca^{2+} -Mobilisierung wäre eine direkte Messung des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Leaks möglich und würde so zur Aufklärung zur physiologischen Relevanz in dem jeweiligen Zelltyp beitragen.

5.3 Ca²⁺-abhängiger Zelltod in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Nach der Charakterisierung der Morphologie und Ca²⁺-Homöostase der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen, sollte als nächstes der Ca²⁺-abhängige Zelltod in diesen Zelllinien untersucht werden. Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, spielt Ca²⁺ als „second messenger“ nicht nur eine wichtige Rolle für die Proliferation und das Überleben der Zelle, sondern auch im programmierten Zelltod. Bei induziertem ER-Stress sind hier vermutlich die MAMs (siehe Kapitel 2.6.5) bedeutungsvoll, da ein transients IP₃R-vermittelter Ca²⁺-Efflux aus dem ER eine erhöhte mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme zur Folge hat, was schließlich in der Freisetzung des pro-apoptotischen Cytochrom c (Cyt c) führt (Andreyev *et al.*, 2018; Smaili *et al.*, 2003; Nutt *et al.*, 2002; Andreyev *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 1998). Wie schon oben beschrieben und diskutiert, konnte in RPMI 8226 Zellen durch TG ~10-fach stärkeren Ca²⁺-Leak über die ER-Membran detektiert werden, was mit einem ~5-fach höheren Sec61α-Gehalt einhergeht. Die Versuche in dieser Arbeit bauten auf der Hypothese auf, dass Zellen mit viel ER und einer spezialisierten ER-Funktion anfälliger auf Störungen der Ca²⁺-Homöostase reagieren. Um nun den Ca²⁺-abhängigen Zelltod zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen von TG für 24 h behandelt. Der relativ hohe Anteil toter unbehandelter RPMI 8226 Zellen, könnte durch einen spontanen Zelltod herrühren, wie er schon in primären Plasmazellen beschrieben worden ist (Auner *et al.*, 2010). Die Behandlung mit 0,01 µM TG hatte keine Veränderung der Viabilität zur Folge, wohingegen bei Konzentrationen von 0,1-10 µM TG der Anteil der PI-positiven Zellen in beiden Zelllinien 12-20 % betrug (Abb. 4.17 A). Somit scheint die Sensitivität für einen TG-induzierten Zelltod Zelltyp-spezifisch zu sein, da entgegen der Hypothese die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen gleichermaßen auf eine Inkubation mit TG reagierten. Dies wird durch einen Vergleich von Studien, in denen unterschiedliche Zelltypen verwendet wurden, untermauert. So konnte in Lungenzellen durch eine 24-stündige Inkubation mit 0,25-1 µM TG eine Reduktion der Viabilität von 60-70 % detektiert werden (Banerjee *et al.*, 2013; Matsumoto *et al.*, 2013). Daneben führt eine Behandlung mit 1-2 µM TG für 24 h in Pankreas-Zellen aus der Ratte und in einem Blut-Hirn-Schranke-Modell zu einer Erniedrigung von 30-35 % der Viabilität (Placido *et al.*, 2015; Diaz-Horta *et al.*, 2002). In einer als Fibrosarkom-Modell dienenden Zelllinie konnte nach einer 24-stündigen Inkubation ein konzentrationsabhängiger Zelltod detektiert werden, welcher bei der maximalen Konzentration von 5 µM TG ca. 80 % der Zellen betraf (Saveljeva *et al.*, 2015). In Fibroblasten von Mausembryonen (MEF, engl. mouse embryonic fibroblasts) führen Konzentration von bereits 0,01-0,1 µM nach 24 h zu einer halbierten Viabilität, wohingegen 1 µM TG in Makrophagen keine Wirkung zeigt (Song

et al., 2011; Shiraishi *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte der Anteil der TG-induzierten toten NALM-6 Zellen bestätigt werden (Zhu *et al.*, 1999), wohingegen in einer Studie eine 24-stündige Behandlung der RPMI 8226 Zellen mit 5 μM TG eine Reduzierung der Viabilität von ~80 % zur Folge hatte (Landowski *et al.*, 2005). Die Diskrepanz dieser Studie und der Ergebnisse in dieser Arbeit kann durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Detektion des Zelltodes (MTT-Assay vs. Durchflusszytometrie) und der damit unterschiedlichen Sensitivität erklärt werden. Darüber hinaus können in Zelllinien über die Zeit genetische Veränderungen entstehen, was zusätzlich zu diesem Unterschied beitragen kann (Kaur und Dufour, 2012). Aufgrund des Vergleichs mit den oben genannten Daten liegt es nahe, dass in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase durch TG nur eine geringfügige Rolle im Zelltod zu spielen scheint.

Da durch TG jedoch lediglich die Ca^{2+} -Homöostase des ERs beeinflusst wird, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IONO behandelt, um eine globale Änderung der Ca^{2+} -Homöostase zu bewirken. Durch eine Permeabilisierung aller Membranen durch IONO können dadurch Rückschlüsse auf eine Beteiligung der Mitochondrien gezogen werden. Hierbei hatte diese Inkubation keinerlei Wirkung auf die Viabilität der NALM-6 Zellen, wohingegen in RPMI 8226 Zellen ein konzentrationsabhängiger Anstieg der PI-positiven Zellen auf bis zu 60 % bei einer Konzentration von 20 μM IONO detektiert werden konnte (Abb. 4.17 B). Auch hier existieren große Unterschiede zu Zellen aus unterschiedlichen Tumoren (Neuroblastom, Lungenkarzinom, Plattenepithelkarzinom), bei denen bereits innerhalb von 3-6 h bei Konzentrationen von 1,5-10 μM eine Reduktion der Viabilität von 40-90 % detektiert werden konnte (Chen *et al.*, 2016; Tornero *et al.*, 2011; Gil-Parrado *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu führt in murinen β -Zellen eine 48-stündige Inkubation mit 5-6 μM IONO lediglich zu einem ~20 %igen Verlust der Viabilität (Diaz-Horta *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1998). Keine Wirkung auf die Viabilität zeigt eine 16-24-stündige Inkubation mit 1-10 μM IONO in Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Prostata-Adenokarzinom-Zellen (Romera-Cárdenas *et al.*, 2016; Kaddour-Djebbar *et al.*, 2012). Somit scheint die Ca^{2+} -Homöostase des ERs keine tragende Rolle für das Überleben der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zu spielen. Da RPMI 8226 Zellen jedoch mehr Mitochondrien zur Energiegewinnung und Aufrechterhaltung der ER-Funktion benötigen (Abb. 4.1 D), einen ~6-fach höheren Ca^{2+} -Gehalt im Vergleich zu NALM-6 Zellen besitzen (Abb. 4.4 C und D) und eine gestörte Regulierung von Ca^{2+} in Mitochondrien zum programmierten Zelltod führen kann (Celsi *et al.*, 2009; Pinton *et al.*, 2008), lässt sich

wahrscheinlich die erhöhte Sensitivität der RPMI 8226 Zellen für IONO durch eine Beteiligung der Mitochondrien erklären, was die Bedeutsamkeit der Mitochondrien und weniger des ERs im Hinblick auf den programmierten Zelltod in RPMI 8226 Zellen hervorhebt.

Da eine Inkubation mit TUNI oder TFP für 24 h in beiden verwendeten Zelllinien ebenfalls zu einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase geführt hat (Abb. 4.13 und 4.14), wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. Um zu überprüfen, ob Zellen mit einer hohen Proteinsyntheserate anfälliger auf eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase bei gleichzeitig induziertem ER-Stress sensibler reagieren, wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen für 24 h mit TUNI oder TFP behandelt. Die Zunahme der toten Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit TUNI hatte den annähernd gleichen Verlauf bei beiden verwendeten Zelllinien, wobei die maximale Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ einen Anstieg der PI-positiven Zellen von ~20 % zur Folge hatte (Abb. 4.18 A). Primäre B- und Plasmazellen, sowie *in vitro* stimuliert murine B-Zellen wiesen bereits nach 14 h bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ 30-50 % tote Zellen auf (Auner *et al.*, 2010). In der PC-3-Zelllinie wurde jedoch nach 24 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ TUNI, vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, nur ~8 % tote Zellen detektiert, wobei dieser Wert nach 96 h ~60 % betrug (Guha *et al.*, 2017). In HeLa Zellen konnte nach einer 48-stündigen Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ TUNI ~12 % tote Zellen detektiert werden (Bravo *et al.*, 2011). Ein als alternative zur RPMI 8226 Zelllinie verwendetes Multiples Myelom (MM)-Modell (KMS-11) zeigte nach Behandlung mit ~1 $\mu\text{g/ml}$ TUNI nach 24 h bereits einen prozentualen Anteil toter Zellen von ~20 % (Miki *et al.*, 2015). Somit sprechen auch diese Ergebnisse wieder für ein Zelltyp-spezifisches Phänomen. Da TUNI die *N*-Glykosylierung von Proteinen inhibiert, könnte in NALM-6 Zellen aufgrund deren geringen Proteinsynthese die Sensitivität niedrig sein. Es konnte bereits in HeLa Zellen gezeigt werden, dass mit einer Behandlung mit TUNI ein Anstieg des mitochondrialen Metabolismus einhergeht, welcher als Grundlage für eine Adaption an diesen ER-Stress dient (Bravo *et al.*, 2011). Somit könnten die RPMI 8226 Zellen durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, ATP-Level und eine gesteigerte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme dem TUNI-induzierten ER-Stress entgegenwirken (Bravo *et al.*, 2011). Die Inkubation mit dem CaM-Inhibitor TFP zeigte allerdings, dass die NALM-6 Zellen ab einer Konzentration von 14 μM sensibler als die RPMI 8226 Zellen reagieren (Abb. 4.18 B). Auch hier sind in der Literatur keine Daten zur Viabilität von TFP-behandelten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bekannt. In verschiedenen Prostata-Krebs Zelllinien führte

eine 24-stündige Inkubation mit 1-10 μM TFP zu einem Rückgang der Viabilität um 0-15 %, wohingegen 30 μM eine 20-40 %ige Reduktion zur Folge hatte (Ronald *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu hat weder eine Inkubation mit 0,62-2,5 μM für 72 h in humanen und murinen Fibroblasten, noch eine Behandlung mit 20-40 μM für 110 h in einer Makrophagen-Zelllinie einen Effekt auf den Zelltod (Pulkoski-Gross *et al.*, 2015; Advani *et al.*, 2012). In einem Glioblastom-Zellmodell konnte jedoch nach 24 h ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Viabilität detektiert werden, welche bei einer Konzentration von 30 μM ca. 70 % betrug (Zhang *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnte in einer renalen Zelllinie ein konzentrationsabhängiger Zelltod detektiert werden, wobei bei Konzentration von 20-30 μM die Viabilität der Zellen um die Hälfte reduziert war (Wang *et al.*, 2018a), wodurch auch hier ein Zelltyp-spezifischer Effekt des CaM-Inhibitors TFP vorzuliegen scheint. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CaM an Akt bindet und somit dessen Funktion beeinflusst wird (Wang *et al.*, 2018a; Berchtold und Villalobo, 2014; Deb *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 1998). Der PI₃K/Akt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle, da pro-apoptische Proteine auf der Ebene der Transkription oder durch direkte Phosphorylierung beeinflusst werden (Franke *et al.*, 2003; Nicholson und Anderson, 2002). Somit konnte mit Hilfe von CaM-Inhibitoren (W-7 und TFP) gezeigt werden, dass die schützende Funktion von Akt verloren geht und gleichzeitig die Zellen aufgrund einer erhöhten Ratio des Proteingehalts des pro-apoptischen Bax und anti-apoptischen Bcl-2 nicht mehr überlebensfähig sind (Wang *et al.*, 2018a; Deb *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse könnte der ER-Stress induzierte Zelltod der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen, begleitet von einer veränderten Ca²⁺-Homöostase, auf einer Verlagerung zu vermehrter Aktivierung pro-apoptischer Proteine beruhen.

Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst zum einen, dass in den beiden verwendeten Zelllinien die Ca²⁺-Homöostase des ERs zum Überleben der Zelle nur eine geringe Rolle zu spielen scheint und zum anderen, dass vor allem der Sec61 α -vermittelte Ca²⁺-Leak nicht oder nur geringfügig in den Ca²⁺-abhängigen Zelltod involviert ist. Jedoch deuten die Resultate darauf hin, dass in RPMI 8226 Zellen eine Aufrechterhaltung des mitochondrialen Metabolismus wichtiger als die Ca²⁺-Homöostase des ERs zu sein scheint. Schließlich deuten die Ergebnisse, aufgrund der oft gleichen Sensitivität, auf einen Zelltyp-spezifischen Effekt des Ca²⁺-abhängigen Zelltodes hin, was wiederum vermutlich von der jeweiligen Funktion der Zelle und somit mit der jeweiligen pro- und anti-apoptischen Proteinzusammensetzung zusammenhängt.

5.4 Protektive Rolle der Bcl-2-Familie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Da generell der programmierte Zelltod von dem Zusammenspiel zwischen anti- und pro-apoptotischen Proteinen aus der Bcl-2-Familie abhängt (siehe Kapitel 4.6.5), wurde überprüft, ob eben solche anti-apoptotischen Proteine für das Überleben der beiden Zelllinien wichtig sind. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Navitoclax (Nav, Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w-Inhibitor), Venetoclax (Ven, spezifischer Bcl-2-Inhibitor), A-1155463 (A-11, selektiver Bcl-X_L-Inhibitor) oder A-1210477 (A-12, Mcl-1-Inhibitor) für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Hierbei konnte eine klare Abhängigkeit von Bcl-2 für beide Zelllinien beobachtet werden, wobei Bcl-X_L in RPMI 8226 Zellen eine etwas geringere Rolle zu spielen scheint (Abb. 4.22 B und C). Allerdings ist Mcl-1 für das Überleben der RPMI 8226 Zellen wahrscheinlich nur bedingt wichtig, während in NALM-6 Zellen Mcl-1 überhaupt keine Rolle spielt (Abb. 4.22 D). Dieser Zelltod ist abhängig von dem Verhältnis zwischen anti- und pro-apoptotischen Proteinen in der jeweiligen Zelle (Lewis *et al.*, 2014; Peperzak *et al.*, 2012; Hanson *et al.*, 2008). Vor allem während der Differenzierung von B- in Plasmazellen verändert sich der Proteingehalt der Proteine aus der Bcl-2-Familie stetig (Carrington *et al.*, 2017). Diese Variation ist wichtig für die differenzierte Selektion, da gezeigt werden konnte, dass Bcl-2 und Bcl-X_L wichtig für das Überleben von aktivierten und nicht-aktivierten B-Zellen ist, während Mcl-1 in allen Schritten der Differenzierung benötigt wird und für das Überleben von Plasmazellen essentiell ist (Carrington *et al.*, 2017; Vikström *et al.*, 2016; Peperzak *et al.*, 2013; Peperzak *et al.*, 2012; Opferman *et al.*, 2003; Derenne *et al.*, 2002; Spets *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Somit scheint eine Verlagerung des Proteingehaltes von Bcl-2 zu Bcl-X_L und Mcl-1 während der Differenzierung stattzufinden (Carrington *et al.*, 2017; Alford *et al.*, 2015; Gaudette *et al.*, 2014; Peperzak *et al.*, 2013), was mit der in dieser Arbeit beschriebenen Sensitivität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen übereinstimmt.

Jedoch wurde in der Literatur den NALM-6 Zellen eine höhere Sensitivität für Nav als Ven zugeschrieben (Alford *et al.*, 2015), was in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, da Nav und Ven-behandelte NALM-6 Zellen einen ähnlichen Verlauf aufweisen (Abb. 4.22 A und B). Für RPMI 8226 Zellen wurde eine hohe Bcl-X_L-Abhängigkeit beschrieben (Gong *et*

al., 2016; Punnoose *et al.*, 2016), wobei in dieser Arbeit Bcl-2 in diesen Zellen relevant zu sein scheint und Bcl-X_L eher eine geringere Rolle spielt (Abb. 4.22 B und C). In der Literatur wurde jedoch beschrieben, dass es Unterschiede der Sensitivität innerhalb von mehreren MM- und ALL-Zelllinien zu geben scheint (Gong *et al.*, 2016; Alford *et al.*, 2015), was vermutlich auf einer heterologen Expression der jeweiligen Proteine in den Zelllinien beruht (Punnoose *et al.*, 2016; Uckun *et al.*, 1997). Da keine Antikörper zur Bestimmung des Gehaltes der jeweiligen Proteine vorhanden waren, kann der Gehalt lediglich anhand der Sensitivität festgemacht werden (Punnoose *et al.*, 2016). Die Übertragung der Sensitivität auf den Proteingehalt stimmt für die RPMI 8226 und NALM-6 Zelllinie mit Daten aus der Literatur überein (Punnoose *et al.*, 2016; Alford *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2014), wodurch beide Zelllinien im Vergleich zu anderen Bcl-2-Proteine einen hohen Bcl-2-Gehalt aufweisen würden. Allerdings sind auch gegensätzliche Resultate bekannt, da auch eine höhere Expression von Bcl-X_L als Bcl-2 in den Zellen beschrieben worden sind, was weiterhin für eine heterologe Expression innerhalb der Zelllinien spricht. Der höhere Bcl-X_L-Gehalt in RPMI 8226 Zellen könnte durch den oben diskutierten erhöhten ATP-Bedarf dieser Zellen erklärt werden. Bcl-X_L ist nicht nur in der OMM, sondern auch in den Cristae der IMM lokalisiert, um dort mit der β -Untereinheit der F₁-F₀-ATP-Synthase zu Interagieren, wodurch der Netto-H⁺-Transport erhöht wird und somit die ATP-Synthese gesteigert wird (Hardwick und Soane, 2013; Alavian *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011). Des Weiteren erhöht Bcl-X_L die Leitfähigkeit des VDAC, was zu einer erhöhten Permeabilität für ATP führen könnte (Lewis *et al.*, 2014; Vander Heiden *et al.*, 2001). Wie oben erläutert ist in der Literatur eine hohe Expression von Mcl-1 in Plasmazellen beschrieben. Gemessen an der Sensitivität nach einer Inkubation mit A-12, besitzen die RPMI 8226 Zellen jedoch nur einen vergleichsweise geringen Mcl-1-Gehalt (Abb. 4.22 D). Da gezeigt worden ist, dass mit einem größeren Mcl-1-Gehalt die mitochondriale Ca²⁺-Aufnahme verringert wird (Lewis *et al.*, 2014; Minagawa *et al.*, 2005) und dadurch der Metabolismus gestört werden kann (siehe Kapitel 2.6.5), könnte dies den niedrigen Mcl-1-Gehalt in RPMI 8226 Zellen erklären. Außerdem scheint eine gleichzeitige Expression von Bcl-2 und Bcl-X_L keine Redundanz, sondern unterschiedliche Funktionen widerzuspiegeln, da eine Überexpression von Bcl-2 zu einer verlängerten Lebensspanne und Bcl-X_L zu einer veränderten Affinität von Plasmazellen führen kann (Carrington *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1994). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass eine heterologe Expression der Proteine aus der Bcl-2-Familie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen vorherrscht und deren Wichtigkeit

anhand der Sensitivität in RPMI 8226 Zellen als $Bcl-2 > Bcl-X_L > Mcl-1$ und in NALM-6 Zellen als $Bcl-2 \gg Bcl-X_L > Mcl-1$ dargestellt werden kann.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Bcl-2-Proteinfamilie die Zellen vor ER-Stress schützt. Hierfür wurden Konzentrationen der verschiedenen Bcl-2-Inhibitoren so ausgewählt, dass die Viabilität nur geringfügig oder gar nicht beeinträchtigt wurde. Die Zellen wurden dann gleichzeitig mit $1 \mu\text{M}$ TG, $2,5 \mu\text{M}$ IONO, $25 \mu\text{g/ml}$ TUNI, 2mM DTT oder $12 \mu\text{M}$ TFP für 24 h behandelt. Diese Konzentrationen wurden ausgewählt, da eine alleinige Behandlung eine annähernd gleiche Anzahl toter Zellen in beiden Zelllinien zur Folge hatte, was ein Vergleich nach zusätzlicher Behandlung mit den Bcl-2-Inhibitoren ermöglicht. Hierbei scheint Bcl-2 vor allem in NALM-6 Zellen eine protektive Rolle gegen unterschiedlichen ER-Stress zu spielen, während in RPMI 8226 Zellen Bcl-2 und Bcl-X_L gleichermaßen protektiv wirken (Abb. 4.23). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist der Tabelle 5.1 zu entnehmen.

Tabelle 5.1. Zusammenfassung der in Abbildung 4.23 gezeigten Graphen. Die Zunahme durch die gleichzeitige Behandlung der ER-Stressoren mit den jeweiligen Inhibitoren der Bcl-2-Familie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen ist wie folgt dargestellt: + = 1-8-fach, ++ = 8-20-fach, +++ = > 20-fach, - = keine Veränderung, -- = 1-0,5-fach und --- = < 0,5-fach.

	ER-Stress	Bcl-2-Inhibitor	RPMI 8226	NALM-6
Ca ²⁺ -abhängig	TG	Nav	+	++
		Ven	+	++
		A-11	+	+
		A-12	+	-
	IONO	Nav	+	+++
		Ven	+	+++
		A-11	+	+++
		A-12	+	---
ER-Stress	TUNI	Nav	+	+++
		Ven	+	+++
		A-11	+	+
		A-12	+	--
	DTT	Nav	+	+
		Ven	+	+
		A-11	+	+
		A-12	-	-
Ca ²⁺ -Leak	TFP	Nav	+	+
		Ven	+	++
		A-11	+	+
		A-12	+	-

Die Unterschiede der protektiven Rollen der Bcl-2-Proteinfamilie in den beiden Zelllinien könnten durch eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation zustande kommen, da diese Proteine dadurch multiple Funktionen ausüben können (Popgeorgiev *et al.*, 2018; Pinton *et al.*, 2008). Die Bcl-2-Proteine besitzen bevorzugt eine mitochondriale Lokalisation, jedoch wurde zusätzlich auch eine Lokalisation in der ER-Membran und Kernmembran beschrieben (Popgeorgiev *et al.*, 2018; Gotow *et al.*, 2000; Akao *et al.*, 1994). Die Chaperone üben im ER-Lumen eine ER-Stress-reduzierende Funktion aus (siehe Kapitel 2.4), wobei im Cytosol auch pro-apoptotische Effekte für BiP und CRT bekannt sind (Burikhanov *et al.*, 2009; Obeid *et al.*, 2007; Gardai *et al.*, 2005). In MEFs führt eine Behandlung mit TG und TUNI für 18-25 h zu einer Bax- und Bid-vermittelten ER-Membran-Permeabilisierung, wodurch BiP und PDI im Cytosol detektiert werden konnten (Wang *et al.*, 2011b), was für die hohe Bcl-2-abhängige Sterberate in NALM-6 Zellen sprechen könnte. Gleichzeitig antagonisiert Bcl-X_L diese Permeabilisierung (Wang *et al.*, 2011b), wodurch der vergleichsweise geringere Anteil toter RPMI 8226 Zellen nach TG- und TUNI-Behandlung zu erklären wäre. Daneben führt eine TG-Behandlung in MCF-7 Zellen (humane Brustkrebs-Zelllinie) innerhalb von 24 h zu einer Erniedrigung des Bcl-2-Gehaltes um mehr als 50 % (Park und Kim, 2011), wodurch weiterhin der protektive Effekt von Bcl-2 in NALM-6 Zellen beeinflusst werden könnte. Darüber hinaus konnte anhand einer Mutation in der BH1-Domäne von Bcl-2 in MDCK Zellen (engl. Madin-Darby canine kidney cells) ebenfalls ein erhöhter TG- und TUNI-induzierter Zelltod festgestellt werden, was mit einer verminderten $[Ca^{2+}]_{ER}$, Erhöhung der SOCE-vermittelten Proteine und damit stärkerer SOCE einherging (Chiu *et al.*, 2018). Der erhöhte Zelltod in dieser Studie wurde durch die Beteiligung des SOCE in der Aktivierung von Caspasen erklärt, wodurch eine Regulation der TG-induzierten Ca^{2+} -Cytotoxizität durch Bcl-2 postuliert wurde. Die erniedrigte $[Ca^{2+}]_{ER}$ durch Bcl-2 resultiert vermutlich aus einer Bindung und Inaktivierung von SERCA und einer Reduzierung des SERCA2-Proteingehaltes (Hardwick und Soane, 2013; Dremina *et al.*, 2004; Vanden Abeele *et al.*, 2002).

Da eine generelle Ca^{2+} -Dysregulation und ein IP₃R-vermittelter Ca^{2+} -Efflux zur Apoptose führen kann (Danese *et al.*, 2017; Raffaello *et al.*, 2016; Pinton *et al.*, 2008) und gezeigt worden ist, dass Bcl-2 den IP₃R-vermittelten Ca^{2+} -Efflux in der T-Zell-Lymphom-Zelllinie WEHI7.2 inhibiert (Hardwick und Soane, 2013; Rong *et al.*, 2009; Rong *et al.*, 2008), könnte dieser Effekt auf ein weiteres Indiz für die Bcl-2-Abhängigkeit der NALM-6 Zellen hinweisen. Gegensätzlich wurde jedoch in anderen Zellmodellen mit einer Bcl-2-Überexpression eine erhöhte SERCA-Aktivität und Ca^{2+} -Aufnahme in das ER beschrieben

(Lewis *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2004). Außerdem wurde eine Bcl-2-vermittelte Aktivierung von IP₃R, was mit einer Reduzierung des pharmakologisch-induzierten ER-Stresses einherging und eine Erhöhung der IP₃R-Aktivität und deren IP₃-Affinität durch Bindung von Bcl-X_L beschrieben (Lewis *et al.*, 2014; Hardwick und Soane, 2013; Eckenrode *et al.*, 2010; Oakes *et al.*, 2005; White *et al.*, 2005). Diese zuletzt genannten Gründe in Verbindung mit der generell akzeptierten Tatsache, dass ein IP₃R-vermittelter Ca²⁺-Efflux zur Apoptose führen kann (siehe oben), könnte für die weniger protektive Rolle von Bcl-2 und Bcl-X_L in RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen und für eine Zelltyp-spezifische Eliminierung des ER-Stress-induzierten Zelltodes stehen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit IONO zum einen zu einer Reduzierung des Bcl-2-Proteingehaltes führt und zum anderen IONO Calpain aktiviert, welches Bcl-2 und Bcl-X_L spaltet, was wiederum zu einer Freisetzung von Cyt c und somit zur Caspasen-abhängigen Apoptose führt (Gil-Parrado *et al.*, 2002). Des Weiteren werden primäre murine Thymozyten durch eine Bcl-2-Überexpression vor einem IONO-induzierten Zelltod geschützt (Vandenberg *et al.*, 2014). Dennoch wird angenommen, dass diese Calpain-Spaltung der Caspasen Zelltyp-abhängig ist (Lewis *et al.*, 2014; Lopatniuk und Witkowski, 2011; Gil-Parrado *et al.*, 2002), was für die Diskrepanz zwischen RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach einer IONO-Behandlung und gleichzeitiger Bcl-2-Inhibition sprechen würde. Eine Inkubation mit TFP führt in unterschiedlichen Zelltypen zu einer Erniedrigung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1 und im Gegensatz dazu zu einer Erhöhung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak, was zu einer gesteigerten Apoptose führt (Wang *et al.*, 2018a; Yeh *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2009). Dies könnte durch eine zusätzliche Inhibition von Bcl-2, Bcl-X_L oder Mcl-1 zu den vermehrten toten RPMI 8226 und NALM-6 Zellen führen. Da in NALM-6 Zellen die Inhibition von Mcl-1 zu einer Reduktion des ER-Stress-induzierten Zelltodes führt, könnte dieser Effekt für eine Zelltyp-spezifische Funktion von Mcl-1 sprechen.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen durch die Proteine aus der Bcl-2-Familie vor einem pharmakologisch ER-Stress-induziertem Ca²⁺-abhängigen Zelltod geschützt werden. Allerdings scheint dieser protektive Mechanismus Zelltyp-spezifisch zu sein, da die NALM-6 Zellen eine Bcl-2- und die RPMI 8226 Zellen eine Bcl-2- und Bcl-X_L-Abhängigkeit aufweisen.

5.5 Unterschiedlicher Energiestatus in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen

Es wurde vermutet, dass Zellen mit einer Erhöhung der Anzahl von Mitochondrien (Abb. 4.1 D), einem höheren TG-insensitiven Ca^{2+} -Speicher (Abb. 4.4 E und G) und höherer Proteinsyntheserate (RPMI 8226 Zellen) anfälliger auf Veränderungen des mitochondrialen Metabolismus reagieren (Kurtoglu *et al.*, 2010). Eine erhöhte Aktivität der Mitochondrien in RPMI 8226 Zellen erscheint logisch, da aufgrund der hohen Proteinsyntheserate mehr ATP benötigt wird. Da Ca^{2+} eine eher untergeordnete Rolle im Hinblick auf den programmierten Zelltod zu spielen scheint, sollte als nächstes untersucht werden, ob das Überleben von Zellen mit einer hohen Proteinsyntheserate von der ATP-Bereitstellung abhängt. Da generell die Zelle hauptsächlich 2 Wege zur ATP-Synthese benutzt, nämlich die mitochondriale Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und die im Cytosol ablaufende Glykolyse (Mookerjee *et al.*, 2017), wurden die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen zum einen mit dem ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin (Oligo) und dem Glykolyse-Inhibitor 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) für 1-48 h behandelt. Hierbei konnte eine erhöhte Sensitivität der RPMI 8226 Zellen für Oligo und im Gegensatz dazu bei NALM-6 Zellen für 2-DG beobachtet werden (Abb. 4.16 G und H). Dieser erste Hinweis auf eine höhere Anfälligkeit der RPMI 8226 Zellen auf eine Inhibition der mitochondrialen ATP-Synthase diente als Grundlage für weitere Untersuchungen, bei denen auf unterschiedliche Weisen in den Energiestatus der Zelle eingegriffen wurde. Somit wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des H^+ -Ionophors CCCP (Abb. 4.19 A), Oligo (Abb. 4.19 B), dem MCU-Inhibitor Rutheniumrot (RR) (Abb. 4.19 D) oder dem Glykolyse-Inhibitor 2-DG (Abb. 4.19 F) für 24 h inkubiert. Auch bei CCCP und RR konnte wie zuvor bei Oligo eine erhöhte Sensitivität der RPMI 8226 Zellen detektiert werden, wobei die NALM-6 Zellen lediglich für eine Glykolyse-Inhibition anfälliger waren. Diese Sensitivität äußerte sich durch eine stärkere Zunahme der PI-positiven Zellen bei geringeren Konzentrationen (CCCP, RR, Oligo) oder durch eine vergleichsweise deutlich erhöhte Anzahl toter Zellen (2-DG).

Wie in Kapitel 5.1 bereits diskutiert, könnte ein hochregulierter GAPDH-Proteingehalt für einen veränderten Energiestatus in den NALM-6 Zellen stehen. In der Tat konnte in verschiedenen Tumoren ein erhöhter GAPDH-Proteingehalt nachgewiesen werden, was gleichzeitig mit einer gesteigerten Glykolyse einherging (Guo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Dies könnte in Verbindung zum Warburg-Effekt stehen, bei dem Tumorzellen im Vergleich

zu gesunden Zellen vermehrt Glykolyse anstatt OXPHOS zur ATP-Synthese verwenden (Liberti *et al.*, 2017; Schuster *et al.*, 2015). Auch wenn dieser Mechanismus nicht ganz geklärt ist, wurde für diese Verschiebung der ATP-Synthese eine eingeschränkte Funktion der Mitochondrien postuliert (Schuster *et al.*, 2015; Senyilmaz und Teleman, 2015; Samudio *et al.*, 2009; Warburg, 1956), was mit der geringen Mitochondrien-Anzahl in NALM-6 Zellen gleichgesetzt werden könnte (Abb. 4.1 D). Des Weiteren scheint OXPHOS über längere Zeit eine stabilere ATP-Quelle zu sein, während die Glykolyse je nach Bedarf ATP bereitstellt (Epstein *et al.*, 2017). Einen geringen Energiebedarf konnte in naiven, nicht-aktivierten B-Zellen durch eine genetische Manipulation der Mitochondrien-Funktion oder Glukose-Aufnahme demonstriert werden (Lam und Bhattacharya, 2018; Milasta *et al.*, 2016; Caro-Maldonado *et al.*, 2014). Generell wird angenommen, dass B-Zellen von der Glykolyse abhängig sind (Lam und Bhattacharya, 2018), was im Falle der NALM-6 Zellen im Hinblick auf das Überleben bestätigt werden konnte. Die RPMI 8226 Zellen wurden aus einem Patienten mit diagnostiziertem Multiplen Myelom entnommen (siehe Kapitel 3.1.6). Diese Krankheit entwickelt sich hauptsächlich aus langlebigen Plasmazellen (Hallek *et al.*, 1998), welche eine lange, konstante Aufrechterhaltung der ATP-Bereitstellung benötigen, um der hohen Proteinsyntheserate gerecht zu werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer Stimulierung von B-Zellen eine erhöhte Expression von Glukose-Transportern, -Aufnahme, Glykolyse und OXPHOS einhergeht (Lam und Bhattacharya, 2018; Caro-Maldonado *et al.*, 2014; Doughty *et al.*, 2006). In Plasmazellen, wie sie RPMI 8226 Zellen darstellen, wird Glukose durch die auf der Oberfläche exprimierten Glukosetransporter 1, 4, 8 und 11 in das Cytosol transportiert und bevorzugt für die Glykosylierung von Antikörpern verwendet (Lam und Bhattacharya, 2018; Lam *et al.*, 2016; Caro-Maldonado *et al.*, 2014; McBrayer *et al.*, 2012; Doughty *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann bei geringer mitochondrialer ATP-Bereitstellung die Glukose für die Glykolyse verwendet werden, was zusätzlich die Expression des anti-apoptischen Proteins Mcl-1 stabilisiert (Lam und Bhattacharya, 2018; Lam *et al.*, 2016; McBrayer *et al.*, 2012). Plasmazellen glykosylieren Antikörper mit verschiedenen Glykosylierungsmustern, was durch eine unterschiedliche Nährstoffaufnahme beeinflusst wird und somit zu dem benötigten vielfältigen Antikörper-Repertoire beiträgt (Lam und Bhattacharya, 2018; Jennewein und Alter, 2017). Da eine gestörte mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme die ATP-Synthese stören kann (siehe Kapitel 2.6.5), spricht die höhere Sensitivität der RPMI 8226 Zellen für RR weiterhin auf eine vermehrte Abhängigkeit von OXPHOS (Gellerich *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 1982; Villalobo und Lehninger, 1980). Da eine Aufrechterhaltung des Protonengradienten für die ATP-Synthese essentiell ist (Seelert *et*

al., 2009) und die RPMI 8226 Zellen bei Konzentrationen von 1-25 μM sensitiver auf CCCP reagierten (Abb. 4.19 A), könnte dies ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der mitochondrialen Funktion in diesen Zellen sein. Der Zelltod bei höheren Konzentrationen (50-100 μM) könnte durch eine pH-Abhängigkeit geschuldet sein (Berezhnov *et al.*, 2016; Newell und Tannock, 1989), was die annähernd gleichen Werte der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen von 70-90 % PI-positiver Zellen erklären würde.

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass während der Differenzierung der B- in Plasmazellen vermutlich unterschiedliche metabolische und energetische Anforderungen bestehen, welche in Plasmazellen (RPMI 8226) hauptsächlich auf die Ig-Synthese und Aufrechterhaltung der Organell-Funktionen (ER und Mitochondrien), anstatt auf die Biogenese ausgelegt sind (Lam und Bhattacharya, 2018) und somit ATP ein entscheidender Faktor für das Überleben darstellt. Dies wird durch eine Studie, in der SLC35B1 als ATP/ADP-Austauscher in der ER-Membran (AXER, engl. ATP/ADP exchanger in the ER membrane) entdeckt wurde, untermauert (Klein *et al.*, 2018). Es konnten in dieser Studie Interaktionspartner, die sowohl im Proteintransport (BiP, Sec61, CNX, OST, TRAP), als auch in der zellulären Ca^{2+} -Homöostase (ITPR1, SERCA2) involviert sind, identifiziert werden. Eine siRNA-vermittelte Depletion von AXER in HeLa Zellen hatte zudem eine Reduktion des BiP-abhängigen Proteintransports und eine generelle Erniedrigung der ER-luminalen ATP-Konzentration ($[\text{ATP}]_{\text{ER}}$) zur Folge. Diese Ergebnisse kopierten den Phänotyp einer BiP-Depletion (Schäuble *et al.*, 2012), woraufhin geschlossen wurde, dass AXER wichtig für eine physiologische Funktion von BiP ist (Klein *et al.*, 2018). Des Weiteren verursachte der siRNA-vermittelte „Knockdown“ ein Ca^{2+} -Verlust des ER, was durch eine prä-Inkubation mit EME verhindert werden konnte, woraufhin eine Beteiligung von Sec61 α nahe liegt. Somit wurde postuliert, dass durch die gestörte BiP-Funktion bei fehlendem ATP der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Leak nicht mehr durch BiP limitiert werden kann und Ca^{2+} in der Nähe der ER-Membran CaM bindet (Klein *et al.*, 2018; Schäuble *et al.*, 2012; Erdmann *et al.*, 2011). Dieses Ca^{2+} -CaM könnte die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), den Hauptregulator des Energiemetabolismus (Jeon, 2016; Vishnu *et al.*, 2014; Preston und Hendershot, 2013; Long und Zierath, 2006), aktivieren, wodurch die 6-Phosphofructo-2-Kinase (PF2K) phosphoryliert wird (Vishnu *et al.*, 2014), was wiederum die ATP-Biosynthese in der Glykolyse erhöht und somit ATP durch AXER in das ER-Lumen transportiert werden kann, wodurch schließlich die Verbindung zwischen Sec61 α -vermittelter Ca^{2+} -Leak und ATP-Bereitstellung zur Aufrechterhaltung der ER-Funktion postuliert wurde (Klein *et al.*, 2018).

