

Aus dem Bereich medizinische Biochemie und Molekularbiologie,

Theoretische Medizin

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung PEX19-abhängiger Effekte auf die Ca^{2+} - Homöostase in HeLa-Zellen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von: Fabian Riske

geb. am: 18.09.1990 in Mühlacker

Tag der Promotion: 5. März 2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Jun.-Prof. Dr. Bianca Schrul
Univ.-Prof. Dr. Adolfo Cavalié

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	15
1. Zusammenfassung	17
2. Einleitung	21
2.1. Lipidtröpfchen	21
2.1.1. Aufbau	21
2.1.2. Physiologische Funktionen der Lipidtröpfchen.....	22
2.1.3. Lipidtröpfchen und ihre Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen	23
2.1.4. Biogenese der Lipidtröpfchen.....	25
2.1.5. PEX19-abhängiger Transport von Lipidtröpfchen-Proteinen.....	27
2.2. Ca^{2+} -Homöostase	30
2.2.1. Ca^{2+} als second messenger	30
2.2.2. Ca^{2+} -Clearance	31
2.2.3. Ca^{2+} -Kanäle des ER.....	32
2.2.4. Die Bedeutung der Nicht-ER- Ca^{2+} Speicher für die Ca^{2+} -Homöostase	34
2.2.5. Die Rolle von Ca^{2+} in der Lipidtröpfchen-Homöostase.....	35
2.3. Zielstellung der Arbeit	37
3. Material & Methoden	39
3.1. Material.....	39
3.1.1. Zelllinien.....	39
3.1.2. Bakterienstamm	40
3.1.3. Kits, Chemikalien und Geräte.....	41
3.1.4. Plasmide	47
3.2. Methoden.....	48
3.2.1. Zellkultur	48
3.2.1.1. Zellkulturtechniken	48
3.2.1.2. Induktion der Lipidtröpfchen-Biogenese	49

3.2.2.	Ca ²⁺ -Messungen	50
3.2.2.1.	Zytosolische Ca ²⁺ -Messungen.....	50
3.2.2.2.	Berechnung der Steigung bzw. des Abfalls der zytosolischen Ca ²⁺ -Konzentration im Fura-2-AM basierten Messverfahren.....	56
3.2.2.3.	Kalibrierungsmessungen zur Berechnung der absoluten Ca ²⁺ -Konzentration	56
3.2.2.3.1.	Bestimmung von R _{max} für jede der untersuchten Zelllinien.....	57
3.2.2.3.2.	Bestimmung von R _{min} für jede der untersuchten Zelllinien	58
3.2.2.3.3.	Die Berechnung der absoluten Ca ²⁺ -Konzentration	59
3.2.2.4.	Bestimmung der mitochondrialen Ca ²⁺ -Konzentration	61
3.2.2.4.1.	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	61
3.2.2.4.2.	Plasmidpräparation	62
3.2.2.4.3.	Bestimmung der DNA-Konzentration	62
3.2.2.4.4.	Transfektion von HeLa-Zellen.....	63
3.2.2.4.5.	Färben und Fixieren der transfizierten HeLa-Zellen.....	64
3.2.2.4.6.	Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der mitochondrialen Ca ²⁺ -Sensoren.....	65
3.2.2.4.7.	Mitochondriale Ca ²⁺ -Messungen	65
3.2.3.	Bestimmung der Proteinabundanz mittels Immunoblot.....	69
3.2.3.1.	Zellernte und Herstellung von 1% Triton X-100 Lysaten.....	69
3.2.3.2.	Proteinmengenbestimmung mittels BCA-Test	70
3.2.3.3.	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese	71
3.2.3.4.	Immunoblot	73
3.2.4.	Statistik	76
4.	Ergebnisse	77
4.1.	Fura-2-AM-basierte Ca ²⁺ -Bildgebung	77
4.1.1.	Bestimmung der gesamtzellulären Ca ²⁺ -Konzentration in Abhängigkeit von PEX19.....	77
4.1.2.	Ein reduziertes ER-Ca ²⁺ -Leck in Zellen ohne wildtypisches PEX19.....	81
4.1.3.	Analyse des SOCE in Abhängigkeit von PEX19.....	85