5.6 Wirksame Konzentrationsbereiche der verwendeten Substanzen

In dieser Arbeit wurde anhand von Zellen mit viel (RPMI 8226) und wenig ER (NALM-6) die Ca^{2+} -Homöostase charakterisiert. Hierbei stand der Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Leak im Vordergrund, welcher in RPMI 8226 Zellen nach akuter Behandlung mit Translationsinhibitoren (CHX und EME, Abb. 4.8), sowie Faltungsantagonisten (TUNI und DTT, Abb. 4.9) und CaM-Inhibitoren (Ophio A und TFP, Abb. 4.11) moduliert werden konnte. Erst nach einer Langzeitinkubation (24 h) mit TUNI oder TFP veränderte sich die Ca^{2+} -Homöostase signifikant in NALM-6 Zellen (Abb. 4.13), was jedoch nicht mehr alleinig auf einen Sec61 α -Effekt zurückgeführt werden kann (siehe Kapitel 5.2.2). Daneben wurde untersucht, ob der Zelltod in RPMI 8226 Zellen durch diese Substanzen in Abhängigkeit der veränderten Ca^{2+} -Homöostase im Vergleich zu NALM-6 Zellen signifikant erhöht war (Abb. 4.16 A-E, 4.17 - 4.18 A-C und 4.20 A). Wie in Kapitel 5.3 bereits diskutiert, scheinen beide Zelllinien auf pharmakologisch-induziertem ER-Stress mit gleicher Sensitivität zu reagieren, was vermutlich dem protektiven Effekt der Proteine aus der Bcl-2-Familie geschuldet ist (siehe Kapitel 5.4). Tabelle 5.2 listet alle wirksamen Konzentrationsbereiche der Substanzen auf, welche für die Ca^{2+} -Imaging- und Viabilitätsversuche im Hinblick auf die Modulierung des Sec61 α -vermittelte Ca^{2+} -Leaks und den ER-Stress-induzierten Zelltod verwendet wurden. Hierbei verursachten die angegebenen Konzentrationen bei den Ca^{2+} -Imaging-Versuchen einen signifikanten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ nach TG-Zugabe (durch * angezeigt) und bei den Viabilitätsversuchen einen Anstieg der PI-positiven Zellen von $\geq 10\%$ (durch ** angezeigt) bei mindestens einer Zelllinie. Allerdings scheinen jedoch Zelltyp-spezifische Effekte der jeweiligen Substanzen zu existieren.

Tabelle 5.2. Auflistung der wirksamen Konzentrationsbereiche der Substanzen, welche in dieser Arbeit für die Ca^{2+} -Imaging- und Viabilitätsversuche verwendet wurden. * - signifikante Änderung der TG-Antwort bei mindestens einer Zelllinie, ** - $>10\%$ PI-positive Zellen bei mindestens einer Zelllinie, n.e. - nicht ermittelt.

Substanz	Ca^{2+} -Imaging*	Viabilität**
CHX	100-1000 μM	$\geq 10\ \mu\text{M}$
DTT	1 mM	1-10 mM
EME	100-1000 μM	1-1000 μM
IONO	10 μM	5-20 μM
Ophio A	50 μM	n.e.
TFP	10 μM	10-100 μM
TG	1 μM	0,1-10 μM
TUNI	10 $\mu\text{g/ml}$	75-100 $\mu\text{g/ml}$

Die verwendeten Konzentrationen für TG und IONO, um eine intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung detektieren zu können, sprechen mit denen in der Literatur überein (Henderson *et al.*, 2015; Schorr *et al.*, 2015; Schäuble *et al.*, 2012; Erdmann *et al.*, 2011; Palmer und Tsien, 2006; Sjöblom *et al.*, 2003). Auch mit den bereits publizierten Inkubationsbedingungen der akuten Behandlung mit TUNI, DTT, Ophio A und TFP konnte in dieser Arbeit eine Signifikanz bei dem TG-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ bestätigt werden (Schäuble *et al.*, 2012; Erdmann *et al.*, 2011). Eine 5-minütige Inkubation mit 20 μM EME führte in Zellen aus der Speicheldrüse (HSG-Zellen, engl. human submandibular gland cells) zu einem Rückgang von ~20 % der TG-Antwort, wobei in RPMI 8226 Zellen Konzentrationen von 10-1000 μM EME einen Rückgang von 6-40 % zur Folge hatte (Abb. 4.8 B). Die prä-Inkubation mit 10 μM CHX für 5 min hatte keinen Effekt in RPMI 8226 Zellen, wobei mit 100-1000 μM ein Rückgang der TG-Antwort um 12-28 % detektiert wurde (Abb. 4.8 A). Eine Vorinkubation mit 1800 μM CHX in Prostata-Adenokarzinom-Zellen (LNCaP Zelllinie) führte jedoch zu keiner Veränderung des Ca^{2+} -Leaks (Van Coppenolle *et al.*, 2004), was mit dem Effekt von CHX und EME in NALM-6 Zellen vergleichbar ist. Eine Behandlung mit TG, IONO, TUNI oder TFP scheint im Hinblick auf die Viabilität Zelltyp-Spezifische Effekte zu haben, was bereits in Kapitel 5.3 ausführlich diskutiert wurde. Eine Behandlung mit 10 μM CHX für 24 h führte in NALM-6 Zellen lediglich zu einem Rückgang der Viabilität um ~3 % (Abb. 4.16 A), was vergleichbar mit gesunden primären B-Zellen ist (Collins *et al.*, 1991). Im Vergleich dazu hatte eine solche Inkubation in RPMI 8226 Zellen eine Reduzierung von ~26 % zur Folge, was wiederum HeLa Zellen ähnelt (Jiang *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte in Makrophagen als Folge einer Inkubation von 10 μM CHX für 24 h ~95 % und in SMC (engl. smooth muscle cell) lediglich ~10 % tote Zellen detektiert werden (Croons *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation mit 0,5 μM EME in der Jurkat-Zelllinie zu einem ~75 %igen Zelltod (Möller *et al.*, 2007), während in RPMI 8226 Zellen dieser Wert erst bei einer Konzentration von 1 mM erreicht wurde (Abb. 4.20 A). Generell war die Viabilität in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen erst ab einer Konzentration von > 500 nM EME beeinträchtigt, was mit MDBK Zellen (engl. Madin-Darby bovine kidney cells) vergleichbar ist, wobei hier hervorzuheben ist, dass dies in diesen Zellen bei einem Zeitpunkt von 96 h detektiert wurde (Khandelwal *et al.*, 2017). Die Inkubation mit 1 mM DTT für 24 h hatte in RPMI 8226 Zellen nur eine geringe Erniedrigung (~5 %) der Viabilität zur Folge (Abb. 4.18 C), was mit den Werten in HeLa Zellen und Promyoblasten (HL-60 Zelllinie) übereinstimmt (Fan *et al.*, 2016; Xiang *et al.*, 2016). In HeLa Zellen wurde bei einer Konzentration von 9,6 mM DTT ein prozentualer Anteil von ~65 % toter Zellen bestimmt, wobei dieser Wert in

RPMI 8226 Zellen bereits bei einer Konzentration von 3,5 mM erreicht wurde. Die maximal verwendete Konzentration von 10 mM bewirkte in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen einen Anstieg der PI-positiven Zellen von ~85 %. Somit sind auch bei diesen Substanzen Zelltyp-spezifische Effekte zu beobachten.

Da die Krankheit Multiples Myelom in der Klinik aufgrund der hohen Sensitivität dieser Zellen unter anderem mit BTZ behandelt wird (Kouroukis *et al.*, 2014; Field-Smith *et al.*, 2006), wurden die beiden Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von BTZ behandelt (Abb. 4.18 D). Hierbei zeigten die NALM-6 Zellen unerwartet eine höhere Sensitivität als die RPMI 8226 Zellen. Die Werte der toten NALM-6 Zellen sind mit anderen Arbeiten, in denen ebenfalls die NALM-6 Zelllinie und als Modell für akute myeloische Leukämie dienende Zelllinien verwendet wurden, vergleichbar (Wang *et al.*, 2015b; Dijk *et al.*, 2011; Houghton *et al.*, 2008). Die Werte der RPMI 8226 Zellen bei einer Konzentration von 10 nM BTZ lagen bei ~24 %, was mit einer anderen Arbeit vergleichbar ist (Campanella *et al.*, 2013), jedoch wurden auch schon Werte von 40-60 % beschrieben (Balsas *et al.*, 2012; Kuhn *et al.*, 2012), was für eine unterschiedliche Sensitivitäten innerhalb dieser Zelllinie spricht. Im Vergleich zu einer TG-Behandlung verursachte BTZ einen hohen prozentualen Anteil toter Zellen, was vermutlich auf einen dominanten Effekt der Akkumulierung von fehlgefalteten Proteinen im Hinblick auf die Viabilität zurückzuführen ist. Dies wird durch eine Behandlung mit den p97-Inhibitoren ES1 und ES24 untermauert (Abb. 4.25). ES1 hat eine Akkumulierung von polyubiquitinierten Proteinen und einen verstärkten Sec61 α -vermittelten Ca²⁺-Leak zur Folge, während ES24 lediglich den Ca²⁺-Leak erhöht (Gamayun *et al.*, 2018). Da weniger Zellen nach einer ES24-Behandlung gestorben sind, lässt dies vermuten, dass in den verwendeten Zelllinien ein Eingriff in die zelluläre Ca²⁺-Homöostase einen geringeren Effekt als eine Akkumulierung fehlgefalteter Proteine hat. In dieser Arbeit wurde weiterhin die Sensitivität auf Inhibitoren des Energie-Metabolismus untersucht. Eine Auflistung dieser Substanzen ist der Tabelle 5.3 zu entnehmen.

Tabelle 5.3. Auflistung der wirksamen Konzentrationsbereiche der Substanzen, welche in dieser Arbeit nur für die Viabilitätsversuche verwendet wurden. * - >10 % PI-positive Zellen bei mindestens einer Zelllinie.

Substanz	Viabilität*
2-DG	5-50 mM
A-11	1-20 μ M
A-12	≥ 20 μ M
C-ATR	-
CCCP	5-100 μ M
BTZ	0,0075-20 μ M
Nav	0,5-20 μ M
Oligo	0,01-100 μ M
RR	25-100 μ M
Ru360	-
Ven	5-20 μ M

Hierfür wurden die beiden Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen von Oligo, 2-DG, CCCP, RR, Ru360 oder C-ATR für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Abb. 4.19) und anschließend mit dem Guava ViaCount Reagenz beladen und mittels Durchflusszytometrie der prozentuale Anteil der toten Zellen bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Die unterschiedliche Sensitivität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen auf eine Behandlung mit Oligo bzw. 2-DG ist vermutlich auf einen unterschiedlichen Metabolismus zurückzuführen (siehe Kapitel 5.5). Jedoch ist die Sensitivität der NALM-6 Zellen bei einer 24-stündigen Behandlung mit einer Konzentration von 5-10 mM 2-DG mit der von Makrophagen, murinen B-Zellen und BAEC Zellen (engl. bovine aortic endothelial cells) vergleichbar (Mambetsariev *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011a; Matsuda *et al.*, 2009). Ebenso wie in RPMI 8226 Zellen scheint die Viabilität in primären humanen Plasmazellen selbst bei einer 5-tägigen Inkubation mit 1-3 mM 2-DG nicht dramatisch beeinträchtigt zu sein (Torigoe *et al.*, 2017). Daneben lässt sich die unveränderte Viabilität der NALM-6 Zellen nach einer Inkubation mit 1 μ M Oligo für 24 h mit der von T-Zellen vergleichen (Jones *et al.*, 2017), während in primären Plasmazellen ein cytotoxischer Effekt bekannt ist (Lam *et al.*, 2016). Die Inkubation mit dem Protonophor CCCP in einer Konzentration von 10 μ M führte in RPMI 8226 (Abb. 4.19 A), sowie in einer anderen Multiplen Myelom Zelllinie (MM.1S) zu einer ~50 %igen Reduktion der Viabilität (Kurtoglu *et al.*, 2010). Eine Konzentration von 100 μ M CCCP führte innerhalb von 24 h in einer prä-B-Zelllinie (FL5.12) bzw. 10 μ M in einer Promyelozyten-Zelllinie (HL-60) zu ~75 % toten Zellen (Wiechmann *et al.*, 2015; de Graaf *et al.*, 2004), während diese Anzahl in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen bereits bei einer

Konzentration von 50 μM erreicht wurde (Abb. 4.19 A). Da Ca^{2+} die mitochondriale ATP-Synthese beeinflussen kann (siehe Kapitel 2.6.5), wurden die Zellen mit den MCU-Inhibitoren RR und Ru360 (hoch spezifisch) behandelt. Hierbei konnte in beiden Zelllinien keine Veränderung der Viabilität in Ru360-behandelten Zellen detektiert werden (Abb. 4.19 C). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mäusen mit einer globalen Depletion von MCU überlebensfähig sind und auch der basale Metabolismus unverändert ist (Harrington und Murphy, 2015; Murphy *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2013). Nur in glatten Muskelzellen konnte eine Beeinträchtigung der Leistung beobachtet werden (Murphy *et al.*, 2014). Somit scheint der MCU für den basalen Metabolismus in Zellen nicht benötigt zu werden, was die Insensitivität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen erklären würde. Die erhöhte Sensitivität der RPMI 8226 Zellen gegenüber RR (Abb. 4.19 D), lässt jedoch auf andere Faktoren wie die alleinige MCU-Inhibition schließen. RR inhibiert daneben RyR und TRP-Kanäle (Bouron *et al.*, 2015; Cahusac, 2009; Xu *et al.*, 1998), was vermutlich zu diesem Zelltod beitragen könnte. Da aber wahrscheinlich weder RPMI 8226, noch NALM-6 Zellen RyR exprimieren (Hosoi *et al.*, 2001), scheint im Falle der RPMI 8226 Zellen die TRP-Kanäle eine Rolle im RR-induzierten Zelltod zuzukommen. Außerdem sollte mit Hilfe von C-ATR die mitochondriale ATP/ADP-Translokase (ANT, engl. adenine nucleotide translocator) inhibiert werden (Abb. 4.19 D). Jedoch hatte eine 24-stündige Inkubation mit den verwendeten Konzentrationen in beiden Zelllinien keinen Effekt auf die Viabilität. Knockout-Studien in Mäusen haben gezeigt, dass ANT1-defiziente, aber nicht ANT2-defiziente Mäuse überlebensfähig sind (Kokoszka *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2009a). Daneben wurde postuliert, dass die Rolle des ANT in der Apoptose Zelltyp- und Stimulus-abhängig zu sein scheint (Yang *et al.*, 2007b).

Um zu untersuchen, ob die RPMI 8226 und NALM-6 Zellen durch Proteine der Bcl-2-Familie vor pharmakologischem ER-Stress geschützt werden, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentration mit Nav (Inhibitor von Bcl-2, Bcl- X_L und Bcl-w), Ven (selektiver Bcl-2-Inhibitor), A-11 (selektiver Bcl- X_L -Inhibitor) oder A-12 (Mcl-1-Inhibitor) für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert (Abb. 4.22). Hierbei zeigten beide Zellen eine Bcl-2-Abhängigkeit, wobei in RPMI 8226 Zellen zusätzlich Bcl- X_L eine Rolle zu spielen scheint. Es wurde bereits eine größere Anzahl toter Zellen sowie höhere IC_{50} -Werte für RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach einer Behandlung mit Nav und Ven beschrieben (Punnoose *et al.*, 2016; Alford *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2015; Lavik *et al.*, 2015; Mazumder *et al.*, 2012), was wahrscheinlich durch einen unterschiedlichen Gehalt der Bcl-2-Proteine

innerhalb einer Zelllinie zustande kommt (siehe Kapitel 5.4). In diesen Arbeiten konnte in NALM-6 Zellen nach einer Behandlung mit 1 μM Nav ein Rückgang der Viabilität von 30-40 % detektiert werden, wohingegen in RPMI 8226 Zellen dieser Wert nach einer Nav- oder Ven-Behandlung bei ~60 % lag. Diese Werte wurden jedoch in dieser Arbeit erst bei Konzentrationen von $\geq 5 \mu\text{M}$ erreicht (Abb. 4.22 A und B). Über die Analyse der Viabilität nach einer A11- oder A-12-Behandlung sind nicht viele Daten bekannt. Jedoch weist die Sensitivität von den Multiplen Myelom Zelllinien RPMI 8226, OPM-2 und H929 einen ähnlichen Verlauf wie die in dieser Arbeit gezeigten Daten der RPMI 8226 Zellen auf (Gong *et al.*, 2016). Darüber hinaus ist der prozentuale Anteil der toten RPMI 8226 Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit A-12 ähnlich zu den Werten der Monozyten-Zelllinien THP-1 und U937 (Luedtke *et al.*, 2017). Außerdem lassen sich die NALM-6 Zellen im Hinblick auf die Anzahl der toten Zellen nach einer Inkubation mit 1-10 μM A-11 mit Lymphom-Zellen (KARPAS-422) vergleichen (Phillips *et al.*, 2015).

5.7 RPMI 8226 Zellen als Modell für eine Umgestaltung der Ca^{2+} -Homöostase

Bisher sind wenige Daten über eine detaillierte Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase während der Differenzierung von einer B- in eine Plasmazellen bekannt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die RPMI 8226 und NALM-6 Zelllinie ausgewählt, welche jeweils als Modell für Plasmazellen und prä-B-Zellen bzw. Zellen mit einer hohen oder niedrigen Proteinsyntheserate verwendet werden (siehe Kapitel 3.1.6). Hierbei wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie durch fluoreszenz-basierte und elektronenmikroskopische bildgebende Verfahren (siehe Kapitel 3.2.5), sowie deren Ca^{2+} -Homöostase durch Ca^{2+} -Imaging-Experimente unter Verwendung des ratiometrischen cytosolischen Ca^{2+} -Indikators Fura-2 (siehe Kapitel 3.2.6) untersucht. RPMI 8226 Zellen synthetisieren große Mengen von Ig (siehe Kapitel 3.1.6), weshalb diese Zellen eine abundantere Proteinsynthese-Maschinerie besitzen sollten. In der Tat konnte bei einigen Parametern eine signifikante Erhöhung detektiert werden, welche in Tabelle 5.4 aufgelistet sind. So ist die ER-Fläche im Cytoplasma in RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen um das ~7-fache signifikant erhöht, was mit einer erhöhten ER „sheet“ Länge und größeren Anzahl Membran-assoziiertes Ribosomen korreliert (Abb. 4.1 F-H). Des Weiteren wird für die enorme Proteinsynthese und die damit

verbundene Funktion der Chaperonen, welche in RPMI 8226 Zellen um das ~5-fache hochreguliert sind (Abb. 4.3 C), ein entsprechender ATP-Vorrat benötigt, welcher durch eine

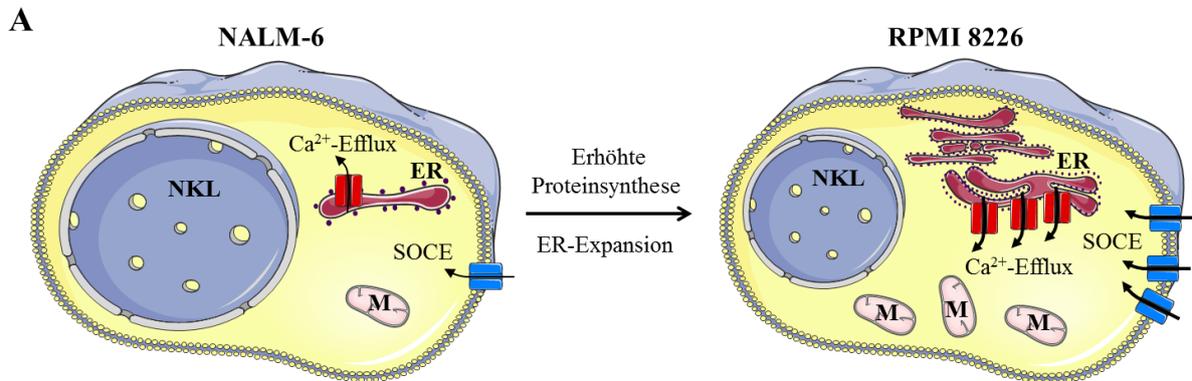
Tabelle 5.4. Vergleich der Zell-Morphologie, Expressionsniveau des Translokationsapparates und der Ca^{2+} -Homöostase in RPMI 8226 im Vergleich zu NALM-6 Zellen.

	x-fache Zunahme
ER-Fläche im Cytoplasma	~7
ER „sheet“ Länge	~2
Ribosomen (ER-Membran assoziiert)	~1,6
Mitochondrien im Cytoplasma	~2
Sec61α	~5
Chaperone	~5
Ca²⁺-Efflux	~10
SOCE	~7

erhöhte Anzahl von Mitochondrien ermöglicht wird (Abb. 4.1 D). Darüber hinaus ist für die Translokation von naszierenden Polypeptiden über die ER-Membran die Sec61 α -Untereinheit essentiell (siehe Kapitel 2.2), welche ebenso in RPMI 8226 Zellen hochreguliert ist (Abb. 4.3 C). Durch einen Vergleich mit RM auf Proteinebene konnte in NALM-6 Zellen eine Anzahl von Sec61 α -Molekülen von $3\cdot 17\cdot 10^6$ und in RPMI 8226 Zellen $50\cdot 140\cdot 10^6$ bestimmt werden (Abb. 5.1 B). Mit einer Erhöhung der genannten Parameter ging ein signifikant größerer Ca^{2+} -Efflux (~10-fach), Ca^{2+} -Gehalt (~6-fach) und stärkerer SOCE (~7-fach) in RPMI 8226 Zellen einher (Abb. 4.4 A-D und 4.6 C-D). Sec61 α fungiert zusätzlich als Ca^{2+} -permeabler Kanal, wodurch Sec61 α eine wichtige Rolle im Ca^{2+} -Efflux in diesen Zellen spielen könnte. Hierbei konnte in RPMI 8226 Zellen pharmakologisch mit einer akuten Behandlung von Translationsinhibitoren (CHX, EME), Faltungsantagonisten (TUNI, DTT) oder CaM-Inhibitoren (Ophio A, TFP) der Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Efflux moduliert werden, welcher jedoch in NALM-6 unverändert blieb (Abb. 4.8, 4.9 und 4.11). Somit haben die RPMI 8226 Zellen alle Eigenschaften einer ausdifferenzierten B-Zelle inne, wodurch diese in Übereinstimmung mit der Literatur als Plasmazell-Modell beschrieben werden können. Darüber hinaus konnte anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten zum ersten Mal eine detaillierte Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase von nicht-differenzierten und ausdifferenzierten B-Zellen durchgeführt werden. Dadurch kann die RPMI 8226 Zelllinie als

5. Diskussion

Modell für eine Umstrukturierung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase und den damit einhergehenden Proteinen herangezogen werden (Abb. 5.1 A).



B

Beschreibung	NALM-6	RPMI 8226
Sec61 α -Moleküle	3-17 \cdot 10 ⁶	50-140 \cdot 10 ⁶
Ca^{2+} -Efflux	CHX, n.s.	CHX \downarrow
	EME, n.s.	EME \downarrow
	TUNI, n.s.	TUNI \uparrow
	DTT, n.s.	DTT \uparrow
	Ophio A, n.s.	Ophio A \uparrow
	TFP, n.s.	TFP \uparrow
Ca^{2+} -abhängiger Zelltod	+	+
Störung mitochondrialer Energiehaushalt	-	+
Protektive Proteine	Bcl-2	Bcl-2 Bcl-X _L

Abbildung 5.1. Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen bei einer ER-Expansion und der damit einhergehenden Erhöhung der Proteinsynthese. (A) Rechts ist schematisch eine RPMI 8226 Zelle dargestellt, welche einen verkleinerten Nucleus (NKL), ein höheres ER-Volumen, größeren Ca^{2+} -Efflux, stärkeren SOCE und mehr Mitochondrien (M) im Vergleich zu NALM-6 Zellen (links) besitzt. (B) Eckdaten der pharmakologischen Modulation des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Efflux und pharmakologische Induktion des Ca^{2+} -abhängigen Zelltodes und Störung der mitochondrialen ATP-Synthese. Pfeile weisen auf eine Modulation des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Efflux in RPMI 8226 Zellen hin, während in NALM-6 Zellen dieser Efflux unverändert war (n.s. – nicht signifikant). Ob der prozentuale Anteil der toten Zellen Zunahme oder nicht, wird jeweils durch ein „+“ oder „-“ dargestellt. Die aufgelisteten Proteine aus der Bcl-2-Familie schützen die Zellen vor pharmakologisch-induziertem ER-Stress.

Darüber hinaus wurde die Sensitivität beider Zelllinien gegenüber pharmakologisch-induziertem ER-Stress und Ca^{2+} -abhängigem Zelltod per Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Dabei wurde in beiden Zelllinien ein äquivalenter Anstieg der toten Zellen detektiert (Abb. 4.18). Diese vergleichsweise geringe Sensitivität der RPMI 8226 Zellen gegenüber ER-Stress steht im Gegensatz zur Ausgangshypothese, dass Zellen, welche

auf eine effiziente ER-Funktion angewiesen sind, anfälliger auf Störungen der Proteintranslokationsmaschinerie oder Ca^{2+} -Homöostase des ER reagieren. Diese Tatsache ist der Funktion von Proteinen aus der Bcl-2-Familie geschuldet, welche die Zellen vor ER-Stress-induziertem und Ca^{2+} -abhängigen Zelltod schützen (Abb. 4.23). In Zukunft könnte jedoch durch Kombination mit Ca^{2+} -Imaging-Experimenten und Bcl-2-Inhibitoren überprüft werden, ob eine Regulation des Sec61 α -vermittelten Ca^{2+} -Efflux durch Bcl-2-Proteine vorliegt und somit der Ca^{2+} -abhängige Zelltod reguliert wird, wodurch eine direkte Beteiligung von Sec61 α bestätigt werden könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem durch eine Behandlung mit Inhibitoren, welche auf unterschiedliche Weise in den mitochondrialen Energiehaushalt eingriffen, gezeigt werden, dass die RPMI 8226 Zellen sensitiver auf solche Substanzen reagieren und somit vermutlich stärker von der Aktivität der ATP-Synthase abhängig sind (Abb. 4.19). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die RPMI 8226 Zellen diese Art der ATP-Bereitstellung für die Aufrechterhaltung der Ig-Synthese und ER-Funktion benötigen (siehe Kapitel 5.5). Somit geben die in dieser Arbeit gezeigten Daten den Phänotyp der Umstrukturierung des ERs und der damit einhergehenden veränderten Ca^{2+} -Homöostase in Plasmazellen wider, wobei gleichzeitig Sec61 α in den Vordergrund gestellt wird und darüber hinaus für die putative physiologische Regulation der ATP-Synthase wichtig sein könnte (Klein *et al.*, 2018).

6. Anhang

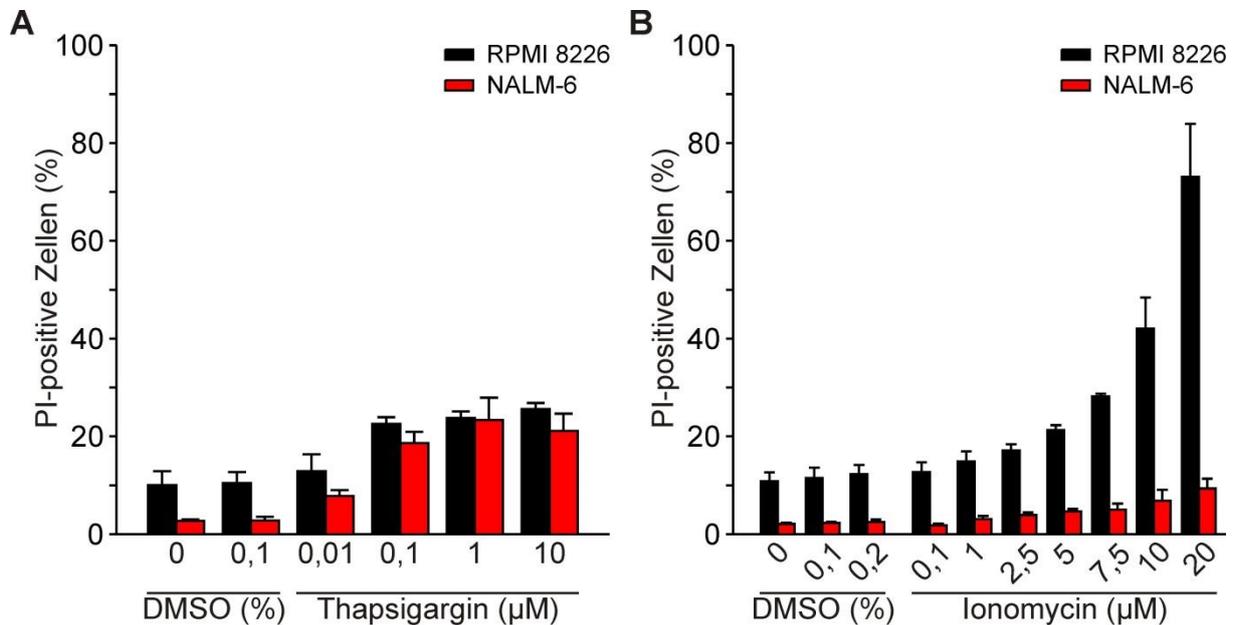


Abbildung 6.1. Viabilität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach pharmakologischer Manipulation der Ca^{2+} -Homöostase. (A) Die Zellen wurden entweder mit 0 %, 0,1 % DMSO oder mit den angegebenen Konzentration von TG für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in Kulturmedium inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). (B) Die Zellen wurden wie in A behandelt mit der Ausnahme, dass IONO anstelle von TG verwendet wurde. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

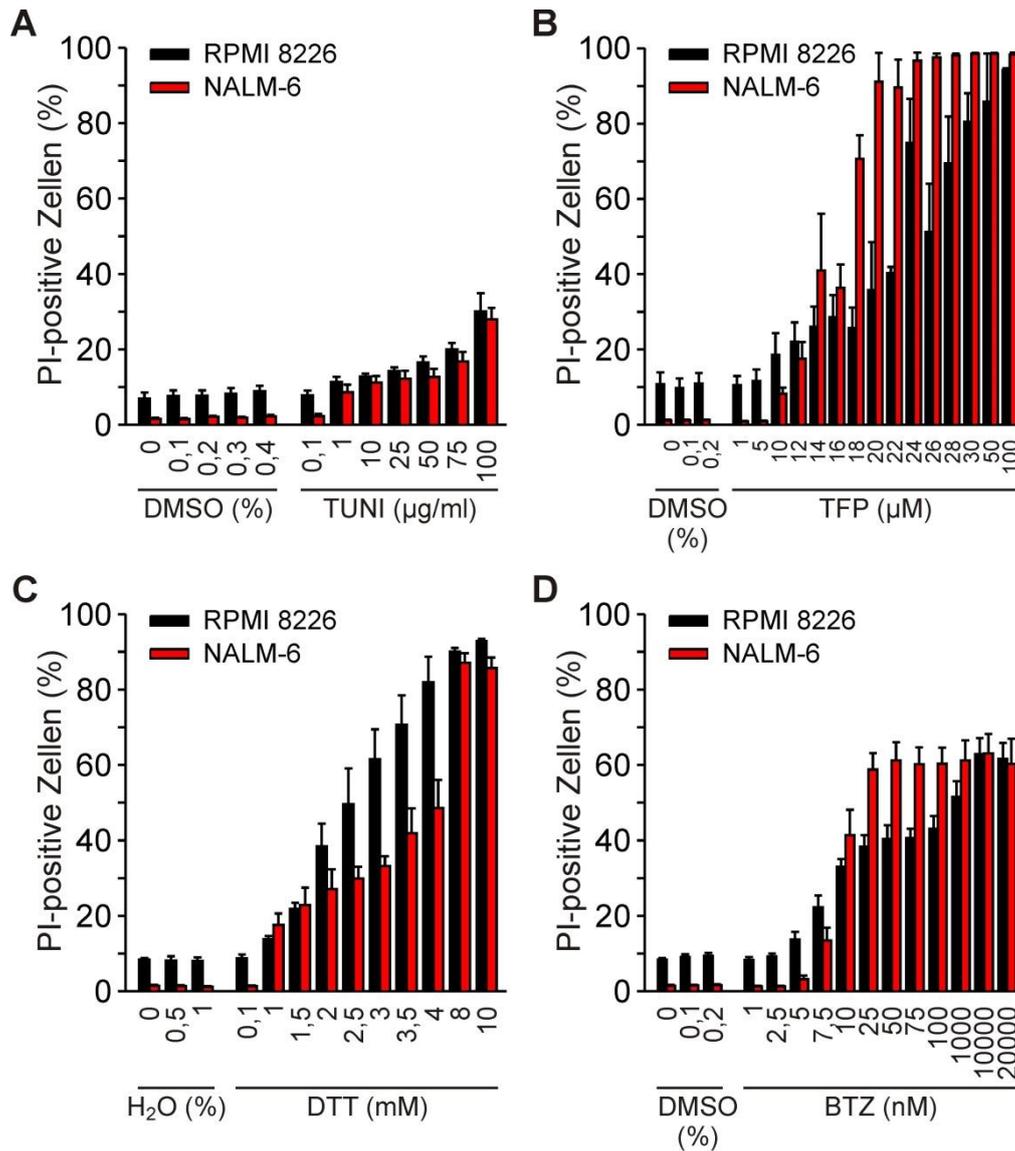


Abbildung 6.2. Untersuchung der Sensitivität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Induzierung von ER-Stress. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von TUNI (A), TFP (B), DTT (C) oder BTZ (D) für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kulturmedium inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

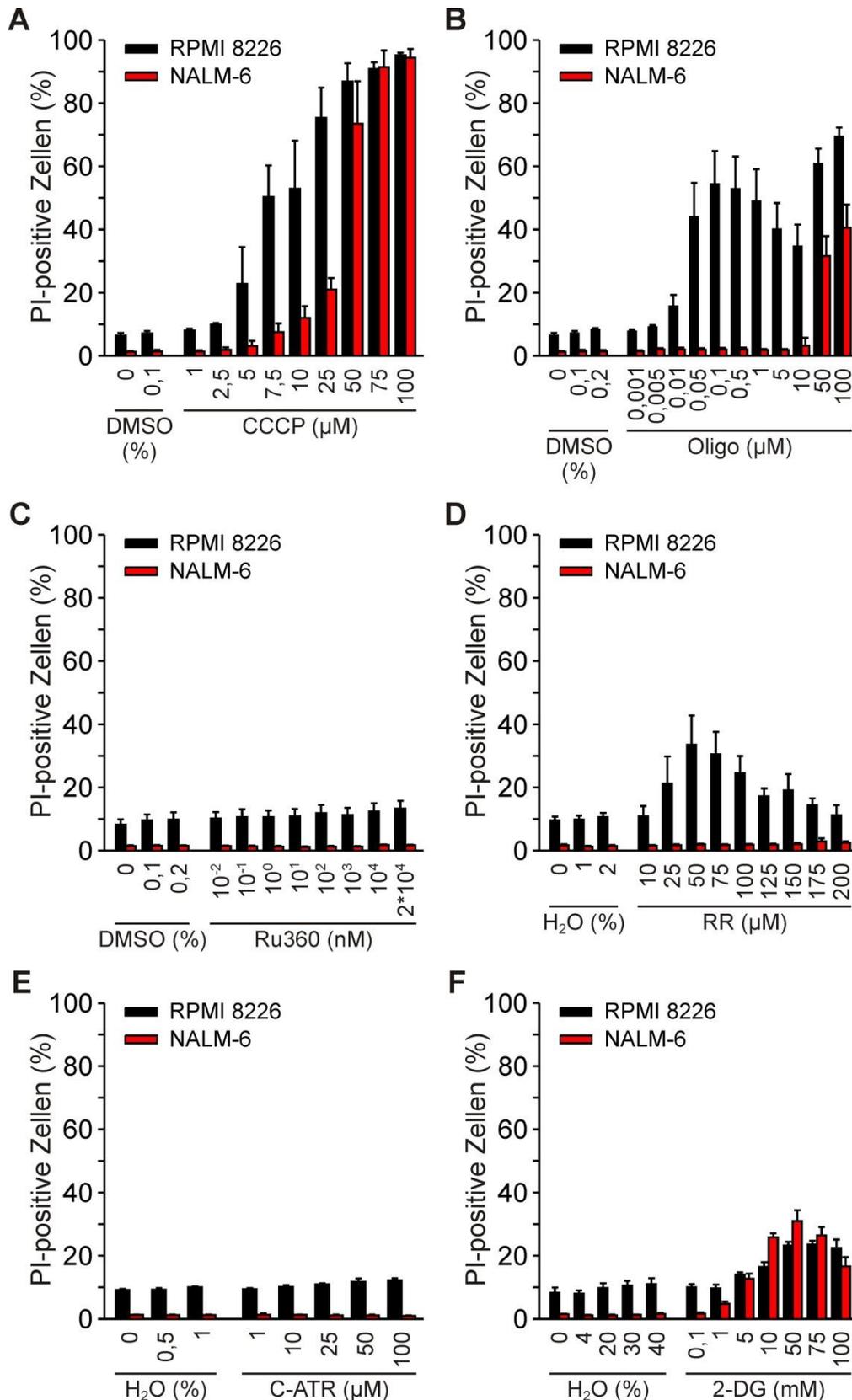


Abbildung 6.3. Detektion der Viabilität der RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach Beeinträchtigung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase und Energiehaushalt. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von CCCP (A), Oligo (B), Ru360 (C), RR (D), C-ATR (E) oder 2-DG (F) für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 in Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

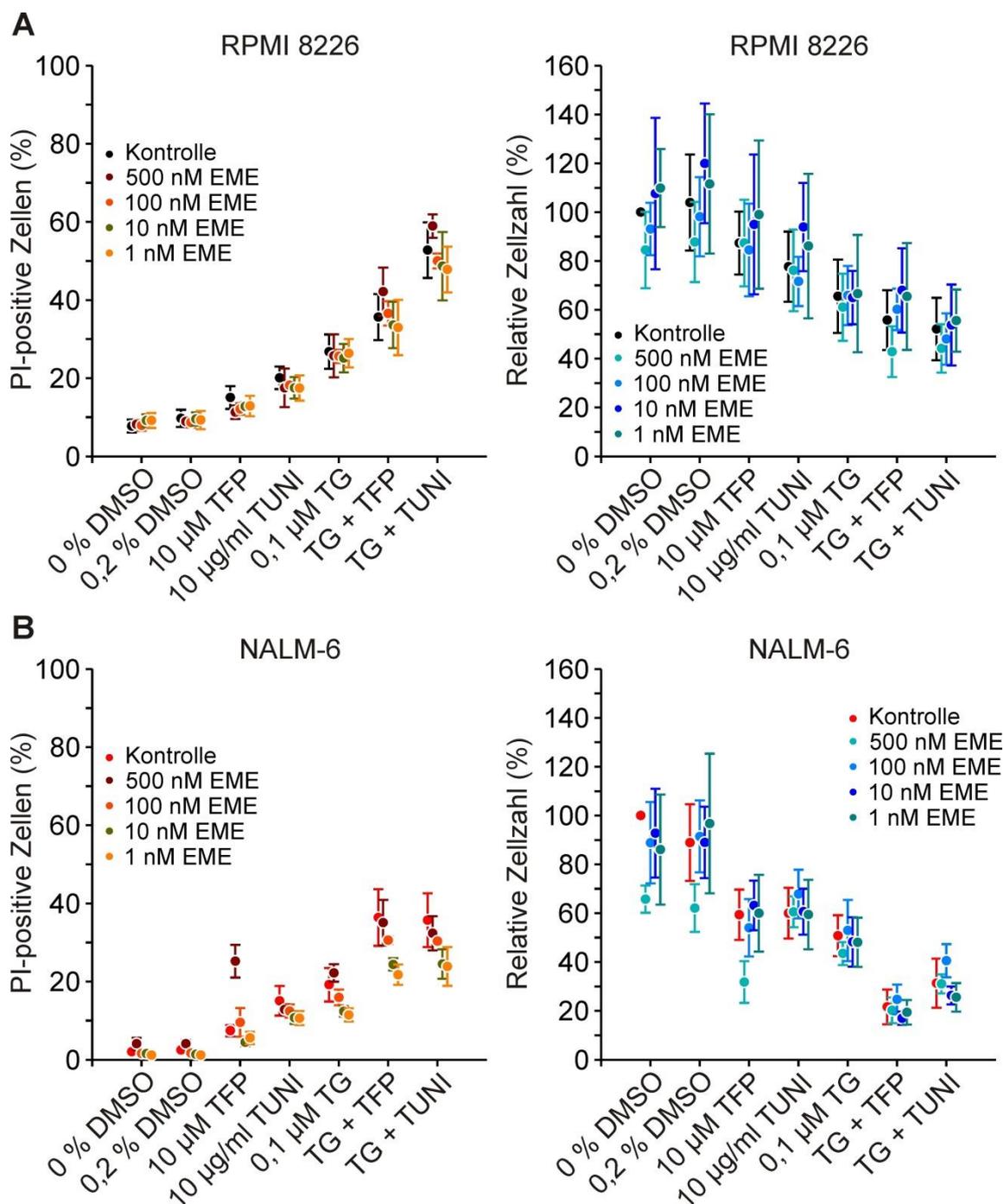


Abbildung 6.4. Viabilität und Proliferation von RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach prä-Inkubation mit EME und induziertem ER-Stress. RPMI 8226 (A) und NALM-6 Zellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von EME für eine Stunde in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden dann in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0 %, 0,2 % DMSO, 10 µg/ml TUNI, 10 µM TFP, 0,1 µM TG oder die Kombination TG + TUNI oder TG + TFP für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis von 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Guava easyCyte 8HT). Die Proliferation wurde mittels einer Trypan-Blau-Färbung und der „Countess® Automated Cell Counter“ detektiert. Die Viabilität wurde in Duplikaten und die Proliferation in Replikaten gemessen. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt (PI - Propidiumiodid, n = 4).

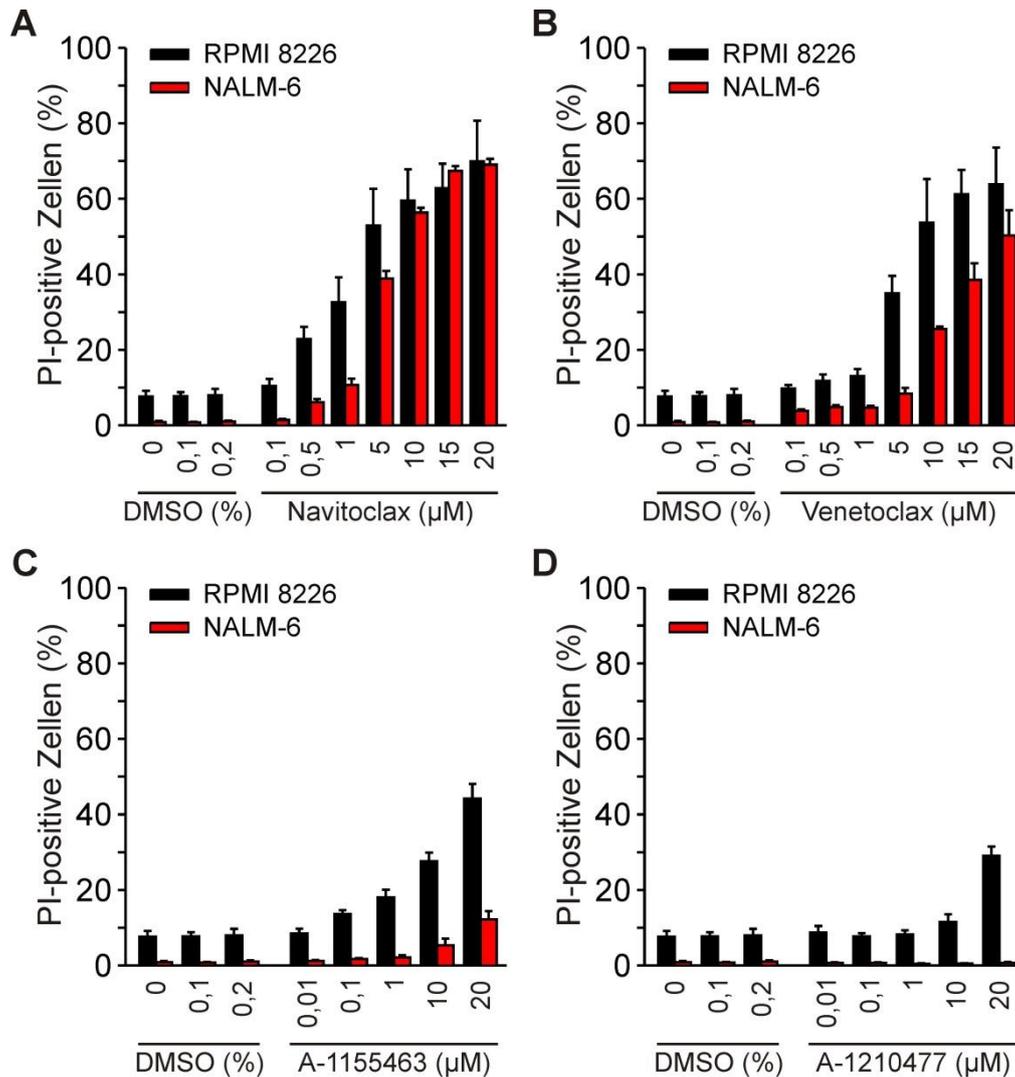


Abbildung 6.5. Effekt von Inhibitoren der anti-apoptotischen Proteine aus der Bcl-2-Familie in RPMI 8226 und NALM-6 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Navitoclax (Nav, Inhibitor von Bcl-2, Bcl-XL und Bcl-w), Venetoclax (Ven, selektiver Bcl-2-Inhibitor), A-1155463 (A-11, selektiver BCL-X_L-Inhibitor) oder A-1210477 (A-12, MCL-1-Inhibitor) für 24 h in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

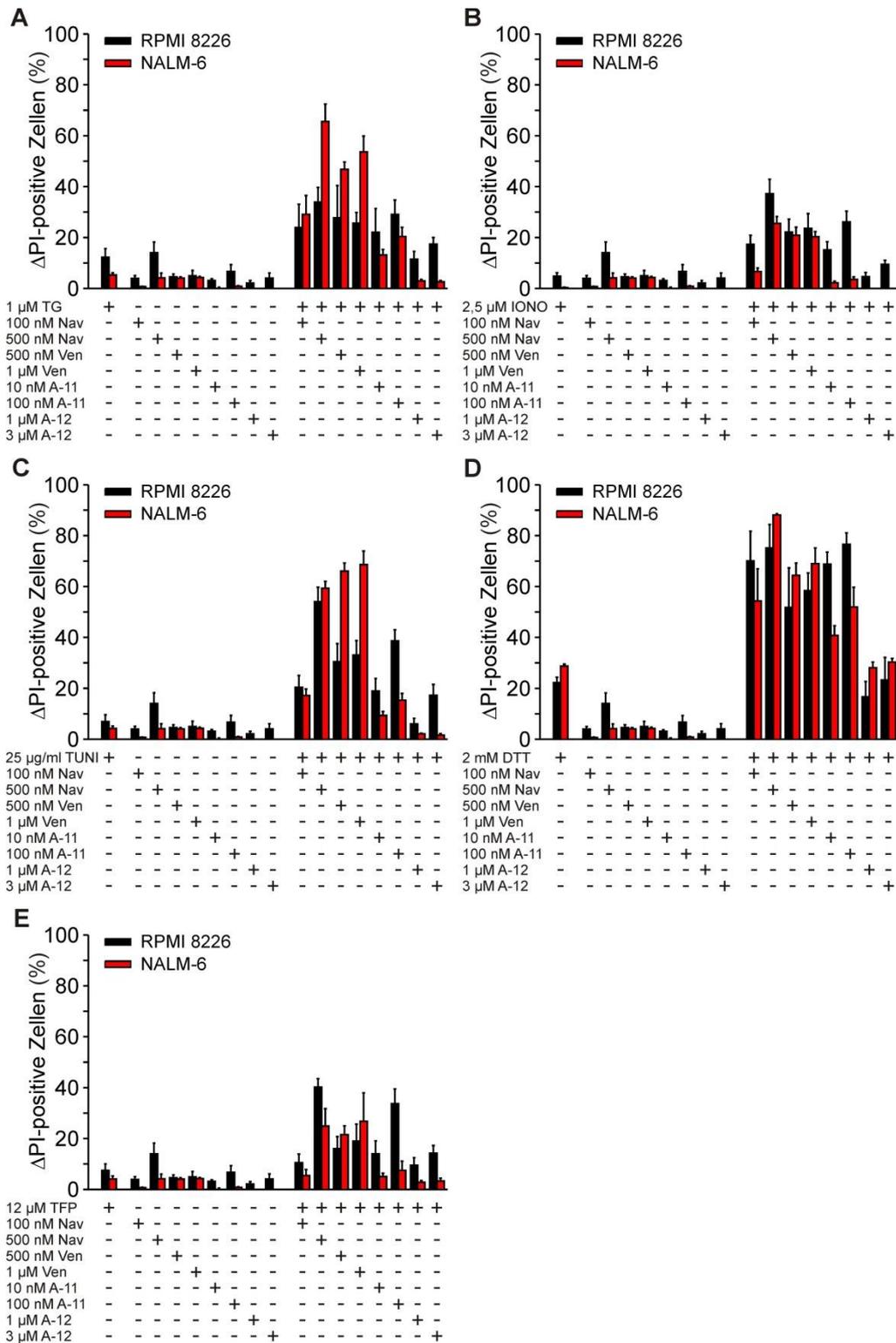


Abbildung 6.7. Zunahme des Netto-Wertes der PI-positiven RPMI 8226 und NALM-6 Zellen nach pharmakologisch-induzierten ER-Stress und additionaler Inhibition der anti-apoptotischen Proteine aus der Bcl-2-Familie. Die Zellen wurden mit 1 μ M TG (A), 2,5 μ M IONO (B), 25 μ g/ml TUNI (C), 2 mM DTT (D) oder 12 μ M TFP (E) in Kombination mit Nav (100 oder 500 nM), Ven (500 nM oder 1 μ M), A-11 (10 oder 100 nM) oder A-12 (1 oder 3 μ M) in Kulturmedium für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS und dem Guava ViaCount Reagenz im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert und die toten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Guava easyCyte 8HT). Zur Auswertung wurden die Werte von der jeweiligen Kontrolle subtrahiert, wodurch der Netto-Anstieg der PI-positiven Zellen nach Behandlung abgelesen werden kann (Δ PI-positive Zellen). Die Werte sind als Mittelwert \pm SD dargestellt und die einzelnen Versuche wurden als Duplikate gemessen (PI - Propidiumiodid, n = 4).

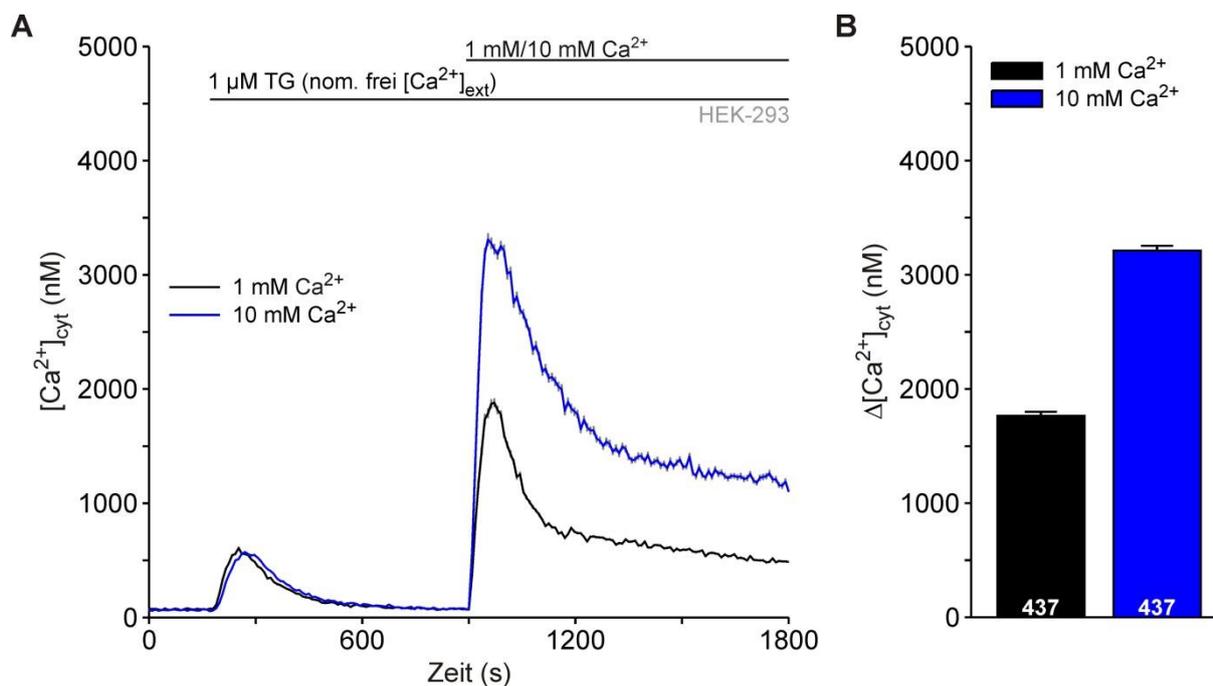


Abbildung 6.8. SOCE in HEK-293 Zellen. Für die Calcium-Imaging-Versuche wurden die Zellen mit 4 μ M Fura-2 AM in 1 mM $[Ca^{2+}]_{ext}$ für 20 min bei RT beladen. (A) Das ER wurde durch die Zugabe von 1 μ M TG in Anwesenheit von nominal freier Ca^{2+} -Lösung (nom. frei $[Ca^{2+}]_{ext}$) entleert. Nach insgesamt 15 min wurde entweder 1 mM oder 10 mM extrazelluläres Ca^{2+} hinzugegeben, um den SOCE zu detektieren. (B) Statistische Auswertung des durch in A gezeigten SOCE-induzierten Anstiegs der $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Die Anzahl der analysierten Zellen ist von 6 unabhängigen Experimenten angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M..

7. Literaturverzeichnis

- Abdoul-Azize, S., Dubus, I. und Vannier, J. P.** (2017). "Improvement of dexamethasone sensitivity by chelation of intracellular Ca²⁺ in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells through the prosurvival kinase ERK1/2 deactivation." *Oncotarget* 8(16): 27339-27352.
- Abramov, A. Y. und Duchon, M. R.** (2003). "Actions of ionomycin, 4-BrA23187 and a novel electrogenic Ca²⁺ ionophore on mitochondria in intact cells." *Cell Calcium* 33(2): 101-112.
- Adams, J. M. und Cory, S.** (2007). "Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential." *Curr Opin Immunol* 19(5): 488-496.
- Advani, M. J., Siddiqui, I., Sharma, P. und Reddy, H.** (2012). "Activity of trifluoperazine against replicating, non-replicating and drug resistant M. tuberculosis." *PLoS One* 7(8): e44245.
- Ahn, T., Yun, C. H., Kim, H. R. und Chae, H. J.** (2010). "Cardiolipin, phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate Ca²⁺/H⁺ antiporter activity of human Bax inhibitor-1." *Cell Calcium* 47(4): 387-396.
- Aitken, R. J., Jones, K. T. und Robertson, S. A.** (2012). "Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health." *J Androl* 33(6): 1096-1106.
- Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y. und Tsujimoto, Y.** (1994). "Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes." *Cancer Res* 54(9): 2468-2471.
- Alansary, D., Bogeski, I. und Niemeyer, B. A.** (2015). "Facilitation of Orai3 targeting and store-operated function by Orai1." *Biochim Biophys Acta* 1853(7): 1541-1550.
- Alavian, K. N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., Chen, Y., Messerli, S. M., Mariggio, M. A., Rahner, C., McNay, E., Shore, G. C., Smith, P. J., Hardwick, J. M. und Jonas, E. A.** (2011). "Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase." *Nat Cell Biol* 13(10): 1224-1233.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P.** (2002). "Molecular Biology of the Cell". 4th edition. New York: Garland Science.
- Alder, N. N., Shen, Y., Brodsky, J. L., Hendershot, L. M. und Johnson, A. E.** (2005). "The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 168(3): 389-399.
- Alfonso, S., Benito, O., Alicia, S., Angelica, Z., Patricia, G., Diana, K. und Vaca, L.** (2008). "Regulation of the cellular localization and function of human transient receptor potential channel 1 by other members of the TRPC family." *Cell Calcium* 43(4): 375-387.
- Alford, S. E., Kothari, A., Loeff, F. C., Eichhorn, J. M., Sakurikar, N., Goselink, H. M., Saylor, R. L., Jedema, I., Falkenburg, J. H. und Chambers, T. C.** (2015). "BH3 Inhibitor Sensitivity and Bcl-2 Dependence in Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells." *Cancer Res* 75(7): 1366-1375.
- Ambudkar, I. S.** (2012). "Polarization of calcium signaling and fluid secretion in salivary gland cells." *Curr Med Chem* 19(34): 5774-5781.

- Amer, M. S., Li, J., O'Regan, D. J., Steele, D. S., Porter, K. E., Sivaprasadarao, A. und Beech, D. J.** (2009). "Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296(4): H910-916.
- Ampofo, E., Welker, S., Jung, M., Muller, L., Greiner, M., Zimmermann, R. und Montenarh, M.** (2013). "CK2 phosphorylation of human Sec63 regulates its interaction with Sec62." *Biochim Biophys Acta* 1830(4): 2938-2945.
- Anderson, K. A. und Kane, C. D.** (1998). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV and calcium signaling." *Biometals* 11(4): 331-343.
- Andrews, A. T.** (1986). "Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications". Oxford (Oxfordshire); New York. Clarendon Press; Oxford University Press.
- Andreyev, A., Tamrakar, P., Rosenthal, R. E. und Fiskum, G.** (2018). "Calcium uptake and cytochrome c release from normal and ischemic brain mitochondria." *Neurochem Int* 117: 15-22.
- Andreyev, A. Y., Fahy, B. und Fiskum, G.** (1998). "Cytochrome c release from brain mitochondria is independent of the mitochondrial permeability transition." *FEBS Lett* 439(3): 373-376.
- Anelli, T. und van Anken, E.** (2013). "Missing links in antibody assembly control." *Int J Cell Biol* 2013: 606703.
- Angelin-Duclos, C., Cattoretti, G., Lin, K. I. und Calame, K.** (2000). "Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo." *J Immunol* 165(10): 5462-5471.
- Anttonen, A. K., Mahjneh, I., Hamalainen, R. H., Lagier-Tourenne, C., Kopra, O., Waris, L., Anttonen, M., Joensuu, T., Kalimo, H., Paetau, A., Tranebjaerg, L., Chaigne, D., Koenig, M., Eeg-Olofsson, O., Udd, B., Somer, M., Somer, H. und Lehesjoki, A. E.** (2005). "The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone." *Nat Genet* 37(12): 1309-1311.
- Aragon, I. V., Barrington, R. A., Jackowski, S., Mori, K. und Brewer, J. W.** (2012). "The specialized unfolded protein response of B lymphocytes: ATF6alpha-independent development of antibody-secreting B cells." *Mol Immunol* 51(3-4): 347-355.
- Araki, K. und Nagata, K.** (2012). "Protein folding and quality control in the ER." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(8): a015438.
- Argon, Y. und Simen, B. B.** (1999). "GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties." *Semin Cell Dev Biol* 10(5): 495-505.
- Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C. R. und et al.** (1992). "Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40." *Nature* 357(6373): 80-82.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. und Wollheim, C. B.** (1992). "Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines." *Endocrinology* 130(1): 167-178.
- Ashida, H., Hong, Y., Murakami, Y., Shishioh, N., Sugimoto, N., Kim, Y. U., Maeda, Y. und Kinoshita, T.** (2005). "Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I." *Mol Biol Cell* 16(3): 1439-1448.
- Auclair, S. M., Bhanu, M. K. und Kendall, D. A.** (2012). "Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins." *Protein Sci* 21(1): 13-25.

- Auner, H. W., Beham-Schmid, C., Dillon, N. und Sabbattini, P.** (2010). "The life span of short-lived plasma cells is partly determined by a block on activation of apoptotic caspases acting in combination with endoplasmic reticulum stress." *Blood* 116(18): 3445-3455.
- Awe, K., Lambert, C. und Prange, R.** (2008). "Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein." *FEBS Lett* 582(21-22): 3179-3184.
- Ayalon-Soffer, M., Kamhi-Nesher, S. und Lederkremer, G. Z.** (1999). "Folding and self-assembly do not prevent ER retention and proteasomal degradation of asialoglycoprotein receptor H2a." *FEBS Lett* 460(1): 112-116.
- Azam, S., Jouvét, N., Jilani, A., Vongsamphanh, R., Yang, X., Yang, S. und Ramotar, D.** (2008). "Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1." *J Biol Chem* 283(45): 30632-30641.
- Baba, Y., Matsumoto, M. und Kurosaki, T.** (2014). "Calcium signaling in B cells: regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2." *Mol Immunol* 62(2): 339-343.
- Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M. und Kurosaki, T.** (2008). "Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses." *Nat Immunol* 9(1): 81-88.
- Bae, J. H., Park, J. W. und Kwon, T. K.** (2003). "Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca²⁺ uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca²⁺ depletion and cytochrome c release." *Biochem Biophys Res Commun* 303(4): 1073-1079.
- Bagur, R. und Hajnoczky, G.** (2017). "Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling." *Mol Cell* 66(6): 780-788.
- Baksh, S. und Michalak, M.** (1991). "Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains." *J Biol Chem* 266(32): 21458-21465.
- Baldrige, R. D. und Rapoport, T. A.** (2016). "Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD." *Cell* 166(2): 394-407.
- Balsas, P., Galan-Malo, P., Marzo, I. und Naval, J.** (2012). "Bortezomib resistance in a myeloma cell line is associated to PSMbeta5 overexpression and polyploidy." *Leuk Res* 36(2): 212-218.
- Banerjee, S., Zhao, Y., Sarkar, P. S., Rosenblatt, K. P., Tilton, R. G. und Choudhary, S.** (2013). "Klotho ameliorates chemically induced endoplasmic reticulum (ER) stress signaling." *Cell Physiol Biochem* 31(4-5): 659-672.
- Barlowe, C.** (2010). "ER sheets get roughed up." *Cell* 143(5): 665-666.
- Baron, L., Paatero, A. O., Morel, J. D., Impens, F., Guenin-Mace, L., Saint-Auret, S., Blanchard, N., Dillmann, R., Niang, F., Pellegrini, S., Taunton, J., Paavilainen, V. O. und Demangel, C.** (2016). "Mycolactone subverts immunity by selectively blocking the Sec61 translocon." *J Exp Med* 213(13): 2885-2896.
- Bascos, N. A. D., Mayer, M. P., Bukau, B. und Landry, S. J.** (2017). "The Hsp40 J-domain modulates Hsp70 conformation and ATPase activity with a semi-elliptical spring." *Protein Sci* 26(9): 1838-1851.
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K. und Atherton, P. J.** (2017). "An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research." *Scand J Med Sci Sports* 27(1): 4-25.

- Batista, A. F. R., Martinez, J. C. und Hengst, U.** (2017). "Intra-axonal Synthesis of SNAP25 Is Required for the Formation of Presynaptic Terminals." *Cell Rep* 20(13): 3085-3098.
- Bauckman, K., Haller, E., Taran, N., Rockfield, S., Ruiz-Rivera, A. und Nanjundan, M.** (2015). "Iron alters cell survival in a mitochondria-dependent pathway in ovarian cancer cells." *Biochem J* 466(2): 401-413.
- Baycin-Hizal, D., Gottschalk, A., Jacobson, E., Mai, S., Wolozny, D., Zhang, H., Krag, S. S. und Betenbaugh, M. J.** (2014). "Physiologic and pathophysiologic consequences of altered sialylation and glycosylation on ion channel function." *Biochem Biophys Res Commun* 453(2): 243-253.
- Baysal, K., Jung, D. W., Gunter, K. K., Gunter, T. E. und Brierley, G. P.** (1994). "Na(+)-dependent Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger." *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): C800-808.
- 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. und Beckmann, R.** (2009). "Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome." *Science* 326(5958): 1369-1373.
- Beecroft, M. D. und Taylor, C. W.** (1998). "Luminal Ca²⁺ regulates passive Ca²⁺ efflux from the intracellular stores of hepatocytes." *Biochem J* 334 (Pt 2): 431-435.
- Beeler, T. J., Jona, I. und Martonosi, A.** (1979). "The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes." *J Biol Chem* 254(14): 6229-6231.
- Benghezal, M., Benachour, A., Rusconi, S., Aebi, M. und Conzelmann, A.** (1996). "Yeast Gpi8p is essential for GPI anchor attachment onto proteins." *EMBO J* 15(23): 6575-6583.
- Benhamron, S., Pattanayak, S. P., Berger, M. und Tirosh, B.** (2015). "mTOR activation promotes plasma cell differentiation and bypasses XBP-1 for immunoglobulin secretion." *Mol Cell Biol* 35(1): 153-166.
- Benhamron, S., Hadar, R., Iwawaky, T., So, J. S., Lee, A. H. und Tirosh, B.** (2014). "Regulated IRE1-dependent decay participates in curtailing immunoglobulin secretion from plasma cells." *Eur J Immunol* 44(3): 867-876.
- Benschop, R. J., Brandl, E., Chan, A. C. und Cambier, J. C.** (2001). "Unique signaling properties of B cell antigen receptor in mature and immature B cells: implications for tolerance and activation." *J Immunol* 167(8): 4172-4179.
- Benschop, R. J. und Cambier, J. C.** (1999). "B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates." *Curr Opin Immunol* 11(2): 143-151.
- Benz, R. und Zimmermann, U.** (1981). "The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown." *Biochim Biophys Acta* 640(1): 169-178.
- Berbey, C., Weiss, N., Legrand, C. und 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(52): 36387-36394.
- Berchtold, M. W. und Villalobo, A.** (2014). "The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer." *Biochim Biophys Acta* 1843(2): 398-435.
- Berezhnov, A. V., Soutar, M. P., Fedotova, E. I., Frolova, M. S., Plun-Favreau, H., Zinchenko, V. P. und Abramov, A. Y.** (2016). "Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy." *J Biol Chem* 291(16): 8701-8708.

- Bergling, S., Dolmetsch, R., Lewis, R. S. und Keizer, J.** (1998). "A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores." *Cell Calcium* 23(4): 251-259.
- Bergman, L. W. und Kuehl, W. M.** (1979). "Formation of an intrachain disulfide bond on nascent immunoglobulin light chains." *J Biol Chem* 254(18): 8869-8876.
- Bernales, S., McDonald, K. L. und Walter, P.** (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." *PLoS Biol* 4(12): e423.
- Bernardi, P.** (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition." *Physiol Rev* 79(4): 1127-1155.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. und Roderick, H. L.** (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.
- Berridge, M. J.** (2002). "The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle." *Cell Calcium* 32(5-6): 235-249.
- Berridge, M. J., Lipp, P. und Bootman, M. D.** (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Bers, D. M.** (2014). "Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction." *Annu Rev Physiol* 76: 107-127.
- Bers, D. M.** (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* 415(6868): 198-205.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. und Ron, D.** (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* 2(6): 326-332.
- 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. und Somlo, S.** (2017). "Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function." *J Clin Invest* 127(5): 1772-1785.
- Bhardwaj, R., Hediger, M. A. und Demaurex, N.** (2016). "Redox modulation of STIM-ORAI signaling." *Cell Calcium* 60(2): 142-152.
- Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G. und Rizzuto, R.** (2004). "Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship." *Biochim Biophys Acta* 1742(1-3): 119-131.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M. C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P. und Canaider, S.** (2013). "An estimation of the number of cells in the human body." *Ann Hum Biol* 40(6): 463-471.
- Bies, C., Blum, R., Dudek, J., Nastainczyk, W., Oberhauser, S., Jung, M. und Zimmermann, R.** (2004). "Characterization of pancreatic ERj3p, a homolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p." *Biol Chem* 385(5): 389-395.
- Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R.** (1999). "A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes." *Biol Chem* 380(10): 1175-1182.
- Bird, G. S., Hwang, S. Y., Smyth, J. T., Fukushima, M., Boyles, R. R. und Putney, J. W., Jr.** (2009). "STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling." *Curr Biol* 19(20): 1724-1729.

- Blaustein, M. P. und Lederer, W. J.** (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." *Physiol Rev* 79(3): 763-854.
- Blobel, G. und 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(3): 835-851.
- Blobel, G. und Dobberstein, B.** (1975b). "Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components." *J Cell Biol* 67(3): 852-862.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. und Cresswell, P.** (2013). "Pathways of antigen processing." *Annu Rev Immunol* 31: 443-473.
- Bochen, F., Adisurya, H., Wemmert, S., Lerner, C., Greiner, M., Zimmermann, R., Hasenfus, A., Wagner, M., Smola, S., Pfuhl, T., Bozzato, A., Al Kadah, B., Schick, B. und Linxweiler, M.** (2017). "Effect of 3q oncogenes SEC62 and SOX2 on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas." *Oncotarget* 8(3): 4922-4934.
- Bodet, L., Gomez-Bougie, P., Touzeau, C., Dousset, C., Descamps, G., Maiga, S., Avet-Loiseau, H., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C. und Amiot, M.** (2011). "ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma." *Blood* 118(14): 3901-3910.
- Boehning, D., Joseph, S. K., Mak, D. O. und Foskett, J. K.** (2001). "Single-channel recordings of recombinant inositol trisphosphate receptors in mammalian nuclear envelope." *Biophys J* 81(1): 117-124.
- 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., Padiaditakis, 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. und Loey, 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(1): 174-187.
- Bole, D. G., Hendershot, L. M. und Kearney, J. F.** (1986). "Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas." *J Cell Biol* 102(5): 1558-1566.
- Bonardi, F., Halza, E., Walko, M., Du Plessis, F., Nouwen, N., Feringa, B. L. und Driessen, A. J.** (2011). "Probing the SecYEG translocation pore size with preproteins conjugated with sizable rigid spherical molecules." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(19): 7775-7780.
- Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N. und Gillet, G.** (2013). "Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection." *Biochim Biophys Acta* 1833(7): 1755-1765.
- Bosanac, I., Michikawa, T., Mikoshiba, K. und Ikura, M.** (2004). "Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor." *Biochim Biophys Acta* 1742(1-3): 89-102.
- Bouron, A., Kiselyov, K. und Oberwinkler, J.** (2015). "Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions." *Pflugers Arch* 467(6): 1143-1164.
- Bowes, J. H. und Carter, C.W.** (1966). "Journal of the Royal Microscopical Society." Vol. 85, Pt. 2, April. Pp. 193-200.

- Boyman, L., Williams, G. S., Khananshvil, D., Sekler, I. und Lederer, W. J.** (2013). "NCLX: the mitochondrial sodium calcium exchanger." *J Mol Cell Cardiol* 59: 205-213.
- Boyman, L., Hagen, B. M., Giladi, M., Hiller, R., Lederer, W. J. und Khananshvil, D.** (2011). "Proton-sensing Ca²⁺ binding domains regulate the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger." *J Biol Chem* 286(33): 28811-28820.
- Boyman, L., Mikhasenko, H., Hiller, R. und Khananshvil, D.** (2009). "Kinetic and equilibrium properties of regulatory calcium sensors of NCX1 protein." *J Biol Chem* 284(10): 6185-6193.
- Bozzola, J. J. und Russell, L. D.** (1992). "Electron Microscopy." Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA. P. 542.
- Braakman, I. und Hebert, D. N.** (2013). "Protein folding in the endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(5): a013201.
- 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: 248-254.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S. und Meyer, T.** (2007). "STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels." *Cell* 131(7): 1327-1339.
- 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. und Lavandero, S.** (2011). "Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress." *J Cell Sci* 124(Pt 13): 2143-2152.
- Breitling, J. und Aebi, M.** (2013). "N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(8): a013359.
- Brini, M. und 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(2).
- Brodsky, J. L. und Skach, W. R.** (2011). "Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems." *Curr Opin Cell Biol* 23(4): 464-475.
- Brodsky, J. L., Goekeler, J. und Schekman, R.** (1995). "BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(21): 9643-9646.
- Bronner, F.** (2001). "Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis." *ScientificWorldJournal* 1: 919-925.
- Broughton, J., Swennen, D., Wilkinson, B. M., Joyet, P., Gaillardin, C. und Stirling, C. J.** (1997). "Cloning of SEC61 homologues from *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica* reveals the extent of functional conservation within this core component of the ER translocation machinery." *J Cell Sci* 110 (Pt 21): 2715-2727.
- Broussard, G. J., Liang, R. und Tian, L.** (2014). "Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators." *Front Mol Neurosci* 7: 97.
- Brown, M. und Wittwer, C.** (2000). "Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology." *Clin Chem* 46(8 Pt 2): 1221-1229.

- Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J. und Wickner, W.** (1990). "The purified E. coli integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation." *Cell* 62(4): 649-657.
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Jemmerson, R. und Dubinsky, J. M.** (2002). "Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane." *J Neurochem* 80(2): 207-218.
- Budnik, A. und Stephens, D. J.** (2009). "ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation." *FEBS Lett* 583(23): 3796-3803.
- Bultynck, G., Kiviluoto, S. und Methner, A.** (2014). "Bax inhibitor-1 is likely a pH-sensitive calcium leak channel, not a H⁺/Ca²⁺ exchanger." *Sci Signal* 7(343): pe22.
- 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. und Methner, A.** (2012). "The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca²⁺-permeable channel pore." *J Biol Chem* 287(4): 2544-2557.
- Buratti, R., Prestipino, G., Menegazzi, P., Treves, S. und Zorzato, F.** (1995). "Calcium dependent activation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by calmodulin." *Biochem Biophys Res Commun* 213(3): 1082-1090.
- Burikhanov, R., Zhao, Y., Goswami, A., Qiu, S., Schwarze, S. R. und Rangnekar, V. M.** (2009). "The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis." *Cell* 138(2): 377-388.
- Busciglio, J., Hartmann, H., Lorenzo, A., Wong, C., Baumann, K., Sommer, B., Staufenbiel, M. und Yankner, B. A.** (1997). "Neuronal localization of presenilin-1 and association with amyloid plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 17(13): 5101-5107.
- Bygrave, F. L. und Benedetti, A.** (1996). "What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum?" *Cell Calcium* 19(6): 547-551.
- Cahusac, P. M.** (2009). "Effects of transient receptor potential (TRP) channel agonists and antagonists on slowly adapting type II mechanoreceptors in the rat sinus hair follicle." *J Peripher Nerv Syst* 14(4): 300-309.
- Cai, H., Wang, C. C. und Tsou, C. L.** (1994). "Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds." *J Biol Chem* 269(40): 24550-24552.
- Cai, X. und Lytton, J.** (2004). "Molecular cloning of a sixth member of the K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene family, NCKX6." *J Biol Chem* 279(7): 5867-5876.
- Calame, K. L., Lin, K. I. und Tunyaplin, C.** (2003). "Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells." *Annu Rev Immunol* 21: 205-230.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. und Ron, D.** (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." *Nature* 415(6867): 92-96.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O. H. und Tepikin, A. V.** (2002). "Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling." *Cell Calcium* 32(5-6): 355-361.
- Campanella, A., Santambrogio, P., Fontana, F., Frenquelli, M., Cenci, S., Marcatti, M., Sitia, R., Tonon, G. und Camaschella, C.** (2013). "Iron increases the susceptibility of multiple myeloma cells to bortezomib." *Haematologica* 98(6): 971-979.