4.1.4.	Veränderung der SOCE-Antwort bei Fehlen von wildtypischem PEX19	88
4.1.4.1.	PEX19 beeinflusst die Ca^{2+} -Clearance	92
4.1.5.	Eine veränderte Ca^{2+} -Konzentration in Nicht-ER- Ca^{2+} -Speichern in HeLa-Zellen ohne wildtypisches PEX19	96
4.2.	Untersuchungen zum Einfluss von PEX19 auf die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration.....	104
4.2.1.	Überprüfung der subzellulären Lokalisation der mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren	105
4.2.2.	Validierung der Ca^{2+} -Sensoren-Funktion durch pharmakologische Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase.....	107
4.2.3.	Die Induktion der LT-Biogenese führt in Abhängigkeit von PEX19 zu einer Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration	110
4.3.	Bestimmung der Abundanz Ca^{2+} -kontrollierender Proteine	114
4.3.1.	Eine verminderte Abundanz von SERCA in Abwesenheit von wildtypischem PEX19.....	114
4.3.2.	Die Abundanz der Ca^{2+} -regulierenden PMCA der Plasmamembran ist bei Fehlen von wildtypischem PEX19 reduziert.....	118
4.3.3.	Reduzierte Abundanz von mitochondrialen Ca^{2+} -regulierenden Transportern und Kanälen in Zellen ohne wildtypisches PEX19	120
5.	Diskussion	128
5.1.	Peroxisomaler Phänotyp vs. LT-Proteom Phänotyp	128
5.2.	Die Veränderung der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von PEX19	130
5.3.	In Abhängigkeit von PEX19 zeigt sich eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase des ER... ..	131
5.4.	Eine veränderte Ca^{2+} -Clearance als Folge des veränderten LT-Metabolismus in Zellen ohne wildtypisches PEX19	137
5.5.	Die Rolle von Peroxisomen als Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher und im Energiestoffwechsel.....	140
5.6.	Eine veränderte mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase in Abwesenheit von Peroxisomen?.....	142
5.7.	Offene Fragen und Ausblick.....	146

6. Anhang	148
6.1. Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen.....	148
6.2. Mitochondriale Ca^{2+} -Messungen	172
7. Literaturverzeichnis	177
8. Danksagung	190

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
-/-	<i>knockout</i>
%	Prozent
ACAT	Sterol-O-Acyltransferase
ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetylmethylester
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BiP	Immunglobulin-bindendes Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
BSCL2	Berardinelli-Seip kongenitale Lipodystrophie 2
C	Cystein
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAS9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CGL	Angeborene generalisierte Lipodystrophie
cpVenus	<i>Circulary permuted venus</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DGAT1	Diacylglycerol-O-Acyltransferase 1
DGAT2	Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>
F	Fluoreszenzintensität
FBS	Fetales Kälberserum

FPL	Familiäre partielle Lipodystrophie
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskraft
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
HSL	Hormonsensitive Lipase
Iono	Ionomycin
IP3R	Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP3)-Rezeptor
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Kl.	Klon
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
LDAF1	<i>lipid droplet assembly protein 1</i>
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LOT	Chargennummer
LT	Lipidtröpfchen
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
M	Mol
MCU	<i>Mitochondrial Ca²⁺ uniporter</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mM	Millimol
ms	Millisekunde
n	Anzahl der Zellen
N	Anzahl der Messungen
NCKX	Natrium-Ca ²⁺ -Kalium <i>exchanger</i>
nCLX	Na ⁺ /Ca ²⁺ <i>exchanger</i>
NCX	Natrium-Ca ²⁺ <i>exchanger</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
n.s.	nicht signifikant
OCR	Respirationsrate

p	p-Wert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamine
PEI	Polyethylenimin
PEX19 ^{-/-}	PEX19- <i>knockout</i>
PEX19 _{C296S}	Farnesylierungsdefiziente Variante des PEX19
PFA	Paraformaldehyd
Pi	Monophosphat
PMCA	<i>Plasma membrane Ca²⁺ ATPase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
R _{max}	Maximaler ratiometrischer Messwert
R _{min}	Minimaler ratiometrischer Messwert
ROI	<i>Region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S	Serin
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	<i>Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SOCE	<i>Store-operated Ca²⁺ entry</i>
SRP	Signalerkennungspartikel
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Thapsigargin
Tgl4	<i>Triacylglycerol lipase</i>
TRIS	Tris-aminomethan
UBAC2	<i>Ubiquitin-associated domain-containing protein 2</i>
UBXD8	<i>Ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein 8</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
v/v	Volumenprozent

V	Volt
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i>
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i>
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
zero[Ca ²⁺] _{ext}	Konzentration von 0,5 mM EGTA in extrazellulärer Messlösung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Lipidtröpfchens (LT)	22
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines aus dem ER entstehenden Lipidtröpfchens (LT).	27
Abbildung 3: Das zytosolische PEX19 und das membrangebundene PEX3 sind für die Zielsteuerung von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) und von LT-Proteinen essentiell	28
Abbildung 4: Schematische Darstellung der an der zellulären Ca^{2+} -Homöostase beteiligten Transporter und Kanäle	31
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messungen in lebenden Zellen	54
Abbildung 6: Programmoberfläche von VisiView während der Markierung der Zellen für die nachfolgende Fura-2-AM basierte Messung des zytosolischen Ca^{2+} in HeLa-Zellen	55
Abbildung 7: Die Ermittlung von R_{\max} des Quotienten F340/387 in der HeLa-WT-Zelllinie ..	58
Abbildung 8: Die Ermittlung von R_{\min} des Quotienten F340/387 in der HeLa-WT-Zelllinie...	59
Abbildung 9: Schematische Darstellung der mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv	67
Abbildung 10: Schematischer Aufbau des elektrophoretischen Transfers der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran im Trans Blot Turbo Transfer-System der Firma Bio-Rad	74
Abbildung 11: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Ionomycin-Zugabe in WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinien	81
Abbildung 12: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin zu WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinien.	85
Abbildung 13: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin in WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinien.....	88
Abbildung 14: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER.	92
Abbildung 15: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach zeitlich getrennter Thapsigargin-, Ca^{2+} -, und EGTA-Gabe in Oleat-behandelten Zellen der WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie	95