- Campello, S. und Scorrano, L.** (2010). "Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology." *EMBO Rep* 11(9): 678-684.
- Campello, S., Lacalle, R. A., Bettella, M., Manes, S., Scorrano, L. und Viola, A.** (2006). "Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics." *J Exp Med* 203(13): 2879-2886.
- Cao, C., Wang, S., Cui, T., Su, X. C. und Chou, J. J.** (2017). "Ion and inhibitor binding of the double-ring ion selectivity filter of the mitochondrial calcium uniporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(14): E2846-E2851.
- Carafoli, E.** (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1115-1122.
- Caride, A. J., Elwess, N. L., Verma, A. K., Filoteo, A. G., Enyedi, A., Bajzer, Z. und Penniston, J. T.** (1999). "The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca(2+) pump is slow and is changed by alternative splicing." *J Biol Chem* 274(49): 35227-35232.
- Caro-Maldonado, A., Wang, R., Nichols, A. G., Kuraoka, M., Milasta, S., Sun, L. D., Gavin, A. L., Abel, E. D., Kelsoe, G., Green, D. R. und Rathmell, J. C.** (2014). "Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells." *J Immunol* 192(8): 3626-3636.
- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C. und Ali, M. M.** (2015). "Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling." *Elife* 4.
- Carreras-Sureda, A., Pihan, P. und Hetz, C.** (2018). "Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses." *Cell Calcium* 70: 24-31.
- Carrington, E. M., Tarlinton, D. M., Gray, D. H., Huntington, N. D., Zhan, Y. und Lew, A. M.** (2017). "The life and death of immune cell types: the role of BCL-2 anti-apoptotic molecules." *Immunol Cell Biol* 95(10): 870-877.
- Caspersen, C., Pedersen, P. S. und Treiman, M.** (2000). "The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein." *J Biol Chem* 275(29): 22363-22372.
- Celsi, F., Pizzo, P., Brini, M., Leo, S., Fotino, C., Pinton, P. und Rizzuto, R.** (2009). "Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration." *Biochim Biophys Acta* 1787(5): 335-344.
- Cha, S. K., Ortega, B., Kurosu, H., Rosenblatt, K. P., Kuro, O. M. und Huang, C. L.** (2008). "Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(28): 9805-9810.
- 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. und Reed, J. C.** (2004). "BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress." *Mol Cell* 15(3): 355-366.
- Chakrabarti, A., Chen, A. W. und Varner, J. D.** (2011). "A review of the mammalian unfolded protein response." *Biotechnol Bioeng* 108(12): 2777-2793.
- Chami, M., Oules, B., Szabadkai, G., Tacine, R., Rizzuto, R. und Paterlini-Brechot, P.** (2008). "Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress." *Mol Cell* 32(5): 641-651.

- Chami, M., Gozuacik, D., Lagorce, D., Brini, M., Falson, P., Peaucellier, G., Pinton, P., Lecoq, H., Gougeon, M. L., le Maire, M., Rizzuto, R., Brechot, C. und Paterlini-Brechot, P.** (2001). "SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis." *J Cell Biol* 153(6): 1301-1314.
- Chan, C. M., Aw, J. T., Webb, S. E. und Miller, A. L.** (2016). "SOCE proteins, STIM1 and Orail1, are localized to the cleavage furrow during cytokinesis of the first and second cell division cycles in zebrafish embryos." *Zygote* 24(6): 880-889.
- Chandel, N. S.** (2014). "Mitochondria as signaling organelles." *BMC Biol* 12: 34.
- Chang, C. H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M. M., van der Windt, G. J., Tunc, E., Schreiber, R. D., Pearce, E. J. und Pearce, E. L.** (2015). "Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression." *Cell* 162(6): 1229-1241.
- Chang, C. L., Chen, Y. J., Quintanilla, C. G., Hsieh, T. S. und Liou, J.** (2018). "EB1 binding restricts STIM1 translocation to ER-PM junctions and regulates store-operated Ca(2+) entry." *J Cell Biol* 217(6): 2047-2058.
- Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W. A. und Liu, Q.** (2014). "Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes." *Science* 344(6188): 1131-1135.
- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N. und Anderson, K. C.** (2007). "A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma." *Oncogene* 26(16): 2374-2380.
- Chazin, W. J.** (2011). "Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins." *Acc Chem Res* 44(3): 171-179.
- Cheetham, M. E. und Caplan, A. J.** (1998). "Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function." *Cell Stress Chaperones* 3(1): 28-36.
- Chen, C., Huang, L., Zhang, G., Li, Y., Li, L., Bai, X., Liu, W., Wang, H. und Li, J.** (2016). "STK33 potentiates the malignancy of hypopharyngeal squamous carcinoma: Possible relation to calcium." *Cancer Biol Ther* 17(9): 976-984.
- Chen, Q. Y., Wu, L. J., Wu, Y. Q., Lu, G. H., Jiang, Z. Y., Zhan, J. W., Jie, Y. und Zhou, J. Y.** (2009). "Molecular mechanism of trifluoperazine induces apoptosis in human A549 lung adenocarcinoma cell lines." *Mol Med Rep* 2(5): 811-817.
- Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K. S., Roderick, H. L., Bootman, M. D., Berridge, M. J., Conway, S. J., Holmes, A. B., Mignery, G. A., Velez, P. und Distelhorst, C. W.** (2004). "Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate." *J Cell Biol* 166(2): 193-203.
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K. und Kim, D. S.** (2013). "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity." *Nature* 499(7458): 295-300.
- Chen, Y. B., Aon, M. A., Hsu, Y. T., Soane, L., Teng, X., McCaffery, J. M., Cheng, W. C., Qi, B., Li, H., Alavian, K. N., Dayhoff-Brannigan, M., Zou, S., Pineda, F. J., O'Rourke, B., Ko, Y. H., Pedersen, P. L., Kaczmarek, L. K., Jonas, E. A. und Hardwick, R. S.** (2013). "A calcium-sensing mechanism for mitochondrial membrane potential regulation." *Nature* 501(7466): 390-394.

- J. M.** (2011). "Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential." *J Cell Biol* 195(2): 263-276.
- Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E. C. und Blond, S. Y.** (2000). "Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1." *J Biol Chem* 275(26): 19620-19627.
- Chill, J. H., Louis, J. M., Miller, C. und Bax, A.** (2006). "NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles." *Protein Sci* 15(4): 684-698.
- Chin, D. und Means, A. R.** (2000). "Calmodulin: a prototypical calcium sensor." *Trends Cell Biol* 10(8): 322-328.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. und Green, D. R.** (2010). "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* 37(3): 299-310.
- Chiu, W. T., Chang, H. A., Lin, Y. H., Lin, Y. S., Chang, H. T., Lin, H. H., Huang, S. C., Tang, M. J. und Shen, M. R.** (2018). "Bcl(-)2 regulates store-operated Ca(2+) entry to modulate ER stress-induced apoptosis." *Cell Death Discov* 4: 37.
- Cho, C. H., Woo, J. S., Perez, C. F. und Lee, E. H.** (2017). "A focus on extracellular Ca(2+) entry into skeletal muscle." *Exp Mol Med* 49(9): e378.
- Cho, W. und Stahelin, R. V.** (2006). "Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains." *Biochim Biophys Acta* 1761(8): 838-849.
- Chyung, J. H., Raper, D. M. und 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(6): 4383-4392.
- Cieciura, S. J., Marcus, P. I. und Puck, T. T.** (1956). "Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues." *J Exp Med* 104(4): 615-628.
- Clark, E. A. und Ledbetter, J. A.** (1986). "Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(12): 4494-4498.
- Cloutier, P. und Coulombe, B.** (2013). "Regulation of molecular chaperones through post-translational modifications: decrypting the chaperone code." *Biochim Biophys Acta* 1829(5): 443-454.
- Coe, H. und Michalak, M.** (2009). "Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus: F96-F103.
- Cogliati, S., Enriquez, J. A. und Scorrano, L.** (2016). "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends Biochem Sci* 41(3): 261-273.
- Colell, A., Ricci, J. E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D. D., Beere, H. M. und Green, D. R.** (2007). "GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation." *Cell* 129(5): 983-997.
- Collins, R. J., Harmon, B. V., Souvlis, T., Pope, J. H. und Kerr, J. F.** (1991). "Effects of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis." *Br J Cancer* 64(3): 518-522.
- Conti, B. J., Devaraneni, P. K., Yang, Z., David, L. L. und 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(2): 269-283.
- Corbalan-Garcia, S. und Gomez-Fernandez, J. C.** (2014). "Signaling through C2 domains: more than one lipid target." *Biochim Biophys Acta* 1838(6): 1536-1547.

- Corbalan-Garcia, S. und Gomez-Fernandez, J. C.** (2006). "Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes." *Biochim Biophys Acta* 1761(7): 633-654.
- Corbett, E. F., Oikawa, K., Francois, P., Tessier, D. C., Kay, C., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., Krause, K. H. und Michalak, M.** (1999). "Ca²⁺ regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones." *J Biol Chem* 274(10): 6203-6211.
- Cox, J. H., Hussell, S., Sondergaard, H., Roepstorff, K., Bui, J. V., Deer, J. R., Zhang, J., Li, Z. G., Lamberth, K., Kvist, P. H., Padkjaer, S., Haase, C., Zahn, S. und Odegard, V. H.** (2013). "Antibody-mediated targeting of the Orai1 calcium channel inhibits T cell function." *PLoS One* 8(12): e82944.
- Crompton, M., Moser, R., Ludi, H. und Carafoli, E.** (1978). "The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues." *Eur J Biochem* 82(1): 25-31.
- Crompton, M., Kunzi, M. und Carafoli, E.** (1977). "The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier." *Eur J Biochem* 79(2): 549-558.
- Croons, V., Martinet, W., Herman, A. G., Timmermans, J. P. und De Meyer, G. R.** (2007). "Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by the protein synthesis inhibitor cycloheximide." *J Pharmacol Exp Ther* 320(3): 986-993.
- Cross, B. C., McKibbin, C., Callan, A. C., Roboti, P., Piacenti, M., Rabu, C., Wilson, C. M., Whitehead, R., Flitsch, S. L., Pool, M. R., High, S. und Swanton, E.** (2009). "Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* 122(Pt 23): 4393-4400.
- Crotty, S.** (2015). "A brief history of T cell help to B cells." *Nat Rev Immunol* 15(3): 185-189.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D. und Johnson, A. E.** (1994). "Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore." *Cell* 78(3): 461-471.
- Csordás, G., Weaver, D. und Hajnoczky, G.** (2018). "Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions." *Trends Cell Biol* 28(7): 523-540.
- Csordás, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A. und Hajnoczky, G.** (2006). "Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria." *J Cell Biol* 174(7): 915-921.
- Csordás, G. und Hajnoczky, G.** (2001). "Sorting of calcium signals at the junctions of endoplasmic reticulum and mitochondria." *Cell Calcium* 29(4): 249-262.
- Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B. und Annaert, W.** (2001). "The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein." *J Cell Biol* 154(4): 731-740.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. und Adams, J. M.** (2014). "Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1): 49-63.

- Czyz, A., Brutkowski, W., Fronk, J., Duszynski, J. und Zablocki, K.** (2009). "Tunicamycin desensitizes store-operated Ca²⁺ entry to ATP and mitochondrial potential." *Biochem Biophys Res Commun* 381(2): 176-180.
- D'Souza, A. A. und Devarajan, P. V.** (2015). "Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - strategies and applications." *J Control Release* 203: 126-139.
- da Silva, A. F., Mariotti, F. R., Maximo, V. und Campello, S.** (2014). "Mitochondria dynamism: of shape, transport and cell migration." *Cell Mol Life Sci* 71(12): 2313-2324.
- Dai, H., Ding, H., Meng, X. W., Peterson, K. L., Schneider, P. A., Karp, J. E. und Kaufmann, S. H.** (2015). "Constitutive BAK activation as a determinant of drug sensitivity in malignant lymphohematopoietic cells." *Genes Dev* 29(20): 2140-2152.
- Dalghi, M. G., Fernandez, M. M., Ferreira-Gomes, M., Mangialavori, I. C., Malchiodi, E. L., Strehler, E. E. und Rossi, J. P.** (2013). "Plasma membrane calcium ATPase activity is regulated by actin oligomers through direct interaction." *J Biol Chem* 288(32): 23380-23393.
- Danese, A., Patergnani, S., Bonora, M., Wieckowski, M. R., Previati, M., Giorgi, C. und Pinton, P.** (2017). "Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs)." *Biochim Biophys Acta* 1858(8): 615-627.
- Darby, N. J., Kemmink, J. und Creighton, T. E.** (1996). "Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase." *Biochemistry* 35(32): 10517-10528.
- Davidson, H. W., West, M. A. und Watts, C.** (1990). "Endocytosis, intracellular trafficking, and processing of membrane IgG and monovalent antigen/membrane IgG complexes in B lymphocytes." *J Immunol* 144(11): 4101-4109.
- Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gomez, J. D. und Kuhlbrandt, W.** (2012). "Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(34): 13602-13607.
- 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., Devuyt, O., Pirson, Y., Martin, R. S., Lifton, R. P., Tahvanainen, E., Torres, V. E. und Somlo, S.** (2004). "Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease." *Nat Genet* 36(6): 575-577.
- de Graaf, A. O., van den Heuvel, L. P., Dijkman, H. B., de Abreu, R. A., Birkenkamp, K. U., de Witte, T., van der Reijden, B. A., Smeitink, J. A. und Jansen, J. H.** (2004). "Bcl-2 prevents loss of mitochondria in CCCP-induced apoptosis." *Exp Cell Res* 299(2): 533-540.
- de Juan-Sanz, J., Holt, G. T., Schreiter, E. R., de Juan, F., Kim, D. S. und Ryan, T. A.** (2017). "Axonal Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals." *Neuron* 93(4): 867-881 e866.
- De Stefani, D., Rizzuto, R. und Pozzan, T.** (2016). "Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth." *Annu Rev Biochem* 85: 161-192.
- De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P. und Rizzuto, R.** (2012). "VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria." *Cell Death Differ* 19(2): 267-273.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I. und Rizzuto, R.** (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." *Nature* 476(7360): 336-340.

- Deb, T. B., Coticchia, C. M. und Dickson, R. B.** (2004). "Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells." *J Biol Chem* 279(37): 38903-38911.
- DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Boyles, R. R. und Putney, J. W., Jr.** (2007). "Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels." *J Biol Chem* 282(24): 17548-17556.
- Dejgaard, K., Theberge, J. F., Heath-Engel, H., Chevet, E., Tremblay, M. L. und Thomas, D. Y.** (2010). "Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis." *J Proteome Res* 9(4): 1763-1771.
- Demay, Y., Perochon, J., Szuplewski, S., Mignotte, B. und Gaumer, S.** (2014). "The PERK pathway independently triggers apoptosis and a Rac1/Slpr/JNK/Dilp8 signaling favoring tissue homeostasis in a chronic ER stress *Drosophila* model." *Cell Death Dis* 5: e1452.
- den Dekker, E., Molin, D. G., Breikers, G., van Oerle, R., Akkerman, J. W., van Eys, G. J. und Heemskerk, J. W.** (2001). "Expression of transient receptor potential mRNA isoforms and Ca(2+) influx in differentiating human stem cells and platelets." *Biochim Biophys Acta* 1539(3): 243-255.
- Denic, V., Quan, E. M. und Weissman, J. S.** (2006). "A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation." *Cell* 126(2): 349-359.
- Depreter, B., Philippe, J., Meul, M., Denys, B., Vandepoele, K., De Moerloose, B. und Lammens, T.** (2017). "Cancer-related mRNA expression analysis using a novel flow cytometry-based assay." *Cytometry B Clin Cytom.*
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R. und Amiot, M.** (2002). "Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells." *Blood* 100(1): 194-199.
- Derler, I., Plenk, P., Fahrner, M., Muik, M., Jardin, I., Schindl, R., Gruber, H. J., Groschner, K. und Romanin, C.** (2013). "The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1." *J Biol Chem* 288(40): 29025-29034.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A. und Schekman, R.** (1991). "Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex." *Nature* 349(6312): 806-808.
- Deshaies, R. J. und 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(11): 6024-6035.
- Deshaies, R. J. und Schekman, R.** (1989). "SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 109(6 Pt 1): 2653-2664.
- Di Buduo, C. A., Moccia, F., Battiston, M., De Marco, L., Mazzucato, M., Moratti, R., Tanzi, F. und Balduini, A.** (2014). "The importance of calcium in the regulation of megakaryocyte function." *Haematologica* 99(4): 769-778.
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D. und Carafoli, E.** (2008). "The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation." *Arch Biochem Biophys* 476(1): 65-74.

- Diaz-Horta, O., Kamagate, A., Herchuelz, A. und Van Eylen, F.** (2002). "Na/Ca exchanger overexpression induces endoplasmic reticulum-related apoptosis and caspase-12 activation in insulin-releasing BRIN-BD11 cells." *Diabetes* 51(6): 1815-1824.
- Dietmair, S., Hodson, M. P., Quek, L. E., Timmins, N. E., Gray, P. und Nielsen, L. K.** (2012). "A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells." *PLoS One* 7(8): e43394.
- Dijk, Mv, Murphy, E., Morrell, R., Knapper, S., O'Dwyer, M., Samali, A. und Szegezdi, E.** (2011). "The Proteasome Inhibitor Bortezomib Sensitizes AML with Myelomonocytic Differentiation to TRAIL Mediated Apoptosis." *Cancers (Basel)* 3(1): 1329-1350.
- Do, H., Falcone, D., Lin, J., Andrews, D. W. und Johnson, A. E.** (1996). "The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process." *Cell* 85(3): 369-378.
- Dollins, D. E., Warren, J. J., Immormino, R. M. und Gewirth, D. T.** (2007). "Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones." *Mol Cell* 28(1): 41-56.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. und Healy, J. I.** (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration." *Nature* 386(6627): 855-858.
- Dong, H., Chen, L., Chen, X., Gu, H., Gao, G., Gao, Y. und Dong, B.** (2009). "Dysregulation of unfolded protein response partially underlies proapoptotic activity of bortezomib in multiple myeloma cells." *Leuk Lymphoma* 50(6): 974-984.
- Dong, M., Bridges, J. P., Apsley, K., Xu, Y. und Weaver, T. E.** (2008). "ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C." *Mol Biol Cell* 19(6): 2620-2630.
- Dörr, K., Kilch, T., Kappel, S., Alansary, D., Schwar, G., Niemeyer, B. A. und Peinelt, C.** (2016). "Cell type-specific glycosylation of Orail1 modulates store-operated Ca²⁺ entry." *Sci Signal* 9(418): ra25.
- Doughty, C. A., Bleiman, B. F., Wagner, D. J., Dufort, F. J., Mataraza, J. M., Roberts, M. F. und Chiles, T. C.** (2006). "Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth." *Blood* 107(11): 4458-4465.
- Dremina, E. S., Sharov, V. S., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E. K. und Schoneich, C.** (2004). "Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)." *Biochem J* 383(Pt 2): 361-370.
- Duchen, M. R.** (2000). "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death." *J Physiol* 529 Pt 1: 57-68.
- Dudek, J., Pfeffer, S., Lee, P. H., Jung, M., Cavalié, A., Helms, V., Forster, F. und Zimmermann, R.** (2015). "Protein transport into the human endoplasmic reticulum." *J Mol Biol* 427(6 Pt A): 1159-1175.
- Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Muller, A., Lerner, M., Feick, P., Schafer, K. H., Morgenstern, E., Hennessy, F., Blatch, G. L., Janoscheck, K., Heim, N., Scholtes, P., Frien, M., Nastainczyk, W. und Zimmermann, R.** (2002). "A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes." *EMBO J* 21(12): 2958-2967.

- DuRose, J. B., Tam, A. B. und Niwa, M.** (2006). "Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress." *Mol Biol Cell* 17(7): 3095-3107.
- Dvorak, M. M., Siddiqua, A., Ward, D. T., Carter, D. H., Dallas, S. L., Nemeth, E. F. und Riccardi, D.** (2004). "Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 5140-5145.
- Dwyer, J. L.** (1993). "Electrophoretic Techniques of Analysis and Isolation." *Protein Biotechnology*. Humana Press, pp. 313-363.
- Earle, W. R., Bryant, J. C. und Schilling, E. L.** (1954). "Certain factors limiting the size of the tissue culture and the development of massive cultures." *Ann N Y Acad Sci* 58(7): 1000-1011.
- Eckenrode, E. F., Yang, J., Velmurugan, G. V., Foskett, J. K. und 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(18): 13678-13684.
- Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A. und Rutter, W. J.** (1985). "Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin." *Nature* 317(6034): 267-270.
- Elbaz-Alon, Y., Rosenfeld-Gur, E., Shinder, V., Futerman, A. H., Geiger, T. und Schuldiner, M.** (2014). "A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast." *Dev Cell* 30(1): 95-102.
- Eletto, D., Dersh, D. und Argon, Y.** (2010). "GRP94 in ER quality control and stress responses." *Semin Cell Dev Biol* 21(5): 479-485.
- Ellgaard, L., McCaul, N., Chatsisvili, A. und Braakman, I.** (2016). "Co- and Post-Translational Protein Folding in the ER." *Traffic* 17(6): 615-638.
- Elrod, J. W. und Molkenin, J. D.** (2013). "Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore." *Circ J* 77(5): 1111-1122.
- Elwess, N. L., Filoteo, A. G., Enyedi, A. und Penniston, J. T.** (1997). "Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺." *J Biol Chem* 272(29): 17981-17986.
- English, A. R. und Voeltz, G. K.** (2013). "Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4): a013227.
- Enyedi, A., Vorherr, T., James, P., McCormick, D. J., Filoteo, A. G., Carafoli, E. und Penniston, J. T.** (1989). "The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump." *J Biol Chem* 264(21): 12313-12321.
- Enyedi, A., Flura, M., Sarkadi, B., Gardos, G. und Carafoli, E.** (1987). "The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently." *J Biol Chem* 262(13): 6425-6430.
- Epstein, T., Gatenby, R. A. und Brown, J. S.** (2017). "The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand." *PLoS One* 12(9): e0185085.
- Erdmann, F., Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Honigmann, A., Ahmad, M., Dudek, J., Benedix, J., Harsman, A., Kopp, A., Helms, V., Cavalié, A., Wagner, R. und Zimmermann, R.** (2011). "Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum." *EMBO J* 30(1): 17-31.

- Erdmann, F., Jung, M., Eyrich, S., Lang, S., Helms, V., Wagner, R. und Zimmermann, R.** (2009). "Lanthanum ions inhibit the mammalian Sec61 complex in its channel dynamics and protein transport activity." *FEBS Lett* 583(14): 2359-2364.
- Erlandson, R. A.** (1987). "Application of transmission electron microscopy to human tumor diagnosis: an historical perspective." *Cancer Invest* 5(5): 487-505.
- Erler, I., Al-Ansary, D. M., Wissenbach, U., Wagner, T. F., Flockerzi, V. und Niemeyer, B. A.** (2006). "Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel." *J Biol Chem* 281(50): 38396-38404.
- Ermakov, A., Pells, S., Freile, P., Ganeva, V. V., Wildenhain, J., Bradley, M., Pawson, A., Millar, R. und De Sousa, P. A.** (2012). "A role for intracellular calcium downstream of G-protein signaling in undifferentiated human embryonic stem cell culture." *Stem Cell Res* 9(3): 171-184.
- Eschrich, S., Yang, I., Bloom, G., Kwong, K. Y., Boulware, D., Cantor, A., Coppola, D., Kruhoffer, M., Aaltonen, L., Orntoft, T. F., Quackenbush, J. und Yeatman, T. J.** (2005). "Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients." *J Clin Oncol* 23(15): 3526-3535.
- Etter, E. F., Minta, A., Poenie, M. und Fay, F. S.** (1996). "Near-membrane [Ca²⁺] transients resolved using the Ca²⁺ indicator FFP18." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(11): 5368-5373.
- Ettinger, R., Sims, G. P., Fairhurst, A. M., Robbins, R., da Silva, Y. S., Spolski, R., Leonard, W. J. und Lipsky, P. E.** (2005). "IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells." *J Immunol* 175(12): 7867-7879.
- Falchetto, R., Vorherr, T. und Carafoli, E.** (1992). "The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme." *Protein Sci* 1(12): 1613-1621.
- Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J. und Carafoli, E.** (1991). "The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain." *J Biol Chem* 266(5): 2930-2936.
- Fan, X. Y., Chen, X. Y., Liu, Y. J., Zhong, H. M., Jiang, F. L. und Liu, Y.** (2016). "Oxidative stress-mediated intrinsic apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells induced by organic arsenicals." *Sci Rep* 6: 29865.
- Fedele, S. V., So, J. S., Shrikhande, A., Lee, S. H., Gallagher, A. R., Barkauskas, C. E., Somlo, S. und Lee, A. H.** (2015). "Sec63 and Xbp1 regulate IRE1 α activity and polycystic disease severity." *J Clin Invest* 125(5): 1955-1967.
- Fedele, S. V., Tian, X., Gallagher, A. R., Mitobe, M., Nishio, S., Lee, S. H., Cai, Y., Geng, L., Crews, C. M. und 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(7): 639-647.
- Feige, M. J., Hendershot, L. M. und Buchner, J.** (2010). "How antibodies fold." *Trends Biochem Sci* 35(4): 189-198.
- Feldheim, D., Rothblatt, J. und Schekman, R.** (1992). "Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation." *Mol Cell Biol* 12(7): 3288-3296.
- Feske, S., Skolnik, E. Y. und Prakriya, M.** (2012). "Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity." *Nat Rev Immunol* 12(7): 532-547.

- Feske, S.** (2011). "Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry." *Ann N Y Acad Sci* 1238: 74-90.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. und Rao, A.** (2006). "A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." *Nature* 441(7090): 179-185.
- Feske, S., Giltneane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M. und Rao, A.** (2001). "Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes." *Nat Immunol* 2(4): 316-324.
- Feske, S., Müller, J. M., Graf, D., Kroczeck, R. A., Drager, R., Niemeyer, C., Baeuerle, P. A., Peter, H. H. und Schlesier, M.** (1996). "Severe combined immunodeficiency due to defective binding of the nuclear factor of activated T cells in T lymphocytes of two male siblings." *Eur J Immunol* 26(9): 2119-2126.
- Fiebiger, E., Hirsch, C., Vyas, J. M., Gordon, E., Ploegh, H. L. und Tortorella, D.** (2004). "Dissection of the dislocation pathway for type I membrane proteins with a new small molecule inhibitor, eeyarestatin." *Mol Biol Cell* 15(4): 1635-1646.
- Field-Smith, A., Morgan, G. J. und Davies, F. E.** (2006). "Bortezomib (Velcade) trade mark) in the Treatment of Multiple Myeloma." *Ther Clin Risk Manag* 2(3): 271-279.
- Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. und Anderton, S. M.** (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nat Immunol* 3(10): 944-950.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T. A., Hartmann, E. und 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(7): 1482-1494.
- Fleischer, S.** (2008). "Personal recollections on the discovery of the ryanodine receptors of muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 369(1): 195-207.
- Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R. und Prevarskaya, N.** (2006). "Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation." *FASEB J* 20(8): 1215-1217.
- Flynn, G. C., Chappell, T. G. und Rothman, J. E.** (1989). "Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly." *Science* 245(4916): 385-390.
- Fodor, J., Matta, C., Olah, T., Juhasz, T., Takacs, R., Toth, A., Dienes, B., Csernoch, L. und Zakany, R.** (2013). "Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells." *Cell Calcium* 54(1): 1-16.
- Foerster, C., Voelxen, N., Rakhmanov, M., Keller, B., Gutenberger, S., Goldacker, S., Thiel, J., Feske, S., Peter, H. H. und 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(12): 7305-7313.
- Fons, R. D., Bogert, B. A. und Hegde, R. S.** (2003). "Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane." *J Cell Biol* 160(4): 529-539.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K. H. und Mak, D. O.** (2007). "Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels." *Physiol Rev* 87(2): 593-658.
- Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W. L., Tschopp, J., Lew, D. P., Demareux, N. und Krause, K. H.** (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5723-5728.

- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A. und Sugimoto, C.** (2003). "PI3K/Akt and apoptosis: size matters." *Oncogene* 22(56): 8983-8998.
- Frankl, A., Mari, M. und Reggiori, F.** (2015). "Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microb Cell* 2(11): 412-428.
- Freedman, R. B., Dunn, A. D. und Ruddock, L. W.** (1998). "Protein folding: a missing redox link in the endoplasmic reticulum." *Curr Biol* 8(13): R468-470.
- Frenkel, Z., Shenkman, M., Kondratyev, M. und 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(5): 2133-2142.
- Friedman, J. R. und Voeltz, G. K.** (2011). "The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network." *Trends Cell Biol* 21(12): 709-717.
- Frischauf, I., Muik, M., Derler, I., Bergsmann, J., Fahrner, M., Schindl, R., Groschner, K. und Romanin, C.** (2009). "Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant." *J Biol Chem* 284(32): 21696-21706.
- Fritz, J. M. und Weaver, T. E.** (2014). "The BiP cochaperone ERdj4 is required for B cell development and function." *PLoS One* 9(9): e107473.
- Fritz, J. M., Dong, M., Apsley, K. S., Martin, E. P., Na, C. L., Sitaraman, S. und Weaver, T. E.** (2014). "Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects." *Mol Biol Cell* 25(4): 431-440.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K. und Hartl, F. U.** (1994). "Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones." *Nature* 370(6485): 111-117.
- Fuentes, O., Valdivia, C., Vaughan, D., Coronado, R. und Valdivia, H. H.** (1994). "Calcium-dependent block of ryanodine receptor channel of swine skeletal muscle by direct binding of calmodulin." *Cell Calcium* 15(4): 305-316.
- Fujimori, T., Suno, R., Iemura, S. I., Natsume, T., Wada, I. und Hosokawa, N.** (2017). "Endoplasmic reticulum proteins SDF2 and SDF2L1 act as components of the BiP chaperone cycle to prevent protein aggregation." *Genes Cells* 22(8): 684-698.
- Fukumori, A., Okochi, M., Tagami, S., Jiang, J., Itoh, N., Nakayama, T., Yanagida, K., Ishizuka-Katsura, Y., Morihara, T., Kamino, K., Tanaka, T., Kudo, T., Tani, H., Ikuta, A., Haass, C. und Takeda, M.** (2006). "Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct." *Biochemistry* 45(15): 4907-4914.
- 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. und Molinari, M.** (2016). "Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery." *Nat Cell Biol* 18(11): 1173-1184.
- Futatsumori-Sugai, M. und Tsumoto, K.** (2010). "Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system." *Biochem Biophys Res Commun* 391(1): 931-935.

- Gadella, T. W. J.** (2009). "FRET and FLIM Techniques. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology." Volume 33, ELSEVIER. Amsterdam (Niederlande), Oxford (England).
- Garaud, S., Taher, T. E., Debant, M., Burgos, M., Melayah, S., Berthou, C., Parikh, K., Pers, J. O., Luque-Paz, D., Chiocchia, G., Peppelenbosch, M., Isenberg, D. A., Youinou, P., Mignen, O., Renaudineau, Y. und Mageed, R. A.** (2018). "CD5 expression promotes IL-10 production through activation of the MAPK/Erk pathway and upregulation of TRPC1 channels in B lymphocytes." *Cell Mol Immunol* 15(2): 158-170.
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M. und Henson, P. M.** (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." *Cell* 123(2): 321-334.
- Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M. V., Yusupova, G. und Yusupov, M.** (2014). "Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome." *Nature* 513(7519): 517-522.
- Garshashi, M., Hadavi, V., Habibi, H., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Behjati, F., Tzschach, A., Najmabadi, H., Ropers, H. H. und Kuss, A. W.** (2008). "A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation." *Am J Hum Genet* 82(5): 1158-1164.
- Gass, J. N., Jiang, H. Y., Wek, R. C. und Brewer, J. W.** (2008). "The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells." *Mol Immunol* 45(4): 1035-1043.
- Gass, J. N., Gifford, N. M. und Brewer, J. W.** (2002). "Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells." *J Biol Chem* 277(50): 49047-49054.
- Gaudette, B. T., Iwakoshi, N. N. und Boise, L. H.** (2014). "Bcl-xL protein protects from C/EBP homologous protein (CHOP)-dependent apoptosis during plasma cell differentiation." *J Biol Chem* 289(34): 23629-23640.
- Gellerich, F. N., Gizatullina, Z., Trumbeckaite, S., Nguyen, H. P., Pallas, T., Arandarcikaite, O., Vielhaber, S., Seppet, E. und Striggow, F.** (2010). "The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium." *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7): 1018-1027.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., und Kubicek, M. T.** (1952). "Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium." *Cancer Res* 12: 264-265
- Gibson, J. F., Poole, R. K., Hughes, M. N. und Rees, J. F.** (1982). "A dimeric complex of ruthenium: a new inhibitor of respiration-driven calcium transport in Escherichia coli K12." *J Gen Microbiol* 128(9): 2211-2214.
- Gierasch, L. M.** (1989). "Signal sequences." *Biochemistry* 28(3): 923-930.
- Gil-Parrado, S., Fernandez-Montalvan, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T. A., Auerswald, E. A., Welsh, K., Reed, J. C., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Spiess, E., Salvesen, G. S. und Machleidt, W.** (2002). "Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members." *J Biol Chem* 277(30): 27217-27226.
- Giladi, M., Shor, R., Lisnyansky, M. und Khananshvili, D.** (2016). "Structure-Functional Basis of Ion Transport in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) Proteins." *Int J Mol Sci* 17(11).

- Giladi, M., Bohbot, H., Buki, T., Schulze, D. H., Hiller, R. und Khananshvili, D.** (2012). "Dynamic features of allosteric Ca²⁺ sensor in tissue-specific NCX variants." *Cell Calcium* 51(6): 478-485.
- Gilbert, H. F.** (1998). "Protein disulfide isomerase." *Methods Enzymol* 290: 26-50.
- Gilkerson, R. W., Selker, J. M. und Capaldi, R. A.** (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation." *FEBS Lett* 546(2-3): 355-358.
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G. und Bernardi, P.** (2013). "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(15): 5887-5892.
- Giunti, R., Gamberucci, A., Fulceri, R., Banhegyi, G. und Benedetti, A.** (2007). "Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes." *Arch Biochem Biophys* 462(1): 115-121.
- Glick, B. S. und Nakano, A.** (2009). "Membrane traffic within the Golgi apparatus." *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 113-132.
- Goetz, J. G., Genty, H., St-Pierre, P., Dang, T., Joshi, B., Sauve, R., Vogl, W. und Nabi, I. R.** (2007). "Reversible interactions between smooth domains of the endoplasmic reticulum and mitochondria are regulated by physiological cytosolic Ca²⁺ levels." *J Cell Sci* 120(Pt 20): 3553-3564.
- Gold, V. A., Ieva, R., Walter, A., Pfanner, N., van der Laan, M. und Kuhlbrandt, W.** (2014). "Visualizing active membrane protein complexes by electron cryotomography." *Nat Commun* 5: 4129.
- Goldfinger, M., Shmuel, M., Benhamron, S. und Tirosh, B.** (2011). "Protein synthesis in plasma cells is regulated by crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling." *Eur J Immunol* 41(2): 491-502.
- Gomez-Bougie, P., Halliez, M., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C. und Amiot, M.** (2016). "Repression of Mcl-1 and disruption of the Mcl-1/Bak interaction in myeloma cells couple ER stress to mitochondrial apoptosis." *Cancer Lett* 383(2): 204-211.
- Gomez-Bougie, P., Bataille, R. und Amiot, M.** (2004). "The imbalance between Bim and Mcl-1 expression controls the survival of human myeloma cells." *Eur J Immunol* 34(11): 3156-3164.
- Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D. P. und Miller, C. C. J.** (2017). "The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy." *Curr Biol* 27(3): 371-385.
- Gong, J. N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C. D., Garnier, J. M., Khaw, S. L., Lessene, G., Spencer, A., Herold, M. J., Roberts, A. W. und Huang, D. C. S.** (2016). "Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1." *Blood* 128(14): 1834-1844.
- Gong, Q., Anderson, C. L., January, C. T. und Zhou, Z.** (2002). "Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(1): H77-84.

- Good, K. L., Bryant, V. L. und Tangye, S. G.** (2006). "Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21." *J Immunol* 177(8): 5236-5247.
- Goonasekera, S. A., Beard, N. A., Groom, L., Kimura, T., Lyfenko, A. D., Rosenfeld, A., Marty, I., Dulhunty, A. F. und Dirksen, R. T.** (2007). "Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling." *J Gen Physiol* 130(4): 365-378.
- Görlich, D. und Rapoport, T. A.** (1993). "Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane." *Cell* 75(4): 615-630.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U. und Rapoport, T. A.** (1992a). "A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation." *Cell* 71(3): 489-503.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S. und Rapoport, T. A.** (1992b). "A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation." *Nature* 357(6373): 47-52.
- Görlich, D., Kurzchalia, T. V., Wiedmann, M. und Rapoport, T. A.** (1991). "Probing the molecular environment of translocating polypeptide chains by cross-linking." *Methods Cell Biol* 34: 241-262.
- Gotow, T., Shibata, M., Kanamori, S., Tokuno, O., Ohsawa, Y., Sato, N., Isahara, K., Yayoi, Y., Watanabe, T., Leterrier, J. F., Linden, M., Kominami, E. und Uchiyama, Y.** (2000). "Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells." *Cell Death Differ* 7(7): 666-674.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.** (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.
- Greene, M. K., Maskos, K. und Landry, S. J.** (1998). "Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6108-6113.
- Grefrath, S. P. und Reynolds, J. A.** (1974). "The molecular weight of the major glycoprotein from the human erythrocyte membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(10): 3913-3916.
- Greiner, M., Kreutzer, B., Lang, S., Jung, V., Cavalié, A., Unteregger, G., Zimmermann, R. und Wullich, B.** (2011a). "Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer." *Prostate* 71(10): 1074-1083.
- Greiner, M., Kreutzer, B., Jung, V., Grobholz, R., Hasenfus, A., Stohr, R. F., Tornillo, L., Dudek, J., Stockle, M., Unteregger, G., Kamradt, J., Wullich, B. und Zimmermann, R.** (2011b). "Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells." *Int J Cancer* 128(10): 2284-2295.
- Grollman, A. P.** (1968). "Inhibitors of protein biosynthesis. V. Effects of emetine on protein and nucleic acid biosynthesis in HeLa cells." *J Biol Chem* 243(15): 4089-4094.
- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J. und Blumberg, R. S.** (2016). "The unfolded protein response in immunity and inflammation." *Nat Rev Immunol* 16(8): 469-484.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y.** (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* 260(6): 3440-3450.

- Gudlur, A., Quintana, A., Zhou, Y., Hirve, N., Mahapatra, S. und Hogan, P. G.** (2014). "STIM1 triggers a gating rearrangement at the extracellular mouth of the ORAI1 channel." *Nat Commun* 5: 5164.
- Guerriero, C. J. und Brodsky, J. L.** (2012). "The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology." *Physiol Rev* 92(2): 537-576.
- Guha, P., Kaptan, E., Gade, P., Kalvakolanu, D. V. und Ahmed, H.** (2017). "Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1." *Oncotarget* 8(40): 68191-68207.
- Gumbart, J. und Schulten, K.** (2007). "Structural determinants of lateral gate opening in the protein translocon." *Biochemistry* 46(39): 11147-11157.
- Gunter, K. K. und Gunter, T. E.** (1994). "Transport of calcium by mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* 26(5): 471-485.
- Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R. und Gunter, K.** (2000). "Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions." *Cell Calcium* 28(5-6): 285-296.
- Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I. und Rawlings, D. J.** (2000). "Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex." *Immunity* 13(2): 243-253.
- Guo, C., Liu, S. und Sun, M. Z.** (2013). "Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor." *Clin Transl Oncol* 15(3): 167-172.
- Guo, F. und Snapp, E. L.** (2013). "ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells." *J Cell Sci* 126(Pt 6): 1429-1439.
- Gustavsson, M., Verardi, R., Mullen, D. G., Mote, K. R., Traaseth, N. J., Gopinath, T. und Veglia, G.** (2013). "Allosteric regulation of SERCA by phosphorylation-mediated conformational shift of phospholamban." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(43): 17338-17343.
- Guth, S., Volzing, C., Muller, A., Jung, M. und Zimmermann, R.** (2004). "Protein transport into canine pancreatic microsomes: a quantitative approach." *Eur J Biochem* 271(15): 3200-3207.
- Gutiérrez, T. und Simmen, T.** (2018). "Endoplasmic reticulum chaperones tweak the mitochondrial calcium rheostat to control metabolism and cell death." *Cell Calcium* 70: 64-75.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., Gelinis, C., Neems, D. S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K. und Rao, A.** (2008). "Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1." *Mol Cell Biol* 28(17): 5209-5222.
- Györke, I., Hester, N., Jones, L. R. und Györke, S.** (2004). "The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium." *Biophys J* 86(4): 2121-2128.
- Györke, I. und Györke, S.** (1998). "Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca²⁺ involves luminal Ca²⁺ sensing sites." *Biophys J* 75(6): 2801-2810.
- Haan, C. und Behrmann, I.** (2007). "A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background." *J Immunol Methods* 318(1-2): 11-19.

- Haas, I. G. und Wabl, M.** (1983). "Immunoglobulin heavy chain binding protein." *Nature* 306(5941): 387-389.
- Hacker, K. und Medler, K. F.** (2008). "Mitochondrial calcium buffering contributes to the maintenance of Basal calcium levels in mouse taste cells." *J Neurophysiol* 100(4): 2177-2191.
- Haigh, N. G. und Johnson, A. E.** (2002). "A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane." *J Cell Biol* 156(2): 261-270.
- Halestrap, A. P. und Pasdois, P.** (2009). "The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease." *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1402-1415.
- Hallek, M., Bergsagel, P. L. und Anderson, K. C.** (1998). "Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process." *Blood* 91(1): 3-21.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A. und Yoshimori, T.** (2013a). "Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites." *Nature* 495(7441): 389-393.
- Hamasaki, M., Shibutani, S. T. und Yoshimori, T.** (2013b). "Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation." *Curr Opin Cell Biol* 25(4): 455-460.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M. und 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(6): 747-758.
- Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E. und 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(4): 535-544.
- Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R., Rapoport, T. A. und Akey, C. W.** (1996). "Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation." *Cell* 87(4): 721-732.
- Hanson, C. J., Bootman, M. D., Distelhorst, C. W., Maraldi, T. und Roderick, H. L.** (2008). "The cellular concentration of Bcl-2 determines its pro- or anti-apoptotic effect." *Cell Calcium* 44(3): 243-258.
- Hanson, C. J., Bootman, M. D. und Roderick, H. L.** (2004). "Cell signalling: IP3 receptors channel calcium into cell death." *Curr Biol* 14(21): R933-935.
- Hara, M. R. und Snyder, S. H.** (2006). "Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade." *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6): 527-538.
- Hara, T., Mahadevan, J., Kanekura, K., Hara, M., Lu, S. und Urano, F.** (2014). "Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to beta-cell death." *Endocrinology* 155(3): 758-768.
- Hardie, R. C.** (2007). "TRP channels and lipids: from Drosophila to mammalian physiology." *J Physiol* 578(Pt 1): 9-24.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. und Ron, D.** (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." *Mol Cell* 6(5): 1099-1108.
- Harding, H. P., Zhang, Y. und Ron, D.** (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." *Nature* 397(6716): 271-274.
- Hardwick, J. M. und Soane, L.** (2013). "Multiple functions of BCL-2 family proteins." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(2).

- Harrington, J. L. und Murphy, E.** (2015). "The mitochondrial calcium uniporter: mice can live and die without it." *J Mol Cell Cardiol* 78: 46-53.
- Harris, P. J. F.** (2018). "Transmission Electron Microscopy of Carbon: A brief history." *C Journal of Carbon Research* 4: 4.
- Hartl, F. U., Bracher, A. und Hayer-Hartl, M.** (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* 475(7356): 324-332.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T. A.** (1994). "Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex." *Nature* 367(6464): 654-657.
- Hartmann, E., Görlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knespel, S., Burger, E., Rapoport, T. A. und Prehn, S.** (1993). "A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum." *Eur J Biochem* 214(2): 375-381.
- Harwood, N. E. und Batista, F. D.** (2008). "New insights into the early molecular events underlying B cell activation." *Immunity* 28(5): 609-619.
- Haryadi, R., Ho, S., Kok, Y. J., Pu, H. X., Zheng, L., Pereira, N. A., Li, B., Bi, X., Goh, L. T., Yang, Y. und Song, Z.** (2015). "Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells." *PLoS One* 10(2): e0116878.
- Haßdenteufel, S., Sicking, M., Schorr, S., Aviram, N., Fecher-Trost, C., Schuldiner, M., Jung, M., Zimmermann, R. und Lang, S.** (2017). "hSnd2 protein represents an alternative targeting factor to the endoplasmic reticulum in human cells." *FEBS Lett* 591(20): 3211-3224.
- Haßdenteufel, S., Klein, M. C., Melnyk, A. und Zimmermann, R.** (2014). "Protein transport into the human ER and related diseases, Sec61-channelopathies." *Biochem Cell Biol* 92(6): 499-509.
- Hatsuzawa, K., Tagaya, M. und Mizushima, S.** (1997). "The hydrophobic region of signal peptides is a determinant for SRP recognition and protein translocation across the ER membrane." *J Biochem* 121(2): 270-277.
- Hayashi, T.** (2015). "Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs." *J Pharmacol Sci* 127(1): 2-5.
- Hayashi, T., Tsai, S. Y., Mori, T., Fujimoto, M. und Su, T. P.** (2011). "Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders." *Expert Opin Ther Targets* 15(5): 557-577.
- Hayashi, T. und Su, T. P.** (2007). "Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival." *Cell* 131(3): 596-610.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. und 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(11): 3787-3799.
- Hedley, D. W., Friedlander, M. L. und Taylor, I. W.** (1985). "Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance." *Cytometry* 6(4): 327-333.
- Hegde, N. R., Chevalier, M. S., Wisner, T. W., Denton, M. C., Shire, K., Frappier, L. und Johnson, D. C.** (2006). "The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins." *J Biol Chem* 281(30): 20910-20919.

- Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J. und Rapoport, T. A.** (2000). "The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain." *Cell* 102(2): 233-244.
- Helle, S. C., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A. H. und Kornmann, B.** (2013). "Organization and function of membrane contact sites." *Biochim Biophys Acta* 1833(11): 2526-2541.
- Hemon, P., Renaudineau, Y., Debant, M., Le Goux, N., Mukherjee, S., Brooks, W. und Mignen, O.** (2017). "Calcium Signaling: From Normal B Cell Development to Tolerance Breakdown and Autoimmunity." *Clin Rev Allergy Immunol* 53(2): 141-165.
- Hendershot, L. M., Wei, J. Y., Gaut, J. R., Lawson, B., Freiden, P. J. und Murti, K. G.** (1995). "In vivo expression of mammalian BiP ATPase mutants causes disruption of the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* 6(3): 283-296.
- Henderson, M. J., Baldwin, H. A., Werley, C. A., Boccardo, S., Whitaker, L. R., Yan, X., Holt, G. T., Schreiter, E. R., Looger, L. L., Cohen, A. E., Kim, D. S. und Harvey, B. K.** (2015). "A Low Affinity GCaMP3 Variant (GCaMPer) for Imaging the Endoplasmic Reticulum Calcium Store." *PLoS One* 10(10): e0139273.
- Hennessy, F., Nicoll, W. S., Zimmermann, R., Cheetham, M. E. und Blatch, G. L.** (2005). "Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions." *Protein Sci* 14(7): 1697-1709.
- Hennessy, F., Cheetham, M. E., Dirr, H. W. und Blatch, G. L.** (2000). "Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins." *Cell Stress Chaperones* 5(4): 347-358.
- Hermanson, D., Addo, S. N., Bajer, A. A., Marchant, J. S., Das, S. G., Srinivasan, B., Al-Mousa, F., Michelangeli, F., Thomas, D. D., Lebien, T. W. und Xing, C.** (2009). "Dual mechanisms of sHA 14-1 in inducing cell death through endoplasmic reticulum and mitochondria." *Mol Pharmacol* 76(3): 667-678.
- Hessenberger, M., Zerbes, R. M., Rampelt, H., Kunz, S., Xavier, A. H., Purfurst, B., Lilie, H., Pfanner, N., van der Laan, M. und Daumke, O.** (2017). "Regulated membrane remodeling by Mic60 controls formation of mitochondrial crista junctions." *Nat Commun* 8: 15258.
- Hetzer, M. W.** (2010). "The nuclear envelope." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(3): a000539.
- High, S., Martoglio, B., Gorlich, D., Andersen, S. S., Ashford, A. J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., Dobberstein, B. und et al.** (1993). "Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence." *J Biol Chem* 268(35): 26745-26751.
- Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T. und Mikoshiba, K.** (2010). "Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor." *Neuron* 68(5): 865-878.
- Hilge, M., Aelen, J., Foorce, A., Perrakis, A. und Vuister, G. W.** (2009). "Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger features a dual electrostatic switch mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14333-14338.
- Hilge, M., Aelen, J. und Vuister, G. W.** (2006). "Ca²⁺ regulation in the Na⁺/Ca²⁺ exchanger involves two markedly different Ca²⁺ sensors." *Mol Cell* 22(1): 15-25.

- Himmel, H. M., Riehle, R., Stieler, K. und Siess, M.** (1990). "Effects of the divalent cation ionophore ionomycin on the performance of isolated guinea-pig atria." *Basic Res Cardiol* 85(3): 247-256.
- Hiramatsu, N., Chiang, W. C., Kurt, T. D., Sigurdson, C. J. und Lin, J. H.** (2015). "Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death." *Am J Pathol* 185(7): 1800-1808.
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S. C., Neuber, O. und Sommer, T.** (2009). "The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum." *Nature* 458(7237): 453-460.
- Hiss, J. A. und Schneider, G.** (2009). "Architecture, function and prediction of long signal peptides." *Brief Bioinform* 10(5): 569-578.
- Ho, N., Gullberg, M. und Chatila, T.** (1996). "Activation protein 1-dependent transcriptional activation of interleukin 2 gene by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr." *J Exp Med* 184(1): 101-112.
- Ho, P. C., Bihuniak, J. D., Macintyre, A. N., Staron, M., Liu, X., Amezquita, R., Tsui, Y. C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J. C., Kleinstein, S. H., Abel, E. D., Insogna, K. L., Feske, S., Locasale, J. W., Bosenberg, M. W., Rathmell, J. C. und Kaech, S. M.** (2015). "Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses." *Cell* 162(6): 1217-1228.
- Hofer, A. M., Curci, S., Machen, T. E. und Schulz, I.** (1996). "ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores." *FASEB J* 10(2): 302-308.
- Hofer, A. M. und Schulz, I.** (1996). "Quantification of intraluminal free [Ca] in the agonist-sensitive internal calcium store using compartmentalized fluorescent indicators: some considerations." *Cell Calcium* 20(3): 235-242.
- Hogan, P. G. und Rao, A.** (2015). "Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation." *Biochem Biophys Res Commun* 460(1): 40-49.
- Højmann Larsen, A., Frandsen, A. und Treiman, M.** (2001). "Upregulation of the SERCA-type Ca²⁺ pump activity in response to endoplasmic reticulum stress in PC12 cells." *BMC Biochem* 2: 4.
- Hollenbeck, P. J. und Saxton, W. M.** (2005). "The axonal transport of mitochondria." *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5411-5419.
- Hong, Y., Ohishi, K., Kang, J. Y., Tanaka, S., Inoue, N., Nishimura, J., Maeda, Y. und Kinoshita, T.** (2003). "Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins." *Mol Biol Cell* 14(5): 1780-1789.
- Hönscher, C., Mari, M., Auffarth, K., Bohnert, M., Griffith, J., Geerts, W., van der Laan, M., Cabrera, M., Reggiori, F. und Ungermann, C.** (2014). "Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria." *Dev Cell* 30(1): 86-94.
- Hosoi, E., Nishizaki, C., Gallagher, K. L., Wyre, H. W., Matsuo, Y. und Sei, Y.** (2001). "Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells." *J Immunol* 167(9): 4887-4894.
- Hoth, M. und Penner, R.** (1993). "Calcium release-activated calcium current in rat mast cells." *J Physiol* 465: 359-386.
- Hoth, M. und Penner, R.** (1992). "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." *Nature* 355(6358): 353-356.

- Houghton, P. J., Morton, C. L., Kolb, E. A., Lock, R., Carol, H., Reynolds, C. P., Keshelava, N., Maris, J. M., Keir, S. T., Wu, J. und Smith, M. A.** (2008). "Initial testing (stage 1) of the proteasome inhibitor bortezomib by the pediatric preclinical testing program." *Pediatr Blood Cancer* 50(1): 37-45.
- Howard, M., Farrar, J., Hilfiker, M., Johnson, B., Takatsu, K., Hamaoka, T. und Paul, W. E.** (1982). "Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2." *J Exp Med* 155(3): 914-923.
- Hu, J., Dang, N., Menu, E., De Bruyne, E., Xu, D., Van Camp, B., Van Valckenborgh, E. und Vanderkerken, K.** (2012). "Activation of ATF4 mediates unwanted Mcl-1 accumulation by proteasome inhibition." *Blood* 119(3): 826-837.
- Huang, W., Lu, C., Wu, Y., Ouyang, S. und Chen, Y.** (2015). "T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines." *J Exp Clin Cancer Res* 34: 54.
- Huck, J. D., Que, N. L., Hong, F., Li, Z. und Gewirth, D. T.** (2017). "Structural and Functional Analysis of GRP94 in the Closed State Reveals an Essential Role for the Pre-N Domain and a Potential Client-Binding Site." *Cell Rep* 20(12): 2800-2809.
- Hunter, D. R. und Haworth, R. A.** (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms." *Arch Biochem Biophys* 195(2): 453-459.
- Hurwitz, R., Hozier, J., LeBien, T., Minowada, J., Gajl-Peczalska, K., Kubonishi, I. und Kersey, J.** (1979). "Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype." *Int J Cancer* 23(2): 174-180.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D. und Dikic, I.** (2008). "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor." *Nature* 453(7194): 481-488.
- Ichas, F. und Mazat, J. P.** (1998). "From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state." *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 33-50.
- Ichhaporia, V. P., Sanford, T., Howes, J., Marion, T. N. und Hendershot, L. M.** (2015). "Sil1, a nucleotide exchange factor for BiP, is not required for antibody assembly or secretion." *Mol Biol Cell* 26(3): 420-429.
- Ikemoto, T., Iino, M. und Endo, M.** (1995). "Enhancing effect of calmodulin on Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle fibres." *J Physiol* 487 (Pt 3): 573-582.
- Ikeya, M., Yamanoue, K., Mochizuki, Y., Konishi, H., Tadokoro, S., Tanaka, M., Suzuki, R. und Hirashima, N.** (2014). "Orai-2 is localized on secretory granules and regulates antigen-evoked Ca²⁺(+) mobilization and exocytosis in mast cells." *Biochem Biophys Res Commun* 451(1): 62-67.
- Immormino, R. M., Dollins, D. E., Shaffer, P. L., Soldano, K. L., Walker, M. A. und Gewirth, D. T.** (2004). "Ligand-induced conformational shift in the N-terminal domain of GRP94, an Hsp90 chaperone." *J Biol Chem* 279(44): 46162-46171.
- Imperiali, B. und Hendrickson, T. L.** (1995). "Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase." *Bioorg Med Chem* 3(12): 1565-1578.
- Ionescu, L., Cheung, K. H., Vais, H., Mak, D. O., White, C. und Foskett, J. K.** (2006). "Graded recruitment and inactivation of single InsP3 receptor Ca²⁺-release channels: implications for quantal [corrected] Ca²⁺-release." *J Physiol* 573(Pt 3): 645-662.

- Irvine, R. F.** (1990). "'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism." *FEBS Lett* 263(1): 5-9.
- Ishii, M. und Kurachi, Y.** (2006). "Muscarinic acetylcholine receptors." *Curr Pharm Des* 12(28): 3573-3581.
- Ishikawa, M., Iwamoto, T., Nakamura, T., Doyle, A., Fukumoto, S. und Yamada, Y.** (2011). "Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation." *J Cell Biol* 193(7): 1257-1274.
- Ivankov, D. N., Payne, S. H., Galperin, M. Y., Bonissone, S., Pevzner, P. A. und Frishman, D.** (2013). "How many signal peptides are there in bacteria?" *Environ Microbiol* 15(4): 983-990.
- Iwakoshi, N. N., Lee, A. H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K. L., Rajewsky, K. und Glimcher, L. H.** (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1." *Nat Immunol* 4(4): 321-329.
- Jablonski, A.** (1933). "Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes." *Nature* 131: 839-840.
- Jafri, M. S. und Keizer, J.** (1995). "On the roles of Ca²⁺ diffusion, Ca²⁺ buffers, and the endoplasmic reticulum in IP₃-induced Ca²⁺ waves." *Biophys J* 69(5): 2139-2153.
- James, P., Vorherr, T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D. J., Penniston, J. T., De Flora, A. und Carafoli, E.** (1989). "Modulation of erythrocyte Ca²⁺-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain." *J Biol Chem* 264(14): 8289-8296.
- James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A. K., Krebs, J., Penniston, J. T. und Carafoli, E.** (1988). "Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes." *J Biol Chem* 263(6): 2905-2910.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H. und Sommer, T.** (2002). "Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48." *Nat Cell Biol* 4(2): 134-139.
- Jennewein, M. F. und Alter, G.** (2017). "The Immunoregulatory Roles of Antibody Glycosylation." *Trends Immunol* 38(5): 358-372.
- Jennings, C. D. und Foon, K. A.** (1997). "Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy." *Blood* 90(8): 2863-2892.
- Jentsch, S. und Rumpf, S.** (2007). "Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway?" *Trends Biochem Sci* 32(1): 6-11.
- Jeon, S. M.** (2016). "Regulation and function of AMPK in physiology and diseases." *Exp Mol Med* 48(7): e245.
- Ji, W. K., Chakrabarti, R., Fan, X., Schoenfeld, L., Strack, S. und Higgs, H. N.** (2017). "Receptor-mediated Drp1 oligomerization on endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* 216(12): 4123-4139.
- Jia, W., Pua, H. H., Li, Q. J. und He, Y. W.** (2011). "Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes." *J Immunol* 186(3): 1564-1574.
- Jiang, D., Lynch, C., Medeiros, B. C., Liedtke, M., Bam, R., Tam, A. B., Yang, Z., Alagappan, M., Abidi, P., Le, Q. T., Giaccia, A. J., Denko, N. C., Niwa, M. und Koong,**

- A. C.** (2016). "Identification of Doxorubicin as an Inhibitor of the IRE1alpha-XBP1 Axis of the Unfolded Protein Response." *Sci Rep* 6: 33353.
- Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E. M. und Sousa, R.** (2005). "Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone." *Mol Cell* 20(4): 513-524.
- Jiang, Q., Wei, H. und Tian, Z.** (2008). "Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway." *BMC Cancer* 8: 12.
- Jin, Y., Zhuang, M. und Hendershot, L. M.** (2009). "ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues." *Biochemistry* 48(1): 41-49.
- Jin, Y., Awad, W., Petrova, K. und Hendershot, L. M.** (2008). "Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP." *EMBO J* 27(21): 2873-2882.
- Johnson, J. L., Napolitano, G., Monfregola, J., Rocca, C. J., Cherqui, S. und Catz, S. D.** (2013a). "Upregulation of the Rab27a-dependent trafficking and secretory mechanisms improves lysosomal transport, alleviates endoplasmic reticulum stress, and reduces lysosome overload in cystinosis." *Mol Cell Biol* 33(15): 2950-2962.
- Johnson, N., Powis, K. und High, S.** (2013b). "Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum." *Biochim Biophys Acta* 1833(11): 2403-2409.
- Jonas, E. A., Porter, G. A., Jr., Beutner, G., Mnatsakanyan, N. und Alavian, K. N.** (2015). "Cell death disguised: The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F(1)F(O) ATP synthase." *Pharmacol Res* 99: 382-392.
- Jones, N., Cronin, J. G., Dolton, G., Panetti, S., Schauenburg, A. J., Galloway, S. A. E., Sewell, A. K., Cole, D. K., Thornton, C. A. und Francis, N. J.** (2017). "Metabolic Adaptation of Human CD4(+) and CD8(+) T-Cells to T-Cell Receptor-Mediated Stimulation." *Front Immunol* 8: 1516.
- Jung, D. W., Baysal, K. und Brierley, G. P.** (1995). "The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral." *J Biol Chem* 270(2): 672-678.
- Jung, H. und Akkus, O.** (2016). "Activation of intracellular calcium signaling in osteoblasts colocalizes with the formation of post-yield diffuse microdamage in bone matrix." *Bonekey Rep* 5: 778.
- Jung, S. J., Kim, J. E., Reithinger, J. H. und Kim, H.** (2014). "The Sec62-Sec63 translocon facilitates translocation of the C-terminus of membrane proteins." *J Cell Sci* 127(Pt 19): 4270-4278.
- Jung, V., Kindich, R., Kamradt, J., Jung, M., Müller, M., Schulz, W. A., Engers, R., Unteregger, G., Stockle, M., Zimmermann, R. und 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(3): 169-176.
- Junger, W. G.** (2011). "Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling." *Nat Rev Immunol* 11(3): 201-212.
- Kabani, M., Kelley, S. S., Morrow, M. W., Montgomery, D. L., Sivendran, R., Rose, M. D., Gierasch, L. M. und Brodsky, J. L.** (2003). "Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP." *Mol Biol Cell* 14(8): 3437-3448.
- Kaddour-Djebbar, I., Choudhary, V., Lakshmikanthan, V., Shirley, R., El Gaish, M., Al-Shabrawey, M., Al-Husein, B., Zhong, R., Davis, M., Dong, Z., Bollag, W. B. und**

- Kumar, M. V.** (2012). "Diltiazem enhances the apoptotic effects of proteasome inhibitors to induce prostate cancer cell death." *J Pharmacol Exp Ther* 341(3): 646-655.
- Kaiser, M. L. und Römisch, K.** (2015). "Proteasome 19S RP binding to the Sec61 channel plays a key role in ERAD." *PLoS One* 10(2): e0117260.
- Kalies, K. U. und Römisch, K.** (2015). "Inhibitors of Protein Translocation Across the ER Membrane." *Traffic* 16(10): 1027-1038.
- Kalies, K. U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger, H. und Römisch, K.** (2005). "The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane." *EMBO J* 24(13): 2284-2293.
- Kalies, K. U., Rapoport, T. A. und Hartmann, E.** (1998). "The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation." *J Cell Biol* 141(4): 887-894.
- Kalra, R., Singh, S. P., Savage, S. M., Finch, G. L. und Sopori, M. L.** (2000). "Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca(2+) stores." *J Pharmacol Exp Ther* 293(1): 166-171.
- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S. V., Ehrlich, R. und Lederkremer, G. Z.** (2001). "A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* 12(6): 1711-1723.
- Kampinga, H. H. und Craig, E. A.** (2010). "The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8): 579-592.
- Kanapin, A., Batalov, S., Davis, M. J., Gough, J., Grimmond, S., Kawaji, H., Magrane, M., Matsuda, H., Schonbach, C., Teasdale, R. D., Yuan, Z., Group, Riken Ger und Members, G. S. L.** (2003). "Mouse proteome analysis." *Genome Res* 13(6B): 1335-1344.
- Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T. und Pazdur, R.** (2003). "Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy." *Oncologist* 8(6): 508-513.
- Kang, S., Hong, J., Lee, J. M., Moon, H. E., Jeon, B., Choi, J., Yoon, N. A., Paek, S. H., Roh, E. J., Lee, C. J. und Kang, S. S.** (2017). "Trifluoperazine, a Well-Known Antipsychotic, Inhibits Glioblastoma Invasion by Binding to Calmodulin and Disinhibiting Calcium Release Channel IP3R." *Mol Cancer Ther* 16(1): 217-227.
- Karlstad, J., Sun, Y. und Singh, B. B.** (2012). "Ca(2+) signaling: an outlook on the characterization of Ca(2+) channels and their importance in cellular functions." *Adv Exp Med Biol* 740: 143-157.
- Kasri, N. N., Kocks, S. L., Verbert, L., Hebert, S. S., Callewaert, G., Parys, J. B., Missiaen, L. und De Smedt, H.** (2006). "Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is responsible for a decreased endoplasmic-reticulum Ca²⁺ content in presenilin double knock-out cells." *Cell Calcium* 40(1): 41-51.
- Kassenbrock, C. K. und Kelly, R. B.** (1989). "Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides." *EMBO J* 8(5): 1461-1467.
- Kaufman, R. J. und Malhotra, J. D.** (2014). "Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics." *Biochim Biophys Acta* 1843(10): 2233-2239.

- Kaufman, R. J.** (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." *Genes Dev* 13(10): 1211-1233.
- Kaur, G. und Dufour, J. M.** (2012). "Cell lines: Valuable tools or useless artifacts." *Spermatogenesis* 2(1): 1-5.
- Kawamoto, E. M., Vivar, C. und Camandola, S.** (2012). "Physiology and pathology of calcium signaling in the brain." *Front Pharmacol* 3: 61.
- Kessler, F., Falchetto, R., Heim, R., Meili, R., Vorherr, T., Strehler, E. E. und Carafoli, E.** (1992). "Study of calmodulin binding to the alternatively spliced C-terminal domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump." *Biochemistry* 31(47): 11785-11792.
- Khandelwal, N., Chander, Y., Rawat, K. D., Riyesh, T., Nishanth, C., Sharma, S., Jindal, N., Tripathi, B. N., Barua, S. und Kumar, N.** (2017). "Emetine inhibits replication of RNA and DNA viruses without generating drug-resistant virus variants." *Antiviral Res* 144: 196-204.
- Khanna, R., Myers, M. P., Laine, M. und Papazian, D. M.** (2001). "Glycosylation increases potassium channel stability and surface expression in mammalian cells." *J Biol Chem* 276(36): 34028-34034.
- Kijima, Y., Ogunbunmi, E. und Fleischer, S.** (1991). "Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 266(34): 22912-22918.
- 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. und Chae, H. J.** (2008). "Bax Inhibitor-1 Is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 283(23): 15946-15955.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. und Murakami, S.** (2006). "Role of the unfolded protein response in cell death." *Apoptosis* 11(1): 5-13.
- Kim, T. K. und Eberwine, J. H.** (2010). "Mammalian cell transfection: the present and the future." *Anal Bioanal Chem* 397(8): 3173-3178.
- Kirchberger, M. A., Tada, M. und Katz, A. M.** (1974). "Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 249(19): 6166-6173.
- Kircher, S., Merino-Wong, M., Niemeyer, B. A. und Alansary, D.** (2018). "Profiling calcium signals of in vitro polarized human effector CD4(+) T cells." *Biochim Biophys Acta* 1865(6): 932-943.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. und Clapham, D. E.** (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." *Nature* 427(6972): 360-364.
- Kirischuk, S., Kettenmann, H. und Verkhratsky, A.** (1997). "Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates kainate-triggered Ca²⁺ signaling in Bergmann glial cells in situ." *FASEB J* 11(7): 566-572.
- Kirk, S. J., Cliff, J. M., Thomas, J. A. und Ward, T. H.** (2010). "Biogenesis of secretory organelles during B cell differentiation." *J Leukoc Biol* 87(2): 245-255.
- Kiviluoto, S., Luyten, T., Schneider, L., Lisak, D., Rojas-Rivera, D., Welkenhuyzen, K., Missaen, L., De Smedt, H., Parys, J. B., Hetz, C., Methner, A. und Bultynck, G.** (2013). "Bax Inhibitor-1-mediated Ca²⁺ leak is decreased by cytosolic acidosis." *Cell Calcium* 54(3): 186-192.

- Kiviluoto, S., Schneider, L., Luyten, T., Vervliet, T., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J. B., Methner, A. und Bultynck, G.** (2012). "Bax inhibitor-1 is a novel IP(3) receptor-interacting and -sensitizing protein." *Cell Death Dis* 3: e367.
- 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. und Haferkamp, I.** (2018). "AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum." *Nat Commun* 9(1): 3489.
- Kline, M. P., Rajkumar, S. V., Timm, M. M., Kimlinger, T. K., Haug, J. L., Lust, J. A., Greipp, P. R. und Kumar, S.** (2007). "ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells." *Leukemia* 21(7): 1549-1560.
- Knittler, M. R., Dirks, S. und 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(5): 1764-1768.
- Knoll, M. und Ruska, E.** (1932). "Das Elektronenmikroskop." *Zeitschrift für Physik*. Band 78, S. 318-339.
- Knyazev, D. G., Lents, A., Krause, E., Ollinger, N., Siligan, C., Papinski, D., Winter, L., Horner, A. und Pohl, P.** (2013). "The bacterial translocon SecYEG opens upon ribosome binding." *J Biol Chem* 288(25): 17941-17946.
- Koch, G. L.** (1990). "The endoplasmic reticulum and calcium storage." *Bioessays* 12(11): 527-531.
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Flierl, A., Sweeney, K. M., Angelin, A., MacGregor, G. R. und Wallace, D. C.** (2016). "Deficiency in the mouse mitochondrial adenine nucleotide translocator isoform 2 gene is associated with cardiac noncompaction." *Biochim Biophys Acta* 1857(8): 1203-1212.
- Kondratyev, M., Avezov, E., Shenkman, M., Groisman, B. und Lederkremer, G. Z.** (2007). "PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress." *Exp Cell Res* 313(16): 3395-3407.
- Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J. und Chen, S. R.** (2008). "Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor." *Biochem J* 414(3): 441-452.
- Kono, M., Takagi, Y., Kawauchi, S., Wada, A., Morikawa, T. und Funakoshi, K.** (2013). "Non-activated T and B lymphocytes become morphologically distinguishable after detergent treatment." *Cytometry A* 83(4): 396-402.
- Körbel, C., Linxweiler, M., Bochen, F., Wemmert, S., Schick, B., Meyer, M., Maurer, H., Menger, M. D., Zimmermann, R. und Greiner, M.** (2018). "Treatment of SEC62 over-expressing tumors by Thapsigargin and Trifluoperazine." *Biomol Concepts* 9(1): 53-63.
- Kornberg, M. D., Bhargava, P., Kim, P. M., Putluri, V., Snowman, A. M., Putluri, N., Calabresi, P. A. und Snyder, S. H.** (2018). "Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity." *Science* 360(6387): 449-453.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S. und Walter, P.** (2009). "An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen." *Science* 325(5939): 477-481.

- Kosk-Kosicka, D. und Bzdega, T.** (1988). "Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin." *J Biol Chem* 263(34): 18184-18189.
- Kourkoutis, L. F., Plitzko, J. M. und Baumeister W.** (2012). "Electron Microscopy of Biological Materials at the Nanometer Scale." *Annu Rev Mater Res* 42: 33-58.
- Kouroukis, T. C., Baldassarre, F. G., Haynes, A. E., Imrie, K., Reece, D. E. und Cheung, M. C.** (2014). "Bortezomib in multiple myeloma: systematic review and clinical considerations." *Curr Oncol* 21(4): e573-603.
- Kreideweiss, S., Ahlers, C., Nordheim, A. und Ruhlmann, A.** (1999). "Ca²⁺-induced p38/SAPK signalling inhibited by the immunosuppressant cyclosporin A in human peripheral blood mononuclear cells." *Eur J Biochem* 265(3): 1075-1084.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. und Brenner, C.** (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol Rev* 87(1): 99-163.
- Krols, M., Bultynck, G. und Janssens, S.** (2016). "ER-Mitochondria contact sites: A new regulator of cellular calcium flux comes into play." *J Cell Biol* 214(4): 367-370.
- Krukenberg, K. A., Bottcher, U. M., Southworth, D. R. und Agard, D. A.** (2009). "Grp94, the endoplasmic reticulum Hsp90, has a similar solution conformation to cytosolic Hsp90 in the absence of nucleotide." *Protein Sci* 18(9): 1815-1827.
- Kruman, II und Mattson, M. P.** (1999). "Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis." *J Neurochem* 72(2): 529-540.
- Kühlbrandt, W.** (2015). "Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes." *BMC Biol* 13: 89.
- Kuhn, D. J., Berkova, Z., Jones, R. J., Woessner, R., Bjorklund, C. C., Ma, W., Davis, R. E., Lin, P., Wang, H., Madden, T. L., Wei, C., Baladandayuthapani, V., Wang, M., Thomas, S. K., Shah, J. J., Weber, D. M. und Orlowski, R. Z.** (2012). "Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma." *Blood* 120(16): 3260-3270.
- Kuo, I. Y. und Ehrlich, B. E.** (2015). "Signaling in muscle contraction." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(2): a006023.
- Kurisu, J., Honma, A., Miyajima, H., Kondo, S., Okumura, M. und Imaizumi, K.** (2003). "MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress." *Genes Cells* 8(2): 189-202.
- Kurosaki, T.** (1997). "Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling." *Curr Opin Immunol* 9(3): 309-318.
- Kurtoglu, M., Philips, K., Liu, H., Boise, L. H. und Lampidis, T. J.** (2010). "High endoplasmic reticulum activity renders multiple myeloma cells hypersensitive to mitochondrial inhibitors." *Cancer Chemother Pharmacol* 66(1): 129-140.
- Kuwahara, K., Kawai, T., Mitsuyoshi, S., Matsuo, Y., Kikuchi, H., Imajoh-Ohmi, S., Hashimoto, E., Inui, S., Cooper, M. D. und Sakaguchi, N.** (1996). "Cross-linking of B cell antigen receptor-related structure of pre-B cell lines induces tyrosine phosphorylation of p85 and p110 subunits and activation of phosphatidylinositol 3-kinase." *Int Immunol* 8(8): 1273-1285.
- Laboissiere, M. C., Sturley, S. L. und Raines, R. T.** (1995). "The essential function of protein-disulfide isomerase is to unscramble non-native disulfide bonds." *J Biol Chem* 270(47): 28006-28009.

- Lacabaratz-Porret, C., Launay, S., Corvazier, E., Bredoux, R., Papp, B. und Enouf, J.** (2000). "Biogenesis of endoplasmic reticulum proteins involved in Ca²⁺ signalling during megakaryocytic differentiation: an in vitro study." *Biochem J* 350 Pt 3: 723-734.
- Lacabaratz-Porret, C., Corvazier, E., Kovacs, T., Bobe, R., Bredoux, R., Launay, S., Papp, B. und Enouf, J.** (1998). "Platelet sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase isoform 3b and Rap 1b: interrelation and regulation in physiopathology." *Biochem J* 332 (Pt 1): 173-181.
- Lackner, L. L.** (2014). "Shaping the dynamic mitochondrial network." *BMC Biol* 12: 35.
- Ladiges, W. C., Knoblauch, S. E., Morton, J. F., Korth, M. J., Sopher, B. L., Baskin, C. R., MacAuley, A., Goodman, A. G., LeBoeuf, R. C. und 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(4): 1074-1081.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakkaraju, A. K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J. L., Taunton, J. und Strub, K.** (2012). "Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation." *Mol Biol Cell* 23(14): 2712-2722.
- Lam, A. K. und Galione, A.** (2013). "The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling." *Biochim Biophys Acta* 1833(11): 2542-2559.
- Lam, W. Y. und Bhattacharya, D.** (2018). "Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress." *Trends Immunol* 39(1): 19-27.
- Lam, W. Y., Becker, A. M., Kennerly, K. M., Wong, R., Curtis, J. D., Llufrío, E. M., McCommis, K. S., Fahrman, J., Pizzato, H. A., Nunley, R. M., Lee, J., Wolfgang, M. J., Patti, G. J., Finck, B. N., Pearce, E. L. und Bhattacharya, D.** (2016). "Mitochondrial Pyruvate Import Promotes Long-Term Survival of Antibody-Secreting Plasma Cells." *Immunity* 45(1): 60-73.
- LaMantia, M. L. und Lennarz, W. J.** (1993). "The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity." *Cell* 74(5): 899-908.
- Landolfi, B., Curci, S., Debellis, L., Pozzan, T. und Hofer, A. M.** (1998). "Ca²⁺ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured In situ in intact cells." *J Cell Biol* 142(5): 1235-1243.
- Landowski, T. H., Megli, C. J., Nullmeyer, K. D., Lynch, R. M. und Dorr, R. T.** (2005). "Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines." *Cancer Res* 65(9): 3828-3836.
- Landry, J. J., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stutz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W. und Steinmetz, L. M.** (2013). "The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line." *G3 (Bethesda)* 3(8): 1213-1224.
- Lang, S., Pfeffer, S., Lee, P. H., Cavalié, A., Helms, V., Forster, F. und Zimmermann, R.** (2017). "An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases." *Front Physiol* 8: 887.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S. V., Schorr, S., Schirra, C., Schäuble, N., Jalal, C., Greiner, M., Haßdenteufel, S., Tatzelt, J., Kreutzer, B., Edelmann, L., Krause, E., Rettig, J., Somlo, S., Zimmermann, R. und 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(Pt 8): 1958-1969.

Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalié, A. und Zimmermann, R. (2011). "Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels." *Channels (Austin)* 5(3): 228-235.

Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. und Hartl, F. U. (1992). "Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding." *Nature* 356(6371): 683-689.

Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A. und Robinson, D. G. (2012). "ERES (ER exit sites) and the "secretory unit concept"." *J Microsc* 247(1): 48-59.

Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D. und Hamilton, S. L. (2010). "Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(11): a003996.

Lanzavecchia, A. (1985). "Antigen-specific interaction between T and B cells." *Nature* 314(6011): 537-539.

Lau, K., Chan, M. M. und Van Petegem, F. (2014). "Lobe-specific calmodulin binding to different ryanodine receptor isoforms." *Biochemistry* 53(5): 932-946.

Launay, P., Cheng, H., Srivatsan, S., Penner, R., Fleig, A. und Kinet, J. P. (2004). "TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation." *Science* 306(5700): 1374-1377.

Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R. und Kinet, J. P. (2002). "TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization." *Cell* 109(3): 397-407.

Launay, S., Gianni, M., Kovacs, T., Bredoux, R., Bruel, A., Gelebart, P., Zasadowski, F., Chomienne, C., Enouf, J. und Papp, B. (1999). "Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation." *Blood* 93(12): 4395-4405.

Laver, D. R., O'Neill, E. R. und Lamb, G. D. (2004). "Luminal Ca²⁺-regulated Mg²⁺ inhibition of skeletal RyRs reconstituted as isolated channels or coupled clusters." *J Gen Physiol* 124(6): 741-758.

Lavik, A. R., Zhong, F., Chang, M. J., Greenberg, E., Choudhary, Y., Smith, M. R., McColl, K. S., Pink, J., Reu, F. J., Matsuyama, S. und Distelhorst, C. W. (2015). "A synthetic peptide targeting the BH4 domain of Bcl-2 induces apoptosis in multiple myeloma and follicular lymphoma cells alone or in combination with agents targeting the BH3-binding pocket of Bcl-2." *Oncotarget* 6(29): 27388-27402.

Le Deist, F., Hivroz, C., Partiseti, M., Thomas, C., Buc, H. A., Oleastro, M., Belohradsky, B., Choquet, D. und Fischer, A. (1995). "A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx." *Blood* 85(4): 1053-1062.

Le Gall, S., Neuhof, A. und Rapoport, T. (2004). "The endoplasmic reticulum membrane is permeable to small molecules." *Mol Biol Cell* 15(2): 447-455.

Lebeche, D., Lucero, H. A. und Kaminer, B. (1994). "Calcium binding properties of rabbit liver protein disulfide isomerase." *Biochem Biophys Res Commun* 202(1): 556-561.

Lee, A. S. (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." *Methods* 35(4): 373-381.

- Lee, A. S.** (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." *Trends Biochem Sci* 26(8): 504-510.
- Lee, J., Schriener, S. E. und Wallace, D. C.** (2009a). "Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults." *Biochim Biophys Acta* 1787(5): 364-370.
- Lee, K. P., Yuan, J. P., Zeng, W., So, I., Worley, P. F. und Muallem, S.** (2009b). "Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14687-14692.
- Leitman, J., Shenkman, M., Gofman, Y., Shtern, N. O., Ben-Tal, N., Hendershot, L. M. und Lederkremer, G. Z.** (2014). "Herp coordinates compartmentalization and recruitment of HRD1 and misfolded proteins for ERAD." *Mol Biol Cell* 25(7): 1050-1060.
- Leitman, J., Ulrich Hartl, F. und Lederkremer, G. Z.** (2013). "Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress." *Nat Commun* 4: 2753.
- Lemarie, A. und Grimm, S.** (2011). "Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer?" *Oncogene* 30(38): 3985-4003.
- Lemasters, J. J., Theruvath, T. P., Zhong, Z. und Nieminen, A. L.** (2009). "Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death." *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1395-1401.
- Lemus, L. und Goder, V.** (2014). "Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin." *Cells* 3(3): 824-847.
- Lerner, A. G., Upton, J. P., Praveen, P. V., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S. A. und Papa, F. R.** (2012). "IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress." *Cell Metab* 16(2): 250-264.
- Lervik, A., Bresme, F., Kjelstrup, S. und Rubi, J. M.** (2012). "On the thermodynamic efficiency of Ca(2+)-ATPase molecular machines." *Biophys J* 103(6): 1218-1226.
- Leunissen, E. H., Nair, A. V., Bull, C., Lefeber, D. J., van Delft, F. L., Bindels, R. J. und Hoenderop, J. G.** (2013). "The epithelial calcium channel TRPV5 is regulated differentially by klotho and sialidase." *J Biol Chem* 288(41): 29238-29246.
- Lewis, A., Hayashi, T., Su, T. P. und Betenbaugh, M. J.** (2014). "Bcl-2 family in inter-organelle modulation of calcium signaling; roles in bioenergetics and cell survival." *J Bioenerg Biomembr* 46(1): 1-15.
- Lewis, R. S.** (2001). "Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes." *Annu Rev Immunol* 19: 497-521.
- Lewis, R. S. und Cahalan, M. D.** (1989). "Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells." *Cell Regul* 1(1): 99-112.
- Lewy, T. G., Grabowski, J. M. und Bloom, M. E.** (2017). "BiP: Master Regulator of the Unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology." *Yale J Biol Med* 90(2): 291-300.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D. R. und Lee, A. S.** (2008). "The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells." *Cell Death Differ* 15(9): 1460-1471.

- Liao, J., Li, H., Zeng, W., Sauer, D. B., Belmares, R. und Jiang, Y.** (2012). "Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger." *Science* 335(6069): 686-690.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M.** (1991). "Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2874-2878.
- Liberti, M. V., Dai, Z., Wardell, S. E., Baccile, J. A., Liu, X., Gao, X., Baldi, R., Mehrmohamadi, M., Johnson, M. O., Madhukar, N. S., Shestov, A. A., Chio, I. I. C., Elemento, O., Rathmell, J. C., Schroeder, F. C., McDonnell, D. P. und Locasale, J. W.** (2017). "A Predictive Model for Selective Targeting of the Warburg Effect through GAPDH Inhibition with a Natural Product." *Cell Metab* 26(4): 648-659 e648.
- Lièvreumont, J. P., Rizzuto, R., Hendershot, L. und 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(49): 30873-30879.
- Lin, K. I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C. und Calame, K.** (2002). "Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells." *Mol Cell Biol* 22(13): 4771-4780.
- Linxweiler, M., Schick, B. und Zimmermann, R.** (2017). "Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine." *Signal Transduct Target Ther* 2: 17002.
- Linxweiler, M., Bochen, F., Schick, B., Wemmert, S., Al Kadah, B., Greiner, M., Hasenfus, A., Bohle, R. M., Juhasz-Boss, I., Solomayer, E. F. und Takacs, Z. F.** (2016). "Identification of SEC62 as a potential marker for 3q amplification and cellular migration in dysplastic cervical lesions." *BMC Cancer* 16(1): 676.
- Linxweiler, M., Schorr, S., Schäuble, N., Jung, M., Linxweiler, J., Langer, F., Schafers, H. J., Cavalié, A., Zimmermann, R. und 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.
- Linxweiler, M., Linxweiler, J., Barth, M., Benedix, J., Jung, V., Kim, Y. J., Bohle, R. M., Zimmermann, R. und Greiner, M.** (2012). "Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer." *Am J Pathol* 180(2): 473-483.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T. und Meyer, T.** (2007). "Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22): 9301-9306.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. und Meyer, T.** (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." *Curr Biol* 15(13): 1235-1241.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A. und Penner, R.** (2007). "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties." *Curr Biol* 17(9): 794-800.
- 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. und Methner, A.** (2016). "BAX inhibitor-1 is a Ca(2+) channel critically important for immune cell function and survival." *Cell Death Differ* 23(2): 358-368.

- Liu, B. und Li, Z.** (2008). "Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin." *Blood* 112(4): 1223-1230.
- Liu, X. und Hajnóczky, G.** (2009). "Ca²⁺-dependent regulation of mitochondrial dynamics by the Miro-Milton complex." *Int J Biochem Cell Biol* 41(10): 1972-1976.
- Liu, Y., Schirra, C., Edelmann, L., Matti, U., Rhee, J., Hof, D., Bruns, D., Brose, N., Rieger, H., Stevens, D. R. und Rettig, J.** (2010). "Two distinct secretory vesicle-priming steps in adrenal chromaffin cells." *J Cell Biol* 190(6): 1067-1077.
- Lloyd, D. J., Wheeler, M. C. und Gekakis, N.** (2010). "A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice." *Diabetes* 59(2): 460-470.
- Lomax, R. B., Camello, C., Van Coppenolle, F., Petersen, O. H. und 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(29): 26479-26485.
- Long, Y. C. und Zierath, J. R.** (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." *J Clin Invest* 116(7): 1776-1783.
- Lopatniuk, P. und Witkowski, J. M.** (2011). "Conventional calpains and programmed cell death." *Acta Biochim Pol* 58(3): 287-296.
- 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., University of Washington Center for Mendelian, Genomics und 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(6): 1602-1605.
- Lu, P. D., Harding, H. P. und Ron, D.** (2004). "Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response." *J Cell Biol* 167(1): 27-33.
- Lu, Z., Zhou, L., Killela, P., Rasheed, A. B., Di, C., Poe, W. E., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Nicchitta, C. und Yan, H.** (2009). "Glioblastoma proto-oncogene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress." *Cancer Res* 69(23): 9105-9111.
- Lucero, H. A., Lebeche, D. und Kaminer, B.** (1998). "ERcalcistorin/protein-disulfide isomerase acts as a calcium storage protein in the endoplasmic reticulum of a living cell. Comparison with calreticulin and calsequestrin." *J Biol Chem* 273(16): 9857-9863.
- Luciani, S., Martini, N. und Santi, R.** (1971). "Effects of carboxyatractyloside a structural analogue of atractyloside on mitochondrial oxidative phosphorylation." *Life Sci II* 10(17): 961-968.
- Ludtke, S. J., Tran, T. P., Ngo, Q. T., Moiseenkova-Bell, V. Y., Chiu, W. und Serysheva, II** (2011). "Flexible architecture of IP3R1 by Cryo-EM." *Structure* 19(8): 1192-1199.
- Luedtke, D. A., Niu, X., Pan, Y., Zhao, J., Liu, S., Edwards, H., Chen, K., Lin, H., Taub, J. W. und Ge, Y.** (2017). "Inhibition of Mcl-1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells." *Signal Transduct Target Ther* 2: 17012.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M. und Lewis, R. S.** (2008). "Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation." *Nature* 454(7203): 538-542.

- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J. und Lewis, R. S.** (2006). "The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions." *J Cell Biol* 174(6): 815-825.
- Lunt, S. Y. und Vander Heiden, M. G.** (2011). "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 441-464.
- Luo, D., Broad, L. M., Bird, G. S. und Putney, J. W., Jr.** (2001). "Signaling pathways underlying muscarinic receptor-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in HEK293 cells." *J Biol Chem* 276(8): 5613-5621.
- Luo, S., Mao, C., Lee, B. und Lee, A. S.** (2006). "GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development." *Mol Cell Biol* 26(15): 5688-5697.
- Lytton, J., Westlin, M. und Hanley, M. R.** (1991). "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." *J Biol Chem* 266(26): 17067-17071.
- Lyubchenko, T.** (2010). "Ca(2)+ signaling in B cells." *ScientificWorldJournal* 10: 2254-2264.
- Lyubchenko, T., Nielsen, J. P., Miller, S. M., Liubchenko, G. A. und Holers, V. M.** (2009). "Role of initial protein phosphorylation events and localized release-activated calcium influx in B cell antigen receptor signaling." *J Leukoc Biol* 85(2): 298-309.
- Ma, Y., Shimizu, Y., Mann, M. J., Jin, Y. und Hendershot, L. M.** (2010). "Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response." *Cell Stress Chaperones* 15(3): 281-293.
- Macian, F.** (2005). "NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function." *Nat Rev Immunol* 5(6): 472-484.
- MacLennan, I. C., Toellner, K. M., Cunningham, A. F., Serre, K., Sze, D. M., Zuniga, E., Cook, M. C. und Vinuesa, C. G.** (2003). "Extrafollicular antibody responses." *Immunol Rev* 194: 8-18.
- MacLeod, R. A., Dirks, W. G., Matsuo, Y., Kaufmann, M., Milch, H. und Drexler, H. G.** (1999). "Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source." *Int J Cancer* 83(4): 555-563.
- Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N. und Ried, T.** (1999). "Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping." *Cancer Res* 59(1): 141-150.
- Madl, J., Weghuber, J., Fritsch, R., Derler, I., Fahrner, M., Frischauf, I., Lackner, B., Romanin, C. und Schutz, G. J.** (2010). "Resting state Orai1 diffuses as homotetramer in the plasma membrane of live mammalian cells." *J Biol Chem* 285(52): 41135-41142.
- Mahmood, T. und Yang, P. C.** (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." *N Am J Med Sci* 4(9): 429-434.
- Mak, D. O., McBride, S. und Foskett, J. K.** (2001). "Regulation by Ca^{2+} and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) of single recombinant type 3 InsP3 receptor channels. Ca^{2+} activation uniquely distinguishes types 1 and 3 insp3 receptors." *J Gen Physiol* 117(5): 435-446.
- Mak, D. O., McBride, S. und Foskett, J. K.** (1998). "Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca^{2+} channel by ligand tuning of Ca^{2+} inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15821-15825.

- Maldonado, E. N. und Lemasters, J. J.** (2014). "ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect." *Mitochondrion* 19 Pt A: 78-84.
- Malek, T. R.** (2008). "The biology of interleukin-2." *Annu Rev Immunol* 26: 453-479.
- Malli, R., Frieden, M., Osibow, K., Zoratti, C., Mayer, M., Demaurex, N. und Graier, W. F.** (2003). "Sustained Ca²⁺ transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial Ca²⁺ buffering, store-operated Ca²⁺ entry, and Ca²⁺ store refilling." *J Biol Chem* 278(45): 44769-44779.
- Mambetsariev, N., Lin, W. W., Wallis, A. M., Stunz, L. L. und Bishop, G. A.** (2016). "TRAF3 deficiency promotes metabolic reprogramming in B cells." *Sci Rep* 6: 35349.
- Mandon, E. C., Trueman, S. F. und Gilmore, R.** (2013). "Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(2).
- Manji, S. S., Parker, N. J., Williams, R. T., van Stekelenburg, L., Pearson, R. B., Dziadek, M. und Smith, P. J.** (2000). "STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface." *Biochim Biophys Acta* 1481(1): 147-155.
- Mannella, C. A. und Bonner, W. D., Jr.** (1975). "Biochemical characteristics of the outer membranes of plant mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 413(2): 213-225.
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P. und Ron, D.** (2004). "CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum." *Genes Dev* 18(24): 3066-3077.
- Marcinowski, M., Holler, M., Feige, M. J., Baerend, D., Lamb, D. C. und Buchner, J.** (2011). "Substrate discrimination of the chaperone BiP by autonomous and cochaperone-regulated conformational transitions." *Nat Struct Mol Biol* 18(2): 150-158.
- Markus, M. und Benezra, R.** (1999). "Two isoforms of protein disulfide isomerase alter the dimerization status of E2A proteins by a redox mechanism." *J Biol Chem* 274(2): 1040-1049.
- Marshall, C. B., Nishikawa, T., Osawa, M., Stathopoulos, P. B. und Ikura, M.** (2015). "Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum." *Biochem Biophys Res Commun* 460(1): 5-21.
- Martin, W. F., Garg, S. und Zimorski, V.** (2015). "Endosymbiotic theories for eukaryote origin." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1678): 20140330.
- Martinvalet, D.** (2018). "The role of the mitochondria and the endoplasmic reticulum contact sites in the development of the immune responses." *Cell Death Dis* 9(3): 336.
- Martonosi, A. N. und Pikula, S.** (2003). "The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." *Acta Biochim Pol* 50(2): 337-365.
- Marzec, M., Eletto, D. und Argon, Y.** (2012). "GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum." *Biochim Biophys Acta* 1823(3): 774-787.
- Masciarelli, S. und Sitia, R.** (2008). "Building and operating an antibody factory: redox control during B to plasma cell terminal differentiation." *Biochim Biophys Acta* 1783(4): 578-588.
- Matlib, M. A., Zhou, Z., Knight, S., Ahmed, S., Choi, K. M., Krause-Bauer, J., Phillips, R., Altschuld, R., Katsube, Y., Sperelakis, N. und Bers, D. M.** (1998). "Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca²⁺ uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes." *J Biol Chem* 273(17): 10223-10231.

- Matsuda, F., Fujii, J. und Yoshida, S.** (2009). "Autophagy induced by 2-deoxy-D-glucose suppresses intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in A/J mouse macrophages." *Autophagy* 5(4): 484-493.
- Matsumoto, H., Miyazaki, S., Matsuyama, S., Takeda, M., Kawano, M., Nakagawa, H., Nishimura, K. und Matsuo, S.** (2013). "Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression." *Biol Open* 2(10): 1084-1090.
- Matsumoto, M., Fujii, Y., Baba, A., Hikida, M., Kurosaki, T. und Baba, Y.** (2011). "The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production." *Immunity* 34(5): 703-714.
- Matsuoka, Y., Moore, G. E., Yagi, Y. und Pressman, D.** (1967). "Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma." *Proc Soc Exp Biol Med* 125(4): 1246-1250.
- Matter, A., Lisowska-Bernstein, B., Ryser, J. E., Lamelin, J. P. und Vassalli, P.** (1972). "Mouse thymus-independent and thymus-derived lymphoid cells. II. Ultrastructural studies." *J Exp Med* 136(5): 1008-1030.
- Matthews, G., Neher, E. und Penner, R.** (1989). "Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells." *J Physiol* 418: 105-130.
- Maul-Pavicic, A., Chiang, S. C., Rensing-Ehl, A., Jessen, B., Fauriat, C., Wood, S. M., Sjoqvist, S., Hufnagel, M., Schulze, I., Bass, T., Schamel, W. W., Fuchs, S., Pircher, H., McCarl, C. A., Mikoshiba, K., Schwarz, K., Feske, S., Bryceson, Y. T. und Ehl, S.** (2011). "ORAI1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(8): 3324-3329.
- Mayer, M. P. und Bukau, B.** (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." *Cell Mol Life Sci* 62(6): 670-684.
- Mazumder, S., Choudhary, G. S., Al-Harbi, S. und Almasan, A.** (2012). "Mcl-1 Phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells." *Cancer Res* 72(12): 3069-3079.
- Mazure, N. M.** (2017). "VDAC in cancer." *Biochim Biophys Acta* 1858(8): 665-673.
- McBryer, S. K., Cheng, J. C., Singhal, S., Krett, N. L., Rosen, S. T. und Shanmugam, M.** (2012). "Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy." *Blood* 119(20): 4686-4697.
- McCarl, C. A., Khalil, S., Ma, J., Oh-hora, M., Yamashita, M., Roether, J., Kawasaki, T., Jairaman, A., Sasaki, Y., Prakriya, M. und Feske, S.** (2010). "Store-operated Ca²⁺ entry through ORAI1 is critical for T cell-mediated autoimmunity and allograft rejection." *J Immunol* 185(10): 5845-5858.
- McCarl, C. A., Picard, C., Khalil, S., Kawasaki, T., Rother, J., Papolos, A., Kutok, J., Hivroz, C., Ledest, F., Plogmann, K., Ehl, S., Notheis, G., Albert, M. H., Belohradsky, B. H., Kirschner, J., Rao, A., Fischer, A. und Feske, S.** (2009). "ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca²⁺ entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia." *J Allergy Clin Immunol* 124(6): 1311-1318 e1317.
- McKibbin, C., Mares, A., Piacenti, M., Williams, H., Roboti, P., Puumalainen, M., Callan, A. C., Lesiak-Mieczkowska, K., Linder, S., Harant, H., High, S., Flitsch, S. L., Whitehead, R. C. und Swanton, E.** (2012). "Inhibition of protein translocation at the endoplasmic reticulum promotes activation of the unfolded protein response." *Biochem J* 442(3): 639-648.

- McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M. und Prakriya, M.** (2013). "The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels." *J Physiol* 591(11): 2833-2850.
- McPherson, P. S., Kim, Y. K., Valdivia, H., Knudson, C. M., Takekura, H., Franzini-Armstrong, C., Coronado, R. und Campbell, K. P.** (1991). "The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel." *Neuron* 7(1): 17-25.
- Means, S., Smith, A. J., Shepherd, J., Shadid, J., Fowler, J., Wojcikiewicz, R. J., Mazel, T., Smith, G. D. und Wilson, B. S.** (2006). "Reaction diffusion modeling of calcium dynamics with realistic ER geometry." *Biophys J* 91(2): 537-557.
- Medvedeva, Y. V., Kim, M. S. und Usachev, Y. M.** (2008). "Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons." *J Neurosci* 28(20): 5295-5311.
- Meissner, G., Rios, E., Tripathy, A. und Pasek, D. A.** (1997). "Regulation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺ and monovalent cations and anions." *J Biol Chem* 272(3): 1628-1638.
- Meissner, G.** (1994). "Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors." *Annu Rev Physiol* 56: 485-508.
- Meissner, G., Darling, E. und Eveleth, J.** (1986). "Kinetics of rapid Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and adenine nucleotides." *Biochemistry* 25(1): 236-244.
- Meldolesi, J. und Pozzan, T.** (1998). "The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen." *Trends Biochem Sci* 23(1): 10-14.
- Melnick, J., Dul, J. L. und Argon, Y.** (1994). "Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum." *Nature* 370(6488): 373-375.
- Melnyk, A., Rieger, H. und Zimmermann, R.** (2015). "Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum." *Subcell Biochem* 78: 179-200.
- Ménétret, J. F., Hegde, R. S., Aguiar, M., Gygi, S. P., Park, E., Rapoport, T. A. und Akey, C. W.** (2008). "Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome." *Structure* 16(7): 1126-1137.
- Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S. und Putney, J. W., Jr.** (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." *J Biol Chem* 281(34): 24979-24990.
- Meves, H.** (2008). "Arachidonic acid and ion channels: an update." *Br J Pharmacol* 155(1): 4-16.
- Meyer, H. A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K. U. und Hartmann, E.** (2000). "Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63." *J Biol Chem* 275(19): 14550-14557.
- Mezghrani, A., Fassio, A., Benham, A., Simmen, T., Braakman, I. und Sitia, R.** (2001). "Manipulation of oxidative protein folding and PDI redox state in mammalian cells." *EMBO J* 20(22): 6288-6296.
- Michalak, M., Robert Parker, J. M. und Opas, M.** (2002). "Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." *Cell Calcium* 32(5-6): 269-278.

- Miederer, A. M., Alansary, D., Schwar, G., Lee, P. H., Jung, M., Helms, V. und Niemeyer, B. A. (2015). "A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry." *Nat Commun* 6: 6899.
- Miki, H., Nakamura, S., Oda, A., Amachi, R., Watanabe, K., Hanson, D., Teramachi, J., Hiasa, M., Yagi, H., Sogabe, K., Takahashi, M., Maruhashi, T., Udaka, K., Harada, T., Fujii, S., Nakano, A., Kagawa, K., Ri, M., Iida, S., Ozaki, S., Matsumoto, T. und Abe, M. (2015). "Induction of endoplasmic reticulum stress by bortezomib sensitizes myeloma cells to DR5-mediated cell death." *International Journal of Myeloma* 5(1): 1–7
- Milasta, S., Dillon, C. P., Sturm, O. E., Verbist, K. C., Brewer, T. L., Quarato, G., Brown, S. A., Frase, S., Janke, L. J., Perry, S. S., Thomas, P. G. und Green, D. R. (2016). "Apoptosis-Inducing-Factor-Dependent Mitochondrial Function Is Required for T Cell but Not B Cell Function." *Immunity* 44(1): 88-102.
- Mimura, N., Fulciniti, M., Gorgun, G., Tai, Y. T., Cirstea, D., Santo, L., Hu, Y., Fabre, C., Minami, J., Ohguchi, H., Kiziltepe, T., Ikeda, H., Kawano, Y., French, M., Blumenthal, M., Tam, V., Kertesz, N. L., Malyankar, U. M., Hokenson, M., Pham, T., Zeng, Q., Patterson, J. B., Richardson, P. G., Munshi, N. C. und Anderson, K. C. (2012). "Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma." *Blood* 119(24): 5772-5781.
- Mimura, N., Yuasa, S., Soma, M., Jin, H., Kimura, K., Goto, S., Koseki, H. und Aoe, T. (2008). "Altered quality control in the endoplasmic reticulum causes cortical dysplasia in knock-in mice expressing a mutant BiP." *Mol Cell Biol* 28(1): 293-301.
- Mimura, N., Hamada, H., Kashio, M., Jin, H., Toyama, Y., Kimura, K., Iida, M., Goto, S., Saisho, H., Toshimori, K., Koseki, H. und Aoe, T. (2007). "Aberrant quality control in the endoplasmic reticulum impairs the biosynthesis of pulmonary surfactant in mice expressing mutant BiP." *Cell Death Differ* 14(8): 1475-1485.
- Minagawa, N., Kruglov, E. A., Dranoff, J. A., Robert, M. E., Gores, G. J. und Nathanson, M. H. (2005). "The anti-apoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial Ca²⁺ signals." *J Biol Chem* 280(39): 33637-33644.
- Minn, A. J., Velez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., Fill, M. und Thompson, C. B. (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." *Nature* 385(6614): 353-357.
- Minowada, J., Janossy, G., Greaves, M. F., Tsubota, T., Srivastava, B. I., Morikawa, S. und Tatsumi, E. (1978). "Expression of an antigen associated with acute lymphoblastic leukemia in human leukemia-lymphoma cell lines." *J Natl Cancer Inst* 60(6): 1269-1277.
- Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K. E. und Rapoport, T. A. (1999). "Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex." *J Biol Chem* 274(29): 20110-20115.
- Missiaen, L., De Smedt, H., Droogmans, G. und Casteels, R. (1992). "Ca²⁺ release induced by inositol 1,4,5-trisphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal Ca²⁺ in permeabilized cells." *Nature* 357(6379): 599-602.
- Miyake, J., Ochiai-Yanagi, S., Kasumi, T. und Takagi, T. (1978). "Isolation of a membrane protein from *Rubrum chromatophores* and its abnormal behavior in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis due to a high binding capacity for SDS." *J Biochem* 83(6): 1679-1686.

- Miyata, N., Steffen, J., Johnson, M. E., Fargue, S., Danpure, C. J. und Koehler, C. M.** (2014). "Pharmacologic rescue of an enzyme-trafficking defect in primary hyperoxaluria 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(40): 14406-14411.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. und Tsien, R. Y.** (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin." *Nature* 388(6645): 882-887.
- Mohorko, E., Glockshuber, R. und Aebi, M.** (2011). "Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation." *J Inherit Metab Dis* 34(4): 869-878.
- Molinari, F., Foulquier, F., Tarpey, P. S., Morelle, W., Boissel, S., Teague, J., Edkins, S., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Turner, G., Matthijs, G., Gecz, J., Munnich, A. und Colleaux, L.** (2008). "Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation." *Am J Hum Genet* 82(5): 1150-1157.
- Möller, M., Herzer, K., Wenger, T., Herr, I. und Wink, M.** (2007). "The alkaloid emetine as a promising agent for the induction and enhancement of drug-induced apoptosis in leukemia cells." *Oncol Rep* 18(3): 737-744.
- Mookerjee, S. A., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G. und Brand, M. D.** (2017). "Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements." *J Biol Chem* 292(17): 7189-7207.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H. und Yura, T.** (1998). "Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 273(16): 9912-9920.
- Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E. und Su, T. P.** (2013). "Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival." *PLoS One* 8(10): e76941.
- 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. und Meltzer, S. J.** (2002a). "Instability typing reveals unique mutational spectra in microsatellite-unstable gastric cancers." *Cancer Res* 62(13): 3641-3645.
- Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M. und Kurosaki, T.** (2002b). "Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca(2+) entry and Ca(2+) release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes." *J Exp Med* 195(6): 673-681.
- Mothes, W., Prehn, S. und Rapoport, T. A.** (1994). "Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane." *EMBO J* 13(17): 3973-3982.
- 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. und Romanin, C.** (2008). "Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation." *J Biol Chem* 283(12): 8014-8022.
- Mukhopadhyay, R., Roy, S., Venkatadri, R., Su, Y. P., Ye, W., Barnaeva, E., Mathews Griner, L., Southall, N., Hu, X., Wang, A. Q., Xu, X., Dulcey, A. E., Marugan, J. J., Ferrer, M. und Arav-Boger, R.** (2016). "Efficacy and Mechanism of Action of Low Dose Emetine against Human Cytomegalovirus." *PLoS Pathog* 12(6): e1005717.

- Müller, L., de Escauriaza, M. D., Lajoie, P., Theis, M., Jung, M., Muller, A., Burgard, C., Greiner, M., Snapp, E. L., Dudek, J. und Zimmermann, R.** (2010). "Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans." *Mol Biol Cell* 21(5): 691-703.
- Müller, M. S., Fox, R., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S. und Bak, L. K.** (2014). "Astrocyte glycogenolysis is triggered by store-operated calcium entry and provides metabolic energy for cellular calcium homeostasis." *Glia* 62(4): 526-534.
- Murk, J. L., Posthuma, G., Koster, A. J., Geuze, H. J., Verkleij, A. J., Kleijmeer, M. J. und Humbel, B. M.** (2003). "Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography." *J Microsc* 212(Pt 1): 81-90.
- Murley, A. und Nunnari, J.** (2016). "The Emerging Network of Mitochondria-Organelle Contacts." *Mol Cell* 61(5): 648-653.
- Murley, A., Lackner, L. L., Osman, C., West, M., Voeltz, G. K., Walter, P. und Nunnari, J.** (2013). "ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast." *Elife* 2: e00422.
- Murphy, E., Pan, X., Nguyen, T., Liu, J., Holmstrom, K. M. und Finkel, T.** (2014). "Unresolved questions from the analysis of mice lacking MCU expression." *Biochem Biophys Res Commun* 449(4): 384-385.
- Myasnikov, A. G., Kundhavi Natchiar, S., Nebout, M., Hazemann, I., Imbert, V., Khatter, H., Peyron, J. F. und Klaholz, B. P.** (2016). "Structure-function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics." *Nat Commun* 7: 12856.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S. und Miyawaki, A.** (2001). "Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3197-3202.
- Nagl, W.** (1982). "Elektronenmikroskopische Laborpraxis: Eine Methodensammlung mit Bildbeispielen für Lehre und Forschung in der Medizin und Zellbiologie." Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Parys, J. B., Muller-Esterl, W., Lew, D. P., Krause, K. H., Demaurex, N., Opas, M. und Michalak, M.** (2001). "Functional specialization of calreticulin domains." *J Cell Biol* 154(5): 961-972.
- Nalefski, E. A. und Falke, J. J.** (1996). "The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity." *Protein Sci* 5(12): 2375-2390.
- Nasir, A., Norton, J. D., Baou, M., Zekavati, A., Bijlmakers, M. J., Thompson, S. und Murphy, J. J.** (2012). "ZFP36L1 negatively regulates plasmacytoid differentiation of BCL1 cells by targeting BLIMP1 mRNA." *PLoS One* 7(12): e52187.
- Navarro-Borelly, L., Somasundaram, A., Yamashita, M., Ren, D., Miller, R. J. und Prakriya, M.** (2008). "STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy." *J Physiol* 586(22): 5383-5401.
- Neher, E.** (1998). "Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release." *Neuron* 20(3): 389-399.
- Nelson, O., Supnet, C., Tolia, A., Horre, K., De Strooper, B. und Bezprozvanny, I.** (2011). "Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore." *J Biol Chem* 286(25): 22339-22347.

- Nelson, O., Supnet, C., Liu, H. und 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(3): 781-793.
- Nelson, O., Tu, H., Lei, T., Bentahir, M., de Strooper, B. und Bezprozvanny, I.** (2007). "Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1." *J Clin Invest* 117(5): 1230-1239.
- Nemeth, E. F., Delmar, E. G., Heaton, W. L., Miller, M. A., Lambert, L. D., Conklin, R. L., Gowen, M., Gleason, J. G., Bhatnagar, P. K. und Fox, J.** (2001). "Calcilytic compounds: potent and selective Ca²⁺ receptor antagonists that stimulate secretion of parathyroid hormone." *J Pharmacol Exp Ther* 299(1): 323-331.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P. H.** (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." *EMBO J* 1(7): 841-845.
- Newell, K. J. und Tannock, I. F.** (1989). "Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone." *Cancer Res* 49(16): 4477-4482.
- Neyses, L., Reinlib, L. und Carafoli, E.** (1985). "Phosphorylation of the Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 260(18): 10283-10287.
- Ng, D. T., Brown, J. D. und Walter, P.** (1996). "Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane." *J Cell Biol* 134(2): 269-278.
- Ng, W., Sergeyenko, T., Zeng, N., Brown, J. D. und Romisch, K.** (2007). "Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* 120(Pt 4): 682-691.
- Ngosuwan, J., Wang, N. M., Fung, K. L. und Chirico, W. J.** (2003). "Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 278(9): 7034-7042.
- Nguyen, T. H., Law, D. T. und Williams, D. B.** (1991). "Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4): 1565-1569.
- Nicchitta, C. V. und Blobel, G.** (1993). "Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation." *Cell* 73(5): 989-998.
- Nicholls, D. G. und Chalmers, S.** (2004). "The integration of mitochondrial calcium transport and storage." *J Bioenerg Biomembr* 36(4): 277-281.
- Nicholson, K. M. und Anderson, N. G.** (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cell Signal* 14(5): 381-395.
- Nicoll, D. A., Sawaya, M. R., Kwon, S., Cascio, D., Philipson, K. D. und Abramson, J.** (2006). "The crystal structure of the primary Ca²⁺ sensor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger reveals a novel Ca²⁺ binding motif." *J Biol Chem* 281(31): 21577-21581.
- Nicoll, W. S., Botha, M., McNamara, C., Schlange, M., Pesce, E. R., Boshoff, A., Ludewig, M. H., Zimmermann, R., Cheetham, M. E., Chapple, J. P. und Blatch, G. L.** (2007). "Cytosolic and ER J-domains of mammalian and parasitic origin can functionally interact with DnaK." *Int J Biochem Cell Biol* 39(4): 736-751.
- Niemeyer, B. A.** (2016). "Changing calcium: CRAC channel (STIM and Orai) expression, splicing, and posttranslational modifiers." *Am J Physiol Cell Physiol* 310(9): C701-709.

- Nieminen, A. L., Saylor, A. K., Herman, B. und Lemasters, J. J.** (1994). "ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition." *Am J Physiol* 267(1 Pt 1): C67-74.
- Niggli, V., Sigel, E. und Carafoli, E.** (1982). "The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems." *J Biol Chem* 257(5): 2350-2356.
- Niggli, V., Adunyah, E. S. und Carafoli, E.** (1981a). "Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca²⁺ - ATPase." *J Biol Chem* 256(16): 8588-8592.
- Niggli, V., Adunyah, E. S., Penniston, J. T. und Carafoli, E.** (1981b). "Purified (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids." *J Biol Chem* 256(1): 395-401.
- Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L. und Endo, T.** (2001). "Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation." *J Cell Biol* 153(5): 1061-1070.
- Niwa, F., Sakuragi, S., Kobayashi, A., Takagi, S., Oda, Y., Bannai, H. und Mikoshiba, K.** (2016). "Dissection of local Ca(2+) signals inside cytosol by ER-targeted Ca(2+) indicator." *Biochem Biophys Res Commun* 479(1): 67-73.
- 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. und Lippincott-Schwartz, J.** (2016). "Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER." *Science* 354(6311).
- Noris, P., Biino, G., Pecci, A., Civaschi, E., Savoia, A., Seri, M., Melazzini, F., Loffredo, G., Russo, G., Bozzi, V., Notarangelo, L. D., Gresele, P., Heller, P. G., Pujol-Moix, N., Kunishima, S., Cattaneo, M., Bussel, J., De Candia, E., Cagioni, C., Ramenghi, U., Barozzi, S., Fabris, F. und Balduini, C. L.** (2014). "Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: analysis of 376 patients with all known disorders." *Blood* 124(6): e4-e10.
- Notarangelo, L. D., Fischer, A., Geha, R. S., Casanova, J. L., Chapel, H., Conley, M. E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Hammartrom, L., Nonoyama, S., Ochs, H. D., Puck, J., Roifman, C., Seger, R. und Wedgwood, J.** (2009). "Primary immunodeficiencies: 2009 update." *J Allergy Clin Immunol* 124(6): 1161-1178.
- Nunes, P. und Demaurex, N.** (2010). "The role of calcium signaling in phagocytosis." *J Leukoc Biol* 88(1): 57-68.
- Nutt, L. K., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, D. J. und Swisher, S. G.** (2002). "Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores." *J Biol Chem* 277(11): 9219-9225.
- Nyathi, Y., Wilkinson, B. M. und Pool, M. R.** (2013). "Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum." *Biochim Biophys Acta* 1833(11): 2392-2402.
- Oakes, S. A., Scorrano, L., Opferman, J. T., Bassik, M. C., Nishino, M., Pozzan, T. und Korsmeyer, S. J.** (2005). "Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1): 105-110.
- Obeid, M., Panaretakis, T., Joza, N., Tufi, R., Tesniere, A., van Endert, P., Zitvogel, L. und Kroemer, G.** (2007). "Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis." *Cell Death Differ* 14(10): 1848-1850.

- Obeng, E. A., Carlson, L. M., Gutman, D. M., Harrington, W. J., Jr., Lee, K. P. und Boise, L. H.** (2006). "Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells." *Blood* 107(12): 4907-4916.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S. und Rao, A.** (2008). "Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance." *Nat Immunol* 9(4): 432-443.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W. und Rosenberg, S. H.** (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." *Nature* 435(7042): 677-681.
- Olzmann, J. A., Kopito, R. R. und Christianson, J. C.** (2013). "The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(9).
- Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., Gill, D. L. und Ambudkar, I. S.** (2007a). "Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components." *J Biol Chem* 282(12): 9105-9116.
- Ong, H. L., Liu, X., Sharma, A., Hegde, R. S. und Ambudkar, I. S.** (2007b). "Intracellular Ca(2+) release via the ER translocon activates store-operated calcium entry." *Pflugers Arch* 453(6): 797-808.
- Ong, H. L., Liu, X., Tsaneva-Atanasova, K., Singh, B. B., Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Russell, J. T., Hegde, R. S., Sherman, A. und Ambudkar, I. S.** (2007c). "Relocalization of STIM1 for activation of store-operated Ca(2+) entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum Ca(2+) store." *J Biol Chem* 282(16): 12176-12185.
- Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C. und Korsmeyer, S. J.** (2003). "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." *Nature* 426(6967): 671-676.
- Oritani, K. und Kincade, P. W.** (1996). "Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells." *J Cell Biol* 134(3): 771-782.
- Osowski, C. M., Hara, T., O'Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., Ishigaki, S., Zhu, L. J., Hayashi, E., Hui, S. T., Greiner, D., Kaufman, R. J., Bortell, R. und Urano, F.** (2012). "Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome." *Cell Metab* 16(2): 265-273.
- Ostrovsky, O., Makarewich, C. A., Snapp, E. L. und Argon, Y.** (2009). "An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28): 11600-11605.
- Ott, C. M. und Lingappa, V. R.** (2002). "Integral membrane protein biosynthesis: why topology is hard to predict." *J Cell Sci* 115(Pt 10): 2003-2009.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T. und Nilius, B.** (2006). "Permeation and selectivity of TRP channels." *Annu Rev Physiol* 68: 685-717.

- Oyadomari, S., Yun, C., Fisher, E. A., Kreglinger, N., Kreibich, G., Oyadomari, M., Harding, H. P., Goodman, A. G., Harant, H., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G. und Ron, D.** (2006). "Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload." *Cell* 126(4): 727-739.
- Ozaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P. R. und Leonard, W. J.** (2000). "Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(21): 11439-11444.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C. und Dalbey, R. E.** (2002). "Signal peptidases." *Chem Rev* 102(12): 4549-4580.
- Paillasson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D. H. W., Mueller, S., Miller, T. und Miller, C. C. J.** (2016). "There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases." *Trends Neurosci* 39(3): 146-157.
- Palade, G.** (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." *Science* 189(4200): 347-358.
- Palmer, A. E. und Tsien, R. Y.** (2006). "Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators." *Nat Protoc* 1(3): 1057-1065.
- Palmer, A. E., Jin, C., Reed, J. C. und 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(50): 17404-17409.
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D. und Sekler, I.** (2010). "NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1): 436-441.
- Palty, R., Ohana, E., Hershfinkel, M., Volokita, M., Elgazar, V., Beharier, O., Silverman, W. F., Argaman, M. und Sekler, I.** (2004). "Lithium-calcium exchange is mediated by a distinct potassium-independent sodium-calcium exchanger." *J Biol Chem* 279(24): 25234-25240.
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M. M., Rovira, II, Allen, M., Springer, D. A., Aponte, A. M., Gucek, M., Balaban, R. S., Murphy, E. und Finkel, T.** (2013). "The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter." *Nat Cell Biol* 15(12): 1464-1472.
- Pang, L., Weiss, M. J. und Poncz, M.** (2005). "Megakaryocyte biology and related disorders." *J Clin Invest* 115(12): 3332-3338.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T. A.** (1995). "Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p." *Cell* 81(4): 561-570.
- Papp, B., Brouland, J. P., Arbabian, A., Gelebart, P., Kovacs, T., Bobe, R., Enouf, J., Varin-Blank, N. und Apati, A.** (2012). "Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation." *Biomolecules* 2(1): 165-186.
- Papp, B., Enyedi, A., Kovacs, T., Sarkadi, B., Wuytack, F., Thastrup, O., Gardos, G., Bredoux, R., Levy-Toledano, S. und Enouf, J.** (1991). "Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radioimmunoblotting in platelet membrane vesicles." *J Biol Chem* 266(22): 14593-14596.
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W. und Lechleiter, J. D.** (2008). "Chemical calcium indicators." *Methods* 46(3): 143-151.

- Parekh, A. B. und Putney, J. W., Jr.** (2005). "Store-operated calcium channels." *Physiol Rev* 85(2): 757-810.
- Park, E., Menetret, J. F., Gumbart, J. C., Ludtke, S. J., Li, W., Whynot, A., Rapoport, T. A. und Akey, C. W.** (2014). "Structure of the SecY channel during initiation of protein translocation." *Nature* 506(7486): 102-106.
- Park, E. und Rapoport, T. A.** (2012). "Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes." *Annu Rev Biophys* 41: 21-40.
- Park, E. und Rapoport, T. A.** (2011). "Preserving the membrane barrier for small molecules during bacterial protein translocation." *Nature* 473(7346): 239-242.
- Park, M. und Kim, S. H.** (2011). "Thapsigargin-induced sequential expression of proteins related to autophagy and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells." *Bull Korean Chem* 32(9): 3469
- Parod, R. J. und Putney, J. W., Jr.** (1978). "The role of calcium in the receptor mediated control of potassium permeability in the rat lacrimal gland." *J Physiol* 281: 371-381.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J. L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S. R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F. J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R. D. und Foster, D.** (2000). "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function." *Nature* 408(6808): 57-63.
- Partiseti, M., Le Deist, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H. und Choquet, D.** (1994). "The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency." *J Biol Chem* 269(51): 32327-32335.
- Pathak, T., Agrawal, T., Richhariya, S., Sadaf, S. und Hasan, G.** (2015). "Store-Operated Calcium Entry through Orai Is Required for Transcriptional Maturation of the Flight Circuit in *Drosophila*." *J Neurosci* 35(40): 13784-13799.
- Paton, A. W., Beddoe, T., Thorpe, C. M., Whisstock, J. C., Wilce, M. C., Rossjohn, J., Talbot, U. M. und Paton, J. C.** (2006). "AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP." *Nature* 443(7111): 548-552.
- Paul, W. E. und Ohara, J.** (1987). "B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4." *Annu Rev Immunol* 5: 429-459.
- Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. und Velours, J.** (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." *EMBO J* 21(3): 221-230.
- Paver, J. L., Freedman, R. B. und Parkhouse, R. M.** (1989). "Induction of expression of protein disulphide-isomerase during lymphocyte maturation stimulated by bacterial lipopolysaccharide." *FEBS Lett* 242(2): 357-362.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. und Brandolin, G.** (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." *Nature* 426(6962): 39-44.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. und Kinet, J. P.** (2006). "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." *Nat Cell Biol* 8(7): 771-773.

- Pellegrino, M. W. und Haynes, C. M.** (2015). "Mitophagy and the mitochondrial unfolded protein response in neurodegeneration and bacterial infection." *BMC Biol* 13: 22.
- Pendin, D., McNew, J. A. und Daga, A.** (2011). "Balancing ER dynamics: shaping, bending, severing, and mending membranes." *Curr Opin Cell Biol* 23(4): 435-442.
- Penner, R., Matthews, G. und Neher, E.** (1988). "Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells." *Nature* 334(6182): 499-504.
- Penuela, S., Gehi, R. und Laird, D. W.** (2013). "The biochemistry and function of pannexin channels." *Biochim Biophys Acta* 1828(1): 15-22.
- Peperzak, V., Vikstrom, I., Walker, J., Glaser, S. P., LePage, M., Coquery, C. M., Erickson, L. D., Fairfax, K., Mackay, F., Strasser, A., Nutt, S. L. und Tarlinton, D. M.** (2013). "Mcl-1 is essential for the survival of plasma cells." *Nat Immunol* 14(3): 290-297.
- Peperzak, V., Vikstrom, I. B. und Tarlinton, D. M.** (2012). "Through a glass less darkly: apoptosis and the germinal center response to antigen." *Immunol Rev* 247(1): 93-106.
- Pepperell, J. R., Kommineni, K., Buradagunta, S., Smith, P. J. und Keefe, D. L.** (1999). "Transmembrane regulation of intracellular calcium by a plasma membrane sodium/calcium exchanger in mouse ova." *Biol Reprod* 60(5): 1137-1143.
- Pérez, M. J. und Quintanilla, R. A.** (2017). "Development or disease: duality of the mitochondrial permeability transition pore." *Dev Biol* 426(1): 1-7.
- Periasamy, A. und Day, R. N.** (2005). "Molecular Imaging. FRET Microscopy and Spectroscopy." Oxford University Press, Inc. New York (USA).
- Perocchi, F., Gohil, V. M., Girgis, H. S., Bao, X. R., McCombs, J. E., Palmer, A. E. und Mootha, V. K.** (2010). "MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake." *Nature* 467(7313): 291-296.
- Peters, L. R. und Raghavan, M.** (2011). "Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells." *J Immunol* 187(2): 919-931.
- Petrova, K., Oyadomari, S., Hendershot, L. M. und Ron, D.** (2008). "Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3." *EMBO J* 27(21): 2862-2872.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Schaffer, M., Ng, B. G., Albert, S., Plitzko, J. M., Baumeister, W., Zimmermann, R., Freeze, H. H., Engel, B. D. und Forster, F.** (2017). "Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex." *Nat Commun* 8: 14516.
- Pfeffer, S., Brandt, F., Hrabe, T., Lang, S., Eibauer, M., Zimmermann, R. und Forster, F.** (2012). "Structure and 3D arrangement of endoplasmic reticulum membrane-associated ribosomes." *Structure* 20(9): 1508-1518.
- Phillips, D. C., Xiao, Y., Lam, L. T., Litvinovich, E., Roberts-Rapp, L., Souers, A. J. und Levenson, J. D.** (2015). "Loss in MCL-1 function sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cell lines to the BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199)." *Blood Cancer J* 5: e368.
- Phillips, M. J. und Voeltz, G. K.** (2016). "Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles." *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(2): 69-82.
- Picard, C., McCarl, C. A., Papolos, A., Khalil, S., Luthy, K., Hivroz, C., LeDeist, F., Rieux-Laucat, F., Rechavi, G., Rao, A., Fischer, A. und Feske, S.** (2009). "STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity." *N Engl J Med* 360(19): 1971-1980.

- Pillai, S., Bikle, D. D., Mancianti, M. L., Cline, P. und Hincenbergs, M.** (1990). "Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium." *J Cell Physiol* 143(2): 294-302.
- Pilon, M., Schekman, R. und Romisch, K.** (1997). "Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation." *EMBO J* 16(15): 4540-4548.
- Pinto, M. C., Kihara, A. H., Goulart, V. A., Tonelli, F. M., Gomes, K. N., Ulrich, H. und Resende, R. R.** (2015). "Calcium signaling and cell proliferation." *Cell Signal* 27(11): 2139-2149.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E. und Rizzuto, R.** (2008). "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis." *Oncogene* 27(50): 6407-6418.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T. und 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(5): 857-862.
- Placido, A. I., Oliveira, C. R., Moreira, P. I. und Pereira, C. M.** (2015). "Enhanced amyloidogenic processing of amyloid precursor protein and cell death under prolonged endoplasmic reticulum stress in brain endothelial cells." *Mol Neurobiol* 51(2): 571-590.
- Plattner, H. und Hentschel, J.** (2006). "Sub-second cellular dynamics: time-resolved electron microscopy and functional correlation." *Int Rev Cytol* 255: 133-176.
- Plemper, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. und Wolf, D. H.** (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." *Nature* 388(6645): 891-895.
- Plumb, R., Zhang, Z. R., Appathurai, S. und Mariappan, M.** (2015). "A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR." *Elife* 4.
- Pogoryelov, D., Yildiz, O., Faraldo-Gomez, J. D. und Meier, T.** (2009). "High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase." *Nat Struct Mol Biol* 16(10): 1068-1073.
- Pollock, W. K. und Rink, T. J.** (1986). "Thrombin and ionomycin can raise platelet cytosolic Ca²⁺ to micromolar levels by discharge of internal Ca²⁺ stores: studies using fura-2." *Biochem Biophys Res Commun* 139(1): 308-314.
- Popgeorgiev, N., Jabbour, L. und Gillet, G.** (2018). "Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins." *Front Cell Dev Biol* 6: 13.
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A. und Penner, R.** (2003). "TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15166-15171.
- Preissler, S., Rohland, L., Yan, Y., Chen, R., Read, R. J. und Ron, D.** (2017). "AMPylation targets the rate-limiting step of BiP's ATPase cycle for its functional inactivation." *Elife* 6.
- Preissler, S., Chambers, J. E., Crespillo-Casado, A., Avezov, E., Miranda, E., Perez, J., Hendershot, L. M., Harding, H. P. und Ron, D.** (2015). "Physiological modulation of BiP activity by trans-protomer engagement of the interdomain linker." *Elife* 4: e08961.
- Preston, A. M. und Hendershot, L. M.** (2013). "Examination of a second node of translational control in the unfolded protein response." *J Cell Sci* 126(Pt 18): 4253-4261.

- Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N. und He, Y. W.** (2007). "A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation." *J Exp Med* 204(1): 25-31.
- Puck, T. T., Marcus, P. I. und Cieciura, S. J.** (1956). "Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer." *J Exp Med* 103(2): 273-283.
- Puhka, M., Joensuu, M., Vihinen, H., Belevich, I. und Jokitalo, E.** (2012). "Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells." *Mol Biol Cell* 23(13): 2424-2432.
- Pulkoski-Gross, A., Li, J., Zheng, C., Li, Y., Ouyang, N., Rigas, B., Zucker, S. und Cao, J.** (2015). "Repurposing the antipsychotic trifluoperazine as an antimetastasis agent." *Mol Pharmacol* 87(3): 501-512.
- Punnoose, E. A., Levenson, J. D., Peale, F., Boghaert, E. R., Belmont, L. D., Tan, N., Young, A., Mitten, M., Ingalla, E., Darbonne, W. C., Oleksijew, A., Tapang, P., Yue, P., Oeh, J., Lee, L., Maiga, S., Fairbrother, W. J., Amiot, M., Souers, A. J. und Sampath, D.** (2016). "Expression Profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 Predicts Pharmacological Response to the BCL-2 Selective Antagonist Venetoclax in Multiple Myeloma Models." *Mol Cancer Ther* 15(5): 1132-1144.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. und Strasser, A.** (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." *Cell* 129(7): 1337-1349.
- Putney, J. W.** (2011). "Origins of the concept of store-operated calcium entry." *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 980-984.
- Putney, J. W., Jr.** (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." *Cell Calcium* 7(1): 1-12.
- Putney, J. W., Jr.** (1977). "Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland." *J Physiol* 268(1): 139-149.
- Qian, Y. Q., Patel, D., Hartl, F. U. und McColl, D. J.** (1996). "Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain." *J Mol Biol* 260(2): 224-235.
- Quan, H., Fan, G. und Wang, C. C.** (1995). "Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site." *J Biol Chem* 270(29): 17078-17080.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K. U., Diamant, N. und Bar-Nun, S.** (2002). "AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation." *Mol Cell Biol* 22(2): 626-634.
- Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G. und Rizzuto, R.** (2016). "Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes." *Trends Biochem Sci* 41(12): 1035-1049.
- Ralsler, M., Wamelink, M. M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E. A., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H. und Krobitsch, S.** (2007). "Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress." *J Biol* 6(4): 10.
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M. R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. und Rizzuto, R.** (2002). "Recombinant expression of the

voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria." *J Cell Biol* 159(4): 613-624.

Rapoport, T. A. (2008). "Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane." *FEBS J* 275(18): 4471-4478.

Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." *Nature* 450(7170): 663-669.

Rapoport, T. A., Goder, V., Heinrich, S. U. und Matlack, K. E. (2004). "Membrane-protein integration and the role of the translocation channel." *Trends Cell Biol* 14(10): 568-575.

Rapoport, T. A. (1991). "Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane: facts, models, mysteries." *FASEB J* 5(13): 2792-2798.

Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. und Deber, C. M. (2009). "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1760-1765.

Rebelo, S., Vieira, S. I., da Cruz, E. Silva E. F. und da Cruz, E. Silva O. A. (2008). "Monitoring "De Novo"APP synthesis by taking advantage of the reversible effect of cycloheximide." *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 23(6): 602-608.

Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F. und Glimcher, L. H. (2001). "Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1." *Nature* 412(6844): 300-307.

Reth, M. und Wienands, J. (1997). "Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor." *Annu Rev Immunol* 15: 453-479.

Reynolds, J. A. und Tanford, C. (1970). "Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 66(3): 1002-1007.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. und Mammucari, C. (2012). "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(9): 566-578.

Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhaes, P. J., Di Virgilio, F. und Pozzan, T. (2003). "Calcium and apoptosis: facts and hypotheses." *Oncogene* 22(53): 8619-8627.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. und Pozzan, T. (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses." *Science* 280(5370): 1763-1766.

Rock, K. L. (2006). "Exiting the outside world for cross-presentation." *Immunity* 25(4): 523-525.

Rock, K. L., Benacerraf, B. und Abbas, A. K. (1984). "Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors." *J Exp Med* 160(4): 1102-1113.

Roderick, H. L., Lechleiter, J. D. und Camacho, P. (2000). "Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b." *J Cell Biol* 149(6): 1235-1248.

Romera-Cárdenas, G., Thomas, L. M., Lopez-Cobo, S., Garcia-Cuesta, E. M., Long, E. O. und Reyburn, H. T. (2016). "Ionomycin Treatment Renders NK Cells Hyporesponsive." *PLoS One* 11(3): e0150998.

- Ron, D. und Walter, P.** (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7): 519-529.
- Ronald, S., Awate, S., Rath, A., Carroll, J., Galiano, F., Dwyer, D., Kleiner-Hancock, H., Mathis, J. M., Vigod, S. und De Benedetti, A.** (2013). "Phenothiazine Inhibitors of TLKs Affect Double-Strand Break Repair and DNA Damage Response Recovery and Potentiate Tumor Killing with Radiomimetic Therapy." *Genes Cancer* 4(1-2): 39-53.
- Rong, Y. P., Bultynck, G., Aromolaran, A. S., Zhong, F., Parys, J. B., De Smedt, H., Mignery, G. A., Roderick, H. L., Bootman, M. D. und Distelhorst, C. W.** (2009). "The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34): 14397-14402.
- Rong, Y. P., Aromolaran, A. S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H. L., Bootman, M. D., Mignery, G. A., Parys, J. B., De Smedt, H. und Distelhorst, C. W.** (2008). "Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals." *Mol Cell* 31(2): 255-265.
- Roos, A., Buchkremer, S., Kollipara, L., Labisch, T., Gatz, C., Zitzelsberger, M., Brauers, E., Nolte, K., Schroder, J. M., Kirschner, J., Jesse, C. M., Goebel, H. H., Goswami, A., Zimmermann, R., Zahedi, R. P., Senderek, J. und Weis, J.** (2014). "Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome links endoplasmic reticulum chaperone dysfunction to nuclear envelope pathology." *Acta Neuropathol* 127(5): 761-777.
- Rosenbaum, M., Andreani, V., Kapoor, T., Herp, S., Flach, H., Duchniewicz, M. und Grosschedl, R.** (2014). "MZB1 is a GRP94 cochaperone that enables proper immunoglobulin heavy chain biosynthesis upon ER stress." *Genes Dev* 28(11): 1165-1178.
- Rosenberg, S. S. und Spitzer, N. C.** (2011). "Calcium signaling in neuronal development." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(10): a004259.
- Rostovtseva, T. und Colombini, M.** (1997). "VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function." *Biophys J* 72(5): 1954-1962.
- Rostovtseva, T. und Colombini, M.** (1996). "ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane." *J Biol Chem* 271(45): 28006-28008.
- Roth, R. A. und Pierce, S. B.** (1987). "In vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins." *Biochemistry* 26(14): 4179-4182.
- Rowland, A. A. und Voeltz, G. K.** (2012). "Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(10): 607-625.
- Roy, A. und Wonderlin, W. F.** (2003). "The permeability of the endoplasmic reticulum is dynamically coupled to protein synthesis." *J Biol Chem* 278(7): 4397-4403.
- Rutkowski, D. T., Kang, S. W., Goodman, A. G., Garrison, J. L., Taunton, J., Katze, M. G., Kaufman, R. J. und Hegde, R. S.** (2007). "The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* 18(9): 3681-3691.
- Sagan, L.** (1967). "On the origin of mitosing cells." *J Theor Biol* 14(3): 255-274.
- Saheki, Y. und De Camilli, P.** (2017). "Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites." *Annu Rev Biochem* 86: 659-684.
- Saibil, H.** (2013). "Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(10): 630-642.
- Sambrook, J. F.** (1990). "The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum." *Cell* 61(2): 197-199.

- Samudio, I., Fiegl, M. und Andreeff, M.** (2009). "Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism." *Cancer Res* 69(6): 2163-2166.
- Sano, R. und Reed, J. C.** (2013). "ER stress-induced cell death mechanisms." *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3460-3470.
- Sano, R., Hou, Y. C., Hedvat, M., Correa, R. G., Shu, C. W., Krajewska, M., Diaz, P. W., Tamble, C. M., Quarato, G., Gottlieb, R. A., Yamaguchi, M., Nizet, V., Dahl, R., Thomas, D. D., Tait, S. W., Green, D. R., Fisher, P. B., Matsuzawa, S. und Reed, J. C.** (2012). "Endoplasmic reticulum protein BI-1 regulates Ca(2+)-mediated bioenergetics to promote autophagy." *Genes Dev* 26(10): 1041-1054.
- Saparov, S. M., Erlandson, K., Cannon, K., Schaletzky, J., Schulman, S., Rapoport, T. A. und Pohl, P.** (2007). "Determining the conductance of the SecY protein translocation channel for small molecules." *Mol Cell* 26(4): 501-509.
- Saraiva, M. und O'Garra, A.** (2010). "The regulation of IL-10 production by immune cells." *Nat Rev Immunol* 10(3): 170-181.
- Sato, N., Urano, F., Yoon Leem, J., Kim, S. H., Li, M., Donoviel, D., Bernstein, A., Lee, A. S., Ron, D., Veselits, M. L., Sisodia, S. S. und Thinakaran, G.** (2000). "Upregulation of BiP and CHOP by the unfolded-protein response is independent of presenilin expression." *Nat Cell Biol* 2(12): 863-870.
- Saveljeva, S., Mc Laughlin, S. L., Vandenabeele, P., Samali, A. und Bertrand, M. J.** (2015). "Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells." *Cell Death Dis* 6: e1587.
- Sawada, H., Shimura, N., Hosokawa, F., Shibata, N. und Ikuhara, Y.** (2015). "Resolving 45-pm-separated Si-Si atomic columns with an aberration-corrected STEM." *Microscopy (Oxf)* 64(3): 213-217.
- Schamel, W. W. und Reth, M.** (2000). "Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor." *Immunity* 13(1): 5-14.
- Scharenberg, A. M., Humphries, L. A. und Rawlings, D. J.** (2007). "Calcium signalling and cell-fate choice in B cells." *Nat Rev Immunol* 7(10): 778-789.
- 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., Cavalié, A. und Zimmermann, R.** (2012). "BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER." *EMBO J* 31(15): 3282-3296.
- Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M. und Reed, J. C.** (1997). "Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5113-5118.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. und Gey, G. O.** (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." *J Exp Med* 97(5): 695-710.
- Schimper, A. F. W.** (1883). "Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper." *Botanische Zeitung*. Band 41, Sp. 105-120, 126-131 und 137-160.
- Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Fritsch, R., Groschner, K. und Romanin, C.** (2008). "2-aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size." *J Biol Chem* 283(29): 20261-20267.

- Schleiden, M. J.** (1838). "Beiträge zur Phytogenesis." *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medizin*: 137-176.
- Schlesier, M., Niemeyer, C., Duffner, U., Henschen, M., Tanzi-Fetta, R., Wolff-Vorbeck, G., Drager, R., Brandis, M. und Peter, H. H.** (1993). "Primary severe immunodeficiency due to impaired signal transduction in T cells." *Immunodeficiency* 4(1-4): 133-136.
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. und Christen, P.** (1994). "Kinetics of molecular chaperone action." *Science* 263(5149): 971-973.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. und Herzog, V.** (2000). "Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex." *J Cell Biol* 148(6): 1203-1212.
- Schnell, D. J. und Hebert, D. N.** (2003). "Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes." *Cell* 112(4): 491-505.
- Schorr, S. und van der Laan, M.** (2018). "Integrative functions of the mitochondrial contact site and cristae organizing system." *Semin Cell Dev Biol* 76: 191-200.
- Schorr, S., Klein, M. C., Gamayun, I., Melnyk, A., Jung, M., Schäuble, N., Wang, Q., Hemmis, B., Bochen, F., Greiner, M., Lampel, P., Urban, S. K., Haßdenteufel, S., Dudek, J., Chen, X. Z., Wagner, R., Cavalié, A. und 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(30): 18621-18635.
- Schröder, M.** (2008). "Endoplasmic reticulum stress responses." *Cell Mol Life Sci* 65(6): 862-894.
- Schubert, D., Klein, M. C., Haßdenteufel, S., Caballero-Oteyza, A., Yang, L., Proietti, M., Bulashevskaya, A., Kemming, J., Kuhn, J., Winzer, S., Rusch, S., Fliegauf, M., Schaffer, A. A., Pfeffer, S., Geiger, R., Cavalié, 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. und Grimbacher, B.** (2018). "Plasma cell deficiency in human subjects with heterozygous mutations in Sec61 translocon alpha 1 subunit (SEC61A1)." *J Allergy Clin Immunol* 141(4): 1427-1438.
- Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C. und Walter, P.** (2009). "Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response." *J Cell Biol* 187(4): 525-536.
- Schulmann, K., Brasch, F. E., Kunstmann, E., Engel, C., Pagenstecher, C., Vogelsang, H., Kruger, S., Vogel, T., Knaebel, H. P., Ruschoff, J., Hahn, S. A., Knebel-Doerberitz, M. V., Moeslein, G., Meltzer, S. J., Schackert, H. K., Tympner, C., Mangold, E., Schmiegel, W. und German, Hnpcc Consortium** (2005). "HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics." *Gastroenterology* 128(3): 590-599.
- Schuster, S., Boley, D., Moller, P., Stark, H. und Kaleta, C.** (2015). "Mathematical models for explaining the Warburg effect: a review focussed on ATP and biomass production." *Biochem Soc Trans* 43(6): 1187-1194.
- Schwaller, B.** (2010). "Cytosolic Ca²⁺ buffers." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(11): a004051.
- Schwann, T.** (1839). "Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum des Thiere und Pflanzen." W Engelmann: Leipzig, No 176.
- Schwarz, D. S. und Blower, M. D.** (2016). "The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling." *Cell Mol Life Sci* 73(1): 79-94.

- Seelert, H., Dani, D. N., Dante, S., Hauss, T., Krause, F., Schafer, E., Frenzel, M., Poetsch, A., Rexroth, S., Schwassmann, H. J., Suhai, T., Vonck, J. und Dencher, N. A.** (2009). "From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes." *Biochim Biophys Acta* 1787(6): 657-671.
- Sender, R., Fuchs, S. und Milo, R.** (2016). "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body." *PLoS Biol* 14(8): e1002533.
- 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. und Zerres, K.** (2005). "Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy." *Nat Genet* 37(12): 1312-1314.
- Senyilmaz, D. und Teleman, A. A.** (2015). "Chicken or the egg: Warburg effect and mitochondrial dysfunction." *F1000Prime Rep* 7: 41.
- Severs, N. J. und Shotton, D.** (1995). "Rapid, Freezing, Freeze Fracture and Deep Etching." Wiley-Liss, New York, p. 372.
- Sha, H., He, Y., Chen, H., Wang, C., Zenno, A., Shi, H., Yang, X., Zhang, X. und Qi, L.** (2009). "The IRE1alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis." *Cell Metab* 9(6): 556-564.
- 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. und 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(1): 81-93.
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltnane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K. und Staudt, L. M.** (2002). "Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program." *Immunity* 17(1): 51-62.
- Shah, B., Sedlis, S. P., Mai, X., Amoroso, N. S., Guo, Y., Lorin, J. D. und Berger, J. S.** (2013). "Comparison of platelet activity measurements by use of arterial and venous blood sampling." *J Thromb Haemost* 11(10): 1922-1924.
- Shang, W., Lu, F., Sun, T., Xu, J., Li, L. L., Wang, Y., Wang, G., Chen, L., Wang, X., Cannell, M. B., Wang, S. Q. und Cheng, H.** (2014). "Imaging Ca²⁺ nanosparks in heart with a new targeted biosensor." *Circ Res* 114(3): 412-420.
- Shannon, T. R., Ginsburg, K. S. und Bers, D. M.** (2000). "Reverse mode of the sarcoplasmic reticulum calcium pump and load-dependent cytosolic calcium decline in voltage-clamped cardiac ventricular myocytes." *Biophys J* 78(1): 322-333.
- Shao, S. und Hegde, R. S.** (2011). "Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum." *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 25-56.
- Shaw, A. S., Rottier, P. J. und Rose, J. K.** (1988). "Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(20): 7592-7596.
- Shaw, P. J., Qu, B., Hoth, M. und Feske, S.** (2013). "Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function." *Cell Mol Life Sci* 70(15): 2637-2656.

- Shaw, P. J. und Feske, S.** (2012). "Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system." *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2253-2268.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. und Prywes, R.** (2002a). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." *Dev Cell* 3(1): 99-111.
- Shen, Y. und Hendershot, L. M.** (2005). "ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates." *Mol Biol Cell* 16(1): 40-50.
- Shen, Y., Meunier, L. und Hendershot, L. M.** (2002b). "Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress." *J Biol Chem* 277(18): 15947-15956.
- Shi, Y., Ryu, D. D. und Ballica, R.** (1993). "Rheological properties of mammalian cell culture suspensions: Hybridoma and HeLa cell lines." *Biotechnol Bioeng* 41(7): 745-754.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M. und Rapoport, T. A.** (2010). "Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER." *Cell* 143(5): 774-788.
- Shibata, Y., Voeltz, G. K. und Rapoport, T. A.** (2006). "Rough sheets and smooth tubules." *Cell* 126(3): 435-439.
- Shimoni, E. und Müller, M.** (1998). "On optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new microbiopsy device." *J Microsc* 192(Pt 3): 236-247.
- Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A. und Yoshida, H.** (2006). "ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1." *J Cell Sci* 119(Pt 19): 3958-3966.
- Shlomchik, M. J. und Weisel, F.** (2012). "Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells." *Immunol Rev* 247(1): 52-63.
- Shuttleworth, T. J. und Thompson, J. L.** (1998). "Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca²⁺ entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C." *J Biol Chem* 273(49): 32636-32643.
- Simmerman, H. K. und Jones, L. R.** (1998). "Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function." *Physiol Rev* 78(4): 921-947.
- Simon, S. M. und Blobel, G.** (1991). "A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum." *Cell* 65(3): 371-380.
- Simons, T. J.** (1988). "Calcium and neuronal function." *Neurosurg Rev* 11(2): 119-129.
- Sitia, R. und Meldolesi, J.** (1992). "Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions." *Mol Biol Cell* 3(10): 1067-1072.
- Sitsapesan, R. und Williams, A. J.** (1995). "The gating of the sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel is regulated by luminal Ca²⁺." *J Membr Biol* 146(2): 133-144.
- Sjöblom, M., Säfsten, B. und Flemström, G.** (2003). "Melatonin-induced calcium signaling in clusters of human and rat duodenal enterocytes." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(6): G1034-1044.
- Skelin, M., Rupnik, M. und Cencic, A.** (2010). "Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research." *ALTEX* 27(2): 105-113.

- Skowronek, M. H., Rotter, M. und Haas, I. G.** (1999). "Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog." *Biol Chem* 380(9): 1133-1138.
- Smali, S. S., Hsu, Y. T., Carvalho, A. C., Rosenstock, T. R., Sharpe, J. C. und Youle, R. J.** (2003). "Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling." *Braz J Med Biol Res* 36(2): 183-190.
- Smith, J. B., Zheng, T. und Lyu, R. M.** (1989). "Ionomycin releases calcium from the sarcoplasmic reticulum and activates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells." *Cell Calcium* 10(3): 125-134.
- Smith, J. S., Coronado, R. und Meissner, G.** (1986). "Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca²⁺ and ATP and modulation by Mg²⁺." *J Gen Physiol* 88(5): 573-588.
- Smith, K. G., Light, A., O'Reilly, L. A., Ang, S. M., Strasser, A. und Tarlinton, D.** (2000). "bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells." *J Exp Med* 191(3): 475-484.
- Smith, K. G., Weiss, U., Rajewsky, K., Nossal, G. J. und Tarlinton, D. M.** (1994). "Bcl-2 increases memory B cell recruitment but does not perturb selection in germinal centers." *Immunity* 1(9): 803-813.
- Soller, K. J., Verardi, R., Jing, M., Abrol, N., Yang, J., Walsh, N., Vostrikov, V. V., Robia, S. L., Bowser, M. T. und Veglia, G.** (2015). "Rheostatic Regulation of the SERCA/Phospholamban Membrane Protein Complex Using Non-Coding RNA and Single-Stranded DNA oligonucleotides." *Sci Rep* 5: 13000.
- Song, S., Chew, C., Dale, B. M., Traum, D., Peacock, J., Yamazaki, T., Clynes, R., Kurosaki, T. und Greenberg, S.** (2011). "A requirement for the p85 PI3K adapter protein BCAP in the protection of macrophages from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." *J Immunol* 187(2): 619-625.
- Spets, H., Stromberg, T., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K. und Jernberg-Wiklund, H.** (2002). "Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival." *Eur J Haematol* 69(2): 76-89.
- Starheim, K. K., Holien, T., Misund, K., Johansson, I., Baranowska, K. A., Sponaas, A. M., Hella, H., Buene, G., Waage, A., Sundan, A. und Bjorkoy, G.** (2016). "Intracellular glutathione determines bortezomib cytotoxicity in multiple myeloma cells." *Blood Cancer J* 6(7): e446.
- Stathopoulos, P. B. und Ikura, M.** (2017). "Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms." *Cell Calcium* 63: 3-7.
- Stathopoulos, P. B., Zheng, L., Li, G. Y., Plevin, M. J. und Ikura, M.** (2008). "Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry." *Cell* 135(1): 110-122.
- Stevens, F. J. und Argon, Y.** (1999). "Protein folding in the ER." *Semin Cell Dev Biol* 10(5): 443-454.
- Strehler, E. E.** (2015). "Plasma membrane calcium ATPases: From generic Ca(2+) sump pumps to versatile systems for fine-tuning cellular Ca(2+)." *Biochem Biophys Res Commun* 460(1): 26-33.

- Strokotov, D. I., Yurkin, M. A., Gilev, K. V., van Bockstaele, D. R., Hoekstra, A. G., Rubtsov, N. B. und Maltsev, V. P.** (2009). "Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology?" *J Biomed Opt* 14(6): 064036.
- Studer, D., Humbel, B. M. und Chiquet, M.** (2008). "Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution." *Histochem Cell Biol* 130(5): 877-889.
- Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A. und Eggli, P.** (2001). "A new approach for cryofixation by high-pressure freezing." *J Microsc* 203(Pt 3): 285-294.
- Subramanian, K. und Meyer, T.** (1997). "Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores." *Cell* 89(6): 963-971.
- Sugawara, H., Kurosaki, M., Takata, M. und Kurosaki, T.** (1997). "Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor." *EMBO J* 16(11): 3078-3088.
- Sun, H., Lin, D. C., Guo, X., Kharabi Masouleh, B., Gery, S., Cao, Q., Alkan, S., Ikezoe, T., Akiba, C., Paquette, R., Chien, W., Muller-Tidow, C., Jing, Y., Agelopoulos, K., Muschen, M. und Koefler, H. P.** (2016). "Inhibition of IRE1alpha-driven pro-survival pathways is a promising therapeutic application in acute myeloid leukemia." *Oncotarget* 7(14): 18736-18749.
- Sundaram, A., Plumb, R., Appathurai, S. und Mariappan, M.** (2017). "The Sec61 translocon limits IRE1alpha signaling during the unfolded protein response." *Elife* 6.
- Supnet, C. und Bezprozvanny, I.** (2011). "Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer's disease pathogenesis." *Cell Calcium* 50(3): 303-309.
- Svärd, M., Biterova, E. I., Bourhis, J. M. und Guy, J. E.** (2011). "The crystal structure of the human co-chaperone P58(IPK)." *PLoS One* 6(7): e22337.
- Syam, N., Rougier, J. S. und Abriel, H.** (2014). "Glycosylation of TRPM4 and TRPM5 channels: molecular determinants and functional aspects." *Front Cell Neurosci* 8: 52.
- Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E. und Mueller, D. M.** (2012). "Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35): 13961-13965.
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T. und Rizzuto, R.** (2006). "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels." *J Cell Biol* 175(6): 901-911.
- Tabas, I. und Ron, D.** (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." *Nat Cell Biol* 13(3): 184-190.
- Tada, M., Kirchberger, M. A., Repke, D. I. und Katz, A. M.** (1974). "The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 249(19): 6174-6180.
- Takahashi, Y., Cerasoli, D. M., Dal Porto, J. M., Shimoda, M., Freund, R., Fang, W., Telander, D. G., Malvey, E. N., Mueller, D. L., Behrens, T. W. und Kelsoe, G.** (1999). "Relaxed negative selection in germinal centers and impaired affinity maturation in bcl-xL transgenic mice." *J Exp Med* 190(3): 399-410.
- Takaoka, Y., Goto, S., Nakano, T., Tseng, H. P., Yang, S. M., Kawamoto, S., Ono, K. und Chen, C. L.** (2014). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced, sepsis-related severe acute lung injury in mice." *Sci Rep* 4: 5204.

- Takemura, H. und Putney, J. W., Jr.** (1989). "Capacitative calcium entry in parotid acinar cells." *Biochem J* 258(2): 409-412.
- Takenaka, H., Adler, P. N. und Katz, A. M.** (1982). "Calcium fluxes across the membrane of sarcoplasmic reticulum vesicles." *J Biol Chem* 257(21): 12649-12656.
- Tal, I., Kozlovsky, T., Brisker, D., Giladi, M. und Khananshvili, D.** (2016). "Kinetic and equilibrium properties of regulatory Ca(2+)-binding domains in sodium-calcium exchangers 2 and 3." *Cell Calcium* 59(4): 181-188.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. und Dawson, A. P.** (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7): 2466-2470.
- Thornton, J. M.** (1981). "Disulphide bridges in globular proteins." *J Mol Biol* 151(2): 261-287.
- Todd, D. J., McHeyzer-Williams, L. J., Kowal, C., Lee, A. H., Volpe, B. T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M. G. und Glimcher, L. H.** (2009). "XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development." *J Exp Med* 206(10): 2151-2159.
- Tolchinsky, S., Yuk, M. H., Ayalon, M., Lodish, H. F. und Lederkremer, G. Z.** (1996). "Membrane-bound versus secreted forms of human asialoglycoprotein receptor subunits. Role of a juxtamembrane pentapeptide." *J Biol Chem* 271(24): 14496-14503.
- Torigoe, M., Iwata, S., Nakayamada, S., Sakata, K., Zhang, M., Hajime, M., Miyazaki, Y., Narisawa, M., Ishii, K., Shibata, H. und Tanaka, Y.** (2017). "Metabolic Reprogramming Commits Differentiation of Human CD27(+)IgD(+) B Cells to Plasmablasts or CD27(-)IgD(-) Cells." *J Immunol* 199(2): 425-434.
- Tornero, D., Posadas, I. und Cena, V.** (2011). "Bcl-x(L) blocks a mitochondrial inner membrane channel and prevents Ca²⁺ overload-mediated cell death." *PLoS One* 6(6): e20423.
- Torres, M., Encina, G., Soto, C. und Hetz, C.** (2011). "Abnormal calcium homeostasis and protein folding stress at the ER: A common factor in familial and infectious prion disorders." *Commun Integr Biol* 4(3): 258-261.
- Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Levenson, J. D., Souers, A. J., Maiga, S., Bene, M. C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C. und Amiot, M.** (2014). "The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma." *Leukemia* 28(1): 210-212.
- Toyoshima, C. und Inesi, G.** (2004). "Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* 73: 269-292.
- Toyoshima, C. und Nomura, H.** (2002). "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium." *Nature* 418(6898): 605-611.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. und Ogawa, H.** (2000). "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution." *Nature* 405(6787): 647-655.
- Trafford, A. W., Sibbring, G. C., Diaz, M. E. und Eisner, D. A.** (2000). "The effects of low concentrations of caffeine on spontaneous Ca release in isolated rat ventricular myocytes." *Cell Calcium* 28(4): 269-276.
- Treanor, B.** (2012). "B-cell receptor: from resting state to activate." *Immunology* 136(1): 21-27.

- Tripathy, A., Xu, L., Mann, G. und Meissner, G.** (1995). "Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor)." *Biophys J* 69(1): 106-119.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W. und Sawa, A.** (2011). "The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments." *Cell Signal* 23(2): 317-323.
- Tsai, C. W., Wu, Y., Pao, P. C., Phillips, C. B., Williams, C., Miller, C., Ranaghan, M. und Tsai, M. F.** (2017). "Proteolytic control of the mitochondrial calcium uniporter complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(17): 4388-4393.
- Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H. und Elmore, S. W.** (2008). "ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor." *Cancer Res* 68(9): 3421-3428.
- Tsukada, S., Saffran, D. C., Rawlings, D. J., Parolini, O., Allen, R. C., Klisak, I., Sparkes, R. S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quan, S. und et al.** (1993). "Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia." *Cell* 72(2): 279-290.
- Tsvilovskyy, V., Solis-Lopez, A., Schumacher, D., Medert, R., Roers, A., Kriebs, U. und Freichel, M.** (2018). "Deletion of *Orai2* augments endogenous CRAC currents and degranulation in mast cells leading to enhanced anaphylaxis." *Cell Calcium* 71: 24-33.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S. F., Hao, Y. H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G. und Bezprozvanny, I.** (2006). "Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations." *Cell* 126(5): 981-993.
- Turner, C. A., Jr., Mack, D. H. und Davis, M. M.** (1994). "Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells." *Cell* 77(2): 297-306.
- Tuteja, R.** (2005). "Type I signal peptidase: an overview." *Arch Biochem Biophys* 441(2): 107-111.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J. und Zimmermann, R.** (2003). "Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum." *EMBO Rep* 4(5): 505-510.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M. H., Haas, I. G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J. und Zimmermann, R.** (2000). "Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7214-7219.
- Uckun, F. M., Yang, Z., Sather, H., Steinherz, P., Nachman, J., Bostrom, B., Crotty, L., Sarquis, M., Ek, O., Zeren, T., Tubergen, D., Reaman, G. und Gaynon, P.** (1997). "Cellular expression of antiapoptotic BCL-2 oncoprotein in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group Study." *Blood* 89(10): 3769-3777.
- Urrea, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D. und Hetz, C.** (2013). "When ER stress reaches a dead end." *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 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. und 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(41): E6055-E6063.

- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D. Y. und Nagata, K.** (2008). "ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER." *Science* 321(5888): 569-572.
- van Anken, E., Romijn, E. P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I. und Heck, A. J.** (2003). "Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion." *Immunity* 18(2): 243-253.
- Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E. und Prevarskaya, N.** (2004). "Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores." *J Cell Sci* 117(Pt 18): 4135-4142.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. und Rapoport, T. A.** (2004). "X-ray structure of a protein-conducting channel." *Nature* 427(6969): 36-44.
- van Huizen, R., Martindale, J. L., Gorospe, M. und Holbrook, N. J.** (2003). "P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling." *J Biol Chem* 278(18): 15558-15564.
- van Vliet, A. R., Verfaillie, T. und Agostinis, P.** (2014). "New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling." *Biochim Biophys Acta* 1843(10): 2253-2262.
- Vance, J. E.** (1990). "Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria." *J Biol Chem* 265(13): 7248-7256.
- Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y. V., Baranova, A. V., Ivanov, D. V., Skryma, R. und Prevarskaya, N.** (2006). "Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1." *J Cell Biol* 174(4): 535-546.
- Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F. und Prevarskaya, N.** (2002). "Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells." *Cancer Cell* 1(2): 169-179.
- Vandenberg, C. J., Josefsson, E. C., Campbell, K. J., James, C., Lawlor, K. E., Kile, B. T. und Cory, S.** (2014). "Loss of Bak enhances lymphocytosis but does not ameliorate thrombocytopenia in BCL-2 transgenic mice." *Cell Death Differ* 21(5): 676-684.
- Vander Heiden, M. G., Li, X. X., Gottlieb, E., Hill, R. B., Thompson, C. B. und Colombini, M.** (2001). "Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane." *J Biol Chem* 276(22): 19414-19419.
- Vandonselaar, M., Hickie, R. A., Quail, J. W. und Delbaere, L. T.** (1994). "Trifluoperazine-induced conformational change in Ca(2+)-calmodulin." *Nat Struct Biol* 1(11): 795-801.
- Varga-Szabo, D., Braun, A. und Nieswandt, B.** (2009). "Calcium signaling in platelets." *J Thromb Haemost* 7(7): 1057-1066.
- Vasil, I. K.** (2008). "A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops." *Plant Cell Rep* 27(9): 1423-1440.
- Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S. S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., Dewaard, M. und Marty, I.** (2005). "Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 280(31): 28601-28609.

- Vembar, S. S., Jin, Y., Brodsky, J. L. und Hendershot, L. M.** (2009). "The mammalian Hsp40 ERdj3 requires its Hsp70 interaction and substrate-binding properties to complement various yeast Hsp40-dependent functions." *J Biol Chem* 284(47): 32462-32471.
- Vembar, S. S. und Brodsky, J. L.** (2008). "One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12): 944-957.
- Venkatachalam, K., Ma, H. T., Ford, D. L. und Gill, D. L.** (2001). "Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells." *J Biol Chem* 276(36): 33980-33985.
- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S. E., Schmitz, F., Weissgerber, P., Nilius, B., Flockerzi, V. und Freichel, M.** (2007). "Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4." *Nat Immunol* 8(3): 312-320.
- Verkhatsky, A., Trebak, M., Perocchi, F., Khananshvil, D. und Sekler, I.** (2018). "Crosslink between calcium and sodium signalling." *Exp Physiol* 103(2): 157-169.
- Vermeire, K., Bell, T. W., Van Puyenbroeck, V., Giraut, A., Noppen, S., Liekens, S., Schols, D., Hartmann, E., Kalies, K. U. und Marsh, M.** (2014). "Signal peptide-binding drug as a selective inhibitor of co-translational protein translocation." *PLoS Biol* 12(12): e1002011.
- Vig, M. und Kinet, J. P.** (2009). "Calcium signaling in immune cells." *Nat Immunol* 10(1): 21-27.
- Vig, M., DeHaven, W. I., Bird, G. S., Billingsley, J. M., Wang, H., Rao, P. E., Hutchings, A. B., Jouvin, M. H., Putney, J. W. und Kinet, J. P.** (2008). "Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels." *Nat Immunol* 9(1): 89-96.
- Vikström, I. B., Slomp, A., Carrington, E. M., Moesbergen, L. M., Chang, C., Kelly, G. L., Glaser, S. P., Jansen, J. H., Leusen, J. H., Strasser, A., Huang, D. C., Lew, A. M., Peperzak, V. und Tarlinton, D. M.** (2016). "MCL-1 is required throughout B-cell development and its loss sensitizes specific B-cell subsets to inhibition of BCL-2 or BCL-XL." *Cell Death Dis* 7(8): e2345.
- Vilborg, A., Passarelli, M. C. und Steitz, J. A.** (2016). "Calcium signaling and transcription: elongation, DoGs, and eRNAs." *Receptors Clin Investig* 3(1).
- Villalobo, A. und Lehninger, A. L.** (1980). "Inhibition of oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria and cells by intramitochondrial Ca²⁺." *J Biol Chem* 255(6): 2457-2464.
- Vishnu, N., Jadoon Khan, M., Karsten, F., Groschner, L. N., Waldeck-Weiermair, M., Rost, R., Hallstrom, S., Imamura, H., Graier, W. F. und Malli, R.** (2014). "ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca²⁺ release." *Mol Biol Cell* 25(3): 368-379.
- Voeltz, G. K., Rolls, M. M. und Rapoport, T. A.** (2002). "Structural organization of the endoplasmic reticulum." *EMBO Rep* 3(10): 944-950.
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. und 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(1): 25-35.
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. und Dimroth, P.** (2009). "Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases." *Annu Rev Biochem* 78: 649-672.

- von Borries, B. und Ruska, E.** (1935). "Das Elektronenmikroskop und seine Anwendungen." *Zeitschrift des Vereins deutscher Ingenieure* 79: 519-524.
- von Heijne, G.** (1984). "Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells." *EMBO J* 3(10): 2315-2318.
- Voorhees, R. M. und Hegde, R. S.** (2016). "Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence." *Science* 351(6268): 88-91.
- Voorhees, R. M., Fernandez, I. S., Scheres, S. H. und Hegde, R. S.** (2014). "Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution." *Cell* 157(7): 1632-1643.
- Waanders, E., te Morsche, R. H., de Man, R. A., Jansen, J. B. und Drenth, J. P.** (2006). "Extensive mutational analysis of PRKCSH and SEC63 broadens the spectrum of polycystic liver disease." *Hum Mutat* 27(8): 830.
- Wallstén, M. und Lundahl, P.** (1990). "Binding of sodium dodecyl sulphate to an integral membrane protein and to a water-soluble enzyme. Determination by molecular-sieve chromatography with flow scintillation detection." *J Chromatogr* 512: 3-12.
- Walsh, C., Barrow, S., Voronina, S., Chvanov, M., Petersen, O. H. und Tepikin, A.** (2009). "Modulation of calcium signalling by mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1787(11): 1374-1382.
- Walter, P. und Blobel, G.** (1983). "Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation." *Methods Enzymol* 96: 84-93.
- Wang, B., Luo, Y., Zhou, X. und Li, R.** (2018a). "Trifluoperazine induces apoptosis through the upregulation of Bax/Bcl2 and downregulated phosphorylation of AKT in mesangial cells and improves renal function in lupus nephritis mice." *Int J Mol Med* 41(6): 3278-3286.
- Wang, D., Moothart, D. R., Lowy, D. R. und Qian, X.** (2013). "The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associated cell cycle (GACC) genes correlates with cancer stage and poor survival in patients with solid tumors." *PLoS One* 8(4): e61262.
- Wang, L. und Dobberstein, B.** (1999). "Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum." *FEBS Lett* 457(3): 316-322.
- Wang, P., Li, J., Tao, J. und Sha, B.** (2018b). "The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization." *J Biol Chem* 293(11): 4110-4121.
- Wang, P. T., Garcin, P. O., Fu, M., Masoudi, M., St-Pierre, P., Pante, N. und Nabi, I. R.** (2015a). "Distinct mechanisms controlling rough and smooth endoplasmic reticulum contacts with mitochondria." *J Cell Sci* 128(15): 2759-2765.
- Wang, Q., Liang, B., Shirwany, N. A. und Zou, M. H.** (2011a). "2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase." *PLoS One* 6(2): e17234.
- Wang, Q., Shinkre, B. A., Lee, J. G., Weniger, M. A., Liu, Y., Chen, W., Wiestner, A., Trenkle, W. C. und Ye, Y.** (2010). "The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group." *PLoS One* 5(11): e15479.
- Wang, Q., Mora-Jensen, H., Weniger, M. A., Perez-Galan, P., Wolford, C., Hai, T., Ron, D., Chen, W., Trenkle, W., Wiestner, A. und Ye, Y.** (2009). "ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7): 2200-2205.

- Wang, Q., Li, L. und Ye, Y.** (2008). "Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I." *J Biol Chem* 283(12): 7445-7454.
- Wang, Q. C., Zheng, Q., Tan, H., Zhang, B., Li, X., Yang, Y., Yu, J., Liu, Y., Chai, H., Wang, X., Sun, Z., Wang, J. Q., Zhu, S., Wang, F., Yang, M., Guo, C., Wang, H., Zheng, Q., Li, Y., Chen, Q., Zhou, A. und Tang, T. S.** (2016). "TMCO1 Is an ER Ca(2+) Load-Activated Ca(2+) Channel." *Cell* 165(6): 1454-1466.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Andrade, M. D., Rothberg, B. S., Soboloff, J. und Gill, D. L.** (2014). "Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site." *Nat Commun* 5: 3183.
- Wang, X., Olberding, K. E., White, C. und Li, C.** (2011b). "Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis." *Cell Death Differ* 18(1): 38-47.
- Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M. und Ron, D.** (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." *EMBO J* 17(19): 5708-5717.
- Wang, Z., Zhu, S., Zhang, G. und Liu, S.** (2015b). "Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of bortezomib in B-cell acute lymphoblastic leukemia cells." *Am J Cancer Res* 5(2): 639-650.
- Warburg, O.** (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-314.
- Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. und Walker, J. E.** (2010). "Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(39): 16823-16827.
- Watts, C., Wickner, W. und Zimmermann, R.** (1983). "M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(10): 2809-2813.
- Weber, K. und Osborn, M.** (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 244(16): 4406-4412.
- Wei, J. und Hendershot, L. M.** (1995). "Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria." *J Biol Chem* 270(44): 26670-26676.
- Wei, L., Gallant, E. M., Dulhunty, A. F. und Beard, N. A.** (2009). "Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin." *Int J Biochem Cell Biol* 41(11): 2214-2224.
- Weitzmann, A., Baldes, C., Dudek, J. und Zimmermann, R.** (2007). "The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach." *FEBS J* 274(19): 5175-5187.
- Wen, X. Y., Stewart, A. K., Sooknanan, R. R., Henderson, G., Hawley, T. S., Reimold, A. M., Glimcher, L. H., Baumann, H., Malek, L. T. und Hawley, R. G.** (1999). "Identification of c-myc promoter-binding protein and X-box binding protein 1 as interleukin-6 target genes in human multiple myeloma cells." *Int J Oncol* 15(1): 173-178.
- White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N. B., Madesh, M., Thompson, C. B. und Foskett, J. K.** (2005). "The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R." *Nat Cell Biol* 7(10): 1021-1028.

- Wiechmann, K., Muller, H., Fischer, D., Jauch, J. und Werz, O.** (2015). "The acylphloroglucinols hyperforin and myrtilucimulone A cause mitochondrial dysfunctions in leukemic cells by direct interference with mitochondria." *Apoptosis* 20(11): 1508-1517.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J. und Ploegh, H. L.** (1996). "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol." *Cell* 84(5): 769-779.
- Wiest, D. L., Burkhardt, J. K., Hester, S., Hortsch, M., Meyer, D. I. und Argon, Y.** (1990). "Membrane biogenesis during B cell differentiation: most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately." *J Cell Biol* 110(5): 1501-1511.
- Wieteska, L., Shahidi, S. und Zhuravleva, A.** (2017). "Allosteric fine-tuning of the conformational equilibrium poises the chaperone BiP for post-translational regulation." *Elife* 6.
- Wilkinson, B. und Gilbert, H. F.** (2004). "Protein disulfide isomerase." *Biochim Biophys Acta* 1699(1-2): 35-44.
- Willer, M., Jermy, A. J., Young, B. P. und Stirling, C. J.** (2003). "Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane." *Yeast* 20(2): 133-148.
- Wills, E. S., Te Morsche, R. H. M., van Reeuwijk, J., Horn, N., Geomini, I., van de Laarschot, L. F. M., Mans, D. A., Ueffing, M., Boldt, K., Drenth, J. P. H. und Roepman, R.** (2017). "Liver cyst gene knockout in cholangiocytes inhibits cilium formation and Wnt signaling." *Hum Mol Genet* 26(21): 4190-4202.
- Wirth, A., Jung, M., Bies, C., Frien, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R. und Wagner, R.** (2003). "The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel." *Mol Cell* 12(1): 261-268.
- Wissing, F., Nerou, E. P. und Taylor, C. W.** (2002). "A novel Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism mediated by neither inositol trisphosphate nor ryanodine receptors." *Biochem J* 361(Pt 3): 605-611.
- Wittke, S., Dunnwald, M. und Johnsson, N.** (2000). "Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex." *Mol Biol Cell* 11(11): 3859-3871.
- Wittung-Stafshede, P., Guidry, J., Horne, B. E. und Landry, S. J.** (2003). "The J-domain of Hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in Hsp70." *Biochemistry* 42(17): 4937-4944.
- Witzany, G.** (2006). "Serial Endosymbiotic Theory (set): the biosemiotic update." *Acta Biotheor* 54(2): 103-117.
- Woehrle, T., Yip, L., Elkhali, A., Sumi, Y., Chen, Y., Yao, Y., Insel, P. A. und Junger, W. G.** (2010). "Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse." *Blood* 116(18): 3475-3484.
- Wolfram, F., Morris, E. und Taylor, C. W.** (2010). "Three-dimensional structure of recombinant type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor." *Biochem J* 428(3): 483-489.
- Wong, W., Bai, X. C., Brown, A., Fernandez, I. S., Hanssen, E., Condrón, M., Tan, Y. H., Baum, J. und Scheres, S. H.** (2014). "Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine." *Elife* 3.

- Wu, M. M., Covington, E. D. und Lewis, R. S.** (2014). "Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions." *Mol Biol Cell* 25(22): 3672-3685.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M. und Lewis, R. S.** (2006). "Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane." *J Cell Biol* 174(6): 803-813.
- Wu, Y., Wu, M., He, G., Zhang, X., Li, W., Gao, Y., Li, Z., Wang, Z. und Zhang, C.** (2012). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells." *Anal Biochem* 423(1): 15-22.
- Wuillème-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J. L., Amiot, M. und Bataille, R.** (2005). "Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival." *Leukemia* 19(7): 1248-1252.
- Xiang, X. Y., Yang, X. C., Su, J., Kang, J. S., Wu, Y., Xue, Y. N., Dong, Y. T. und Sun, L. K.** (2016). "Inhibition of autophagic flux by ROS promotes apoptosis during DTT-induced ER/oxidative stress in HeLa cells." *Oncol Rep* 35(6): 3471-3479.
- Xu, L., Tripathy, A., Pasek, D. A. und Meissner, G.** (1998). "Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels." *Ann N Y Acad Sci* 853: 130-148.
- Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L. und Xu, T.** (2006). "Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1." *Biochem Biophys Res Commun* 350(4): 969-976.
- Xu, Q. und Reed, J. C.** (1998). "Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast." *Mol Cell* 1(3): 337-346.
- Xu, Z., Zhang, D., He, X., Huang, Y. und Shao, H.** (2016). "Transport of Calcium Ions into Mitochondria." *Curr Genomics* 17(3): 215-219.
- Yan, W., Frank, C. L., Korth, M. J., Sopher, B. L., Novoa, I., Ron, D. und Katze, M. G.** (2002). "Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 15920-15925.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Haas, K. M., Poe, J. C., Fujimoto, M. und Tedder, T. F.** (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." *Immunity* 28(5): 639-650.
- Yang, J., Nune, M., Zong, Y., Zhou, L. und Liu, Q.** (2015). "Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP." *Structure* 23(12): 2191-2203.
- Yang, L., Lin, C., Zhao, S., Wang, H. und Liu, Z. R.** (2007a). "Phosphorylation of p68 RNA helicase plays a role in platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by up-regulating cyclin D1 and c-Myc expression." *J Biol Chem* 282(23): 16811-16819.
- Yang, L., Lin, C. und Liu, Z. R.** (2005). "Phosphorylations of DEAD box p68 RNA helicase are associated with cancer development and cell proliferation." *Mol Cancer Res* 3(6): 355-363.
- Yang, Z., Cheng, W., Hong, L., Chen, W., Wang, Y., Lin, S., Han, J., Zhou, H. und Gu, J.** (2007b). "Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor induced apoptosis of MCF-7 cells." *Mol Biol Cell* 18(11): 4681-4689.

- Yano, S., Tokumitsu, H. und Soderling, T. R.** (1998). "Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway." *Nature* 396(6711): 584-587.
- Ye, Y., Meyer, H. H. und Rapoport, T. A.** (2001). "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." *Nature* 414(6864): 652-656.
- Yeh, C. T., Wu, A. T., Chang, P. M., Chen, K. Y., Yang, C. N., Yang, S. C., Ho, C. C., Chen, C. C., Kuo, Y. L., Lee, P. Y., Liu, Y. W., Yen, C. C., Hsiao, M., Lu, P. J., Lai, J. M., Wang, L. S., Wu, C. H., Chiou, J. F., Yang, P. C. und Huang, C. Y.** (2012). "Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer." *Am J Respir Crit Care Med* 186(11): 1180-1188.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O. und Cahalan, M. D.** (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." *Nature* 443(7108): 226-229.
- Yip, L., Woehrle, T., Corriden, R., Hirsh, M., Chen, Y., Inoue, Y., Ferrari, V., Insel, P. A. und Junger, W. G.** (2009). "Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors." *FASEB J* 23(6): 1685-1693.
- Yoo, J. Y., Hurwitz, B. S., Bolyard, C., Yu, J. G., Zhang, J., Selvendiran, K., Rath, K. S., He, S., Bailey, Z., Eaves, D., Cripe, T. P., Parris, D. S., Caligiuri, M. A., Yu, J., Old, M. und Kaur, B.** (2014). "Bortezomib-induced unfolded protein response increases oncolytic HSV-1 replication resulting in synergistic antitumor effects." *Clin Cancer Res* 20(14): 3787-3798.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. und Mori, K.** (2000). "ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response." *Mol Cell Biol* 20(18): 6755-6767.
- Youn, H. D., Sun, L., Prywes, R. und Liu, J. O.** (1999). "Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2." *Science* 286(5440): 790-793.
- Young, H. S., Jones, L. R. und Stokes, D. L.** (2001). "Locating phospholamban in co-crystals with Ca(2+)-ATPase by cryoelectron microscopy." *Biophys J* 81(2): 884-894.
- Young, J. C.** (2010). "Mechanisms of the Hsp70 chaperone system." *Biochem Cell Biol* 88(2): 291-300.
- Yu, M. und Haslam, D. B.** (2005). "Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3." *Infect Immun* 73(4): 2524-2532.
- Yu, M., Haslam, R. H. und Haslam, D. B.** (2000). "HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells." *J Biol Chem* 275(32): 24984-24992.
- Yu, R. und Hinkle, P. M.** (2000). "Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies withameleon calcium indicators." *J Biol Chem* 275(31): 23648-23653.
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J. L. und Inesi, G.** (1993). "H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes." *Biophys J* 64(4): 1232-1242.
- Yun, C. H., Chae, H. J., Kim, H. R. und Ahn, T.** (2012). "Doxorubicin- and daunorubicin-induced regulation of Ca²⁺ and H⁺ fluxes through human bax inhibitor-1 reconstituted into membranes." *J Pharm Sci* 101(3): 1314-1326.

- Zahedi, R. P., Volzing, C., Schmitt, A., Frien, M., Jung, M., Dudek, J., Wortelkamp, S., Sickmann, A. und Zimmermann, R.** (2009). "Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7." *Proteomics* 9(13): 3463-3473.
- Zehner, M., Marschall, A. L., Bos, E., Schloetel, J. G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A. J., Dubel, S. und Burgdorf, S.** (2015). "The translocon protein Sec61 mediates antigen transport from endosomes in the cytosol for cross-presentation to CD8(+) T cells." *Immunity* 42(5): 850-863.
- Zhang, B., Gojo, I. und Fenton, R. G.** (2002). "Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma." *Blood* 99(6): 1885-1893.
- Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., De Strooper, B. und Bezprozvanny, I.** (2010a). "Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis." *J Neurosci* 30(25): 8566-8580.
- Zhang, K., Wong, H. N., Song, B., Miller, C. N., Scheuner, D. und Kaufman, R. J.** (2005a). "The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis." *J Clin Invest* 115(2): 268-281.
- Zhang, L., Li, L., Leavesley, H. W., Zhang, X., Borowitz, J. L. und Isom, G. E.** (2010b). "Cyanide-induced apoptosis of dopaminergic cells is promoted by BNIP3 and Bax modulation of endoplasmic reticulum-mitochondrial Ca²⁺ levels." *J Pharmacol Exp Ther* 332(1): 97-105.
- Zhang, L. und McCloskey, M. A.** (1995). "Immunoglobulin E receptor-activated calcium conductance in rat mast cells." *J Physiol* 483 (Pt 1): 59-66.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. und Cahalan, M. D.** (2005b). "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane." *Nature* 437(7060): 902-905.
- Zhang, X., Xu, R., Zhang, C., Xu, Y., Han, M., Huang, B., Chen, A., Qiu, C., Thorsen, F., Prestegarden, L., Bjerkvig, R., Wang, J. und Li, X.** (2017). "Trifluoperazine, a novel autophagy inhibitor, increases radiosensitivity in glioblastoma by impairing homologous recombination." *J Exp Clin Cancer Res* 36(1): 118.
- Zhao, L., Rosales, C., Seburn, K., Ron, D. und Ackerman, S. L.** (2010). "Alteration of the unfolded protein response modifies neurodegeneration in a mouse model of Marinesco-Sjogren syndrome." *Hum Mol Genet* 19(1): 25-35.
- Zhao, L., Longo-Guess, C., Harris, B. S., Lee, J. W. und Ackerman, S. L.** (2005). "Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP." *Nat Genet* 37(9): 974-979.
- Zheng, H., Zhou, M. H., Hu, C., Kuo, E., Peng, X., Hu, J., Kuo, L. und Zhang, S. L.** (2013). "Differential roles of the C and N termini of Orai1 protein in interacting with stromal interaction molecule 1 (STIM1) for Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channel activation." *J Biol Chem* 288(16): 11263-11272.
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Li, G. Y., Romanin, C. und Ikura, M.** (2011). "Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(4): 1337-1342.
- Zhou, F., Xu, Y., Qiu, Y., Wu, X., Zhang, Z. und Jin, R.** (2014). "Ik6 expression provides a new strategy for the therapy of acute lymphoblastic leukemia." *Oncol Rep* 31(3): 1373-1379.

- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. und Tschopp, J.** (2011). "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation." *Nature* 469(7329): 221-225.
- Zhou, X., Friedmann, K. S., Lyrmann, H., Zhou, Y., Schoppmeyer, R., Knorck, A., Mang, S., Hoxha, C., Angenendt, A., Backes, C. S., Mangerich, C., Zhao, R., Cappello, S., Schwar, G., Hassig, C., Neef, M., Bufe, B., Zufall, F., Kruse, K., Niemeyer, B. A., Lis, A., Qu, B., Kummerow, C., Schwarz, E. C. und Hoth, M.** (2018). "A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity." *J Physiol* 596(14): 2681-2698.
- Zhou, Y. P., Teng, D., Dralyuk, F., Ostrega, D., Roe, M. W., Philipson, L. und Polonsky, K. S.** (1998). "Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca²⁺ stores and arachidonic acid metabolism." *J Clin Invest* 101(8): 1623-1632.
- Zhu, D. M., Fang, W. H., Narla, R. K. und Uckun, F. M.** (1999). "A requirement for protein kinase C inhibition for calcium-triggered apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells." *Clin Cancer Res* 5(2): 355-360.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. und Hendrickson, W. A.** (1996). "Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK." *Science* 272(5268): 1606-1614.
- Zhu, Y., Zhang, G., Lin, S., Shi, J., Zhang, H. und Hu, J.** (2018). "Sec61beta facilitates the maintenance of endoplasmic reticulum homeostasis by associating microtubules." *Protein Cell* 9(7): 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. und Helms, V.** (2011). "Protein translocation across the ER membrane." *Biochim Biophys Acta* 1808(3): 912-924.
- Zimmermann, R., Muller, L. und Wullich, B.** (2006). "Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies." *Trends Mol Med* 12(12): 567-573.
- Zucker-Franklin, D.** (1996). "Megakaryocyte and platelet structure in thrombocytopoiesis: the effect of cytokines." *Stem Cells* 14 Suppl 1: 1-17.
- Zweifach, A. und Lewis, R. S.** (1993). "Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13): 6295-6299.
- Zylinska, L., Guerini, D., Gromadzinska, E. und Lachowicz, L.** (1998). "Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca²⁺-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus." *Biochim Biophys Acta* 1448(1): 99-108.

Veröffentlichungen in Revision:

- Gamayun, I., O'Keefe, S., Pick, T., Klein, M.-C., Nguyen, D., Piacenti, M., Flitsch, S. L., Whitehead, R., Swanton, E., Helms, V., High, S., Zimmermann, R. und Cavalié, A.** (2018). "Eeyarestatin compounds selectively enhance Sec61-mediated Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum." *Cell Chem Biol*.

8. Publikationen

Veröffentlichungen in Bearbeitung oder Revision:

Pick, T., Schirra, C., Krause, E., Gamayun, I., Niemeyer, B., Beck, A., Rettig, J., Zimmermann, R., Lang, S., Cavalié, A. (2018). Re-modelling of the Ca²⁺ homeostasis induced by ER expansion in plasma-cells. *In Bearbeitung*.

Gamayun, I., O'Keefe, S., **Pick, T.**, Klein, M.-C., Nguyen, D., Piacenti, M., Flitsch, S. L., Whitehead, R., Swanton, E., Helms, V., High, S., Zimmermann, R. und Cavalié, A. (2018). "Eeyarestatin compounds selectively enhance Sec61-mediated Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum." *Cell Chem Biol. In Revision*.

Poster:

Pick, T., Jung, M., Zimmermann, R., Cavalié, A. „Mechanisms and regulation of the calcium leak from the endoplasmic reticulum.” ER & Redox Club Meeting, 26.-29.04.2017, Homburg/Saar.

Pick, T., Jung, M., Zimmermann, R., Cavalié, A. „Mechanisms and regulation of the calcium leak from the endoplasmic reticulum.” EMBO Conference: Structure and function of the endoplasmic reticulum, 23.-27.10.2016, Girona (Spanien).

Pick, T., Dudek, J., Jung, M., Zimmermann, R., Cavalié, A. „Pharmacological regulation of the Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum.” Joint German-Israeli Network Meeting, 26.-27.03.2015, Homburg/Saar.

Pick, T., Dudek, J., Jung, M., Zimmermann, R., Cavalié, A. „Pharmacological regulation of the Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum.” Cell Physics 2014, 23.-26.09.2014, Saarbrücken.

9. Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Adolfo Cavalié für das Bereitstellen dieses Themas, die geduldigen Erklärungen und stete Diskussionsbereitschaft, was für die Fertigstellung dieser Arbeit von unschätzbarem Wert war. Natürlich muss der gemeinsame Besuch in Tel Aviv und Jerusalem auch erwähnt werden, der mir für immer in Erinnerung bleiben wird!

Univ.-Prof. Dr. Richard Zimmermann bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die vielen Diskussionen, Hilfestellungen und Ideen.

Ein besonderer Dank gilt darüber hinaus den Kooperationspartnern, durch deren Kompetenzen die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht wurde. Hervorzuheben sind hier PD Dr. Elmar Krause für die Betreuung am LSM, Dr. Claudia Schirra für die Betreuung am TEM und Prof. Dr. Gerardo Lederkremer für die Bereitstellung der H2a-Konstrukte und die Organisation für unseren Aufenthalt in Israel.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dr. Sven Lang für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit, die hilfreichen Ideen und die immerwährende Bereitschaft zu helfen wo es nur geht.

Daneben möchte ich mich herzlich bei Dr. Igor Gamayun und René Tinschert für die unterhaltsame und angenehme Zeit im Labor danken. Weiterhin möchte ich mich besonders aufgrund der technischen Unterstützung bei Heidi Löhr, Karin Wolske, Ute Soltek, wegen der Behebung technischer Probleme bei Martin Simon-Thomas und PD Ulrich Wissenbach für die Klonierungen der H2a-GCaMP-Konstrukte bedanken. Außerdem gilt für die abwechslungsreiche und tolle Zeit im Labor und darüber hinaus ein großes Dankeschön allen Mitgliedern (und damit meine ich wirklich allen!) der AG Univ.-Prof. Dr. Veit Flockerzi und Univ.-Prof. Dr. Richard Zimmermann.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Joachim und Irmgard und meinem Bruder Sebastian bedanken, die mir zu jeder Zeit den nötigen Rückhalt und Motivation gaben, um meine Ziele zu erreichen und die immer für mich da waren!

Insbesondere möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Freundin Tina bedanken! Das viele gemeinsame Lachen, durch die Welt fahren und sowieso jede Sekunde mit Dir hat wesentlich zu meinem Ausgleich und Fokussieren auf das Wesentliche beigetragen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, vor allem Frieder und Lars, mit denen ich auf viele unvergessene Ereignisse zurückblicken kann und die mir den nötigen Rückhalt gaben und für (manchmal notwendige) Ablenkungen sorgten und immer ein offenes Ohr für jegliches Anliegen hatten bzw. immer noch haben! Ich könnte hier noch viel viel mehr Leuten danken, das würde aber dann doch etwas den Rahmen sprengen. Damit geht an alle „nicht-erwähnten“, aber trotzdem für mich wichtigen Leuten: Vielen Dank euch allen!