Abbildung 16: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der unbehandelten WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie.....	98
Abbildung 17: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der Oleat-behandelten WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie.....	101
Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in der HeLa WT-Zelllinie nach transienter Transfektion und Fixierung.....	106
Abbildung 19: Überprüfung der Funktionsfähigkeit der transient exprimierten Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in lebenden HeLa WT-Zellen.	109
Abbildung 20: Ratiometrische Messungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mithilfe der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in lebenden Zellen mit wildtypischem oder deletiertem bzw. mutiertem PEX19.....	112
Abbildung 21: Immunoblot gegen Ca^{2+} -regulierende Transporter und Kanäle des ERs in 1% Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19 ^{-/-} - und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung...	117
Abbildung 22: Immunoblot gegen die in die Ca^{2+} -Clearance involvierte PMCA in 1% Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19 ^{-/-} - und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung.....	120
Abbildung 23: Immunoblot gegen den mitochondrialen Ca^{2+} -Kanal VDAC bzw. den Ca^{2+} -Transporter MCU in Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19 ^{-/-} - und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung.	123
Abbildung 24: Immunoblot gegen Proteine der Atmungskette in Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19 ^{-/-} - und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung.	126
Abbildung 25: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Ionomycin-Zugabe zur unbehandelten WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} - Zelllinie.....	150
Abbildung 26: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Ionomycin-Zugabe zur Oleat-behandelten WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie.....	151
Abbildung 27: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin zur unbehandelten WT-, PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} -Zelllinie.....	153

Abbildung 28: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin zur Oleat-behandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie	154
Abbildung 29: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin zur unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie	156
Abbildung 30: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin in unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinien	156
Abbildung 31: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin in Oleat-behandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinien	157
Abbildung 32: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER.	159
Abbildung 33: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER.	161
Abbildung 34: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER.	163
Abbildung 35: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER.	164
Abbildung 36: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie	166
Abbildung 37: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie	168
Abbildung 38: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der Oleat-behandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie	170
Abbildung 39: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der Oleat-behandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie	171

- Abbildung 40:** Überprüfung der Funktionsfähigkeit des transient exprimierten Ca^{2+} -Sensors D3cpv in lebenden HeLa Zellen der WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie den beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne Induktion der LT-Biogenese..... 174
- Abbildung 41:** Überprüfung der Funktionsfähigkeit des transient exprimierten Ca^{2+} -Sensors D3cpv in lebenden HeLa Zellen der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie den beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie nach Induktion der LT-Biogenese..... 175

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der PEX19-abhängigen Charakteristika der von Schrul und Kopito generierten Zelllinien	29
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien	40
Tabelle 3: Übersicht über den verwendeten Bakterienstamm.	40
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits	41
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.	41
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien	43
Tabelle 7: Übersicht über die verwendete Software	46
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Plasmide.	47
Tabelle 9: Übersicht über die zur Kultivierung von HeLa-Zellen verwendeten Medien.	48
Tabelle 10: Übersicht über die Zusammensetzung der für die Fura-2-AM basierten zytosolischen Ca^{2+} -Messungen verwendeten Puffer.....	52
Tabelle 11: Übersicht über die Zusammensetzung der für die Kalibrierungsmessungen zur Berechnung der absoluten Ca^{2+} -Konzentration genutzten Puffer.....	57
Tabelle 12: Die errechneten $R_{\text{max}}/R_{\text{min}}$ -Werte der Zelllinien WT, PEX19 ^{-/-} sowie PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19.....	60
Tabelle 13: Übersicht über die zur Kultivierung von Mikroorganismen genutzten Medien und Reagenzien	61
Tabelle 14: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes zur Transfektion von HeLa-Zellen mittels PEI	63
Tabelle 15: Zusammensetzung der 1 x PBS- und der Fixierlösung für HeLa-Zellen	64
Tabelle 16: Die Belichtungszeiten im DAPI-Kanal, Cy3-Kanal und GFP-Kanal zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Pericam MT und D3cpv	65
Tabelle 17: Zusammensetzung des 1 x PBS-Puffers.	69
Tabelle 18: Übersicht über die Zusammensetzung des 1% Triton X-100 Lysepuffers.....	70
Tabelle 19: Übersicht über die zur (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendeten Puffer und Gele.	71
Tabelle 20: Übersicht über die Zusammensetzung der für den Immunoblot verwendeten Puffer und Färbelösungen	73

Tabelle 21: Übersicht über verwendete Primärantikörper75

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper75

Tabelle 23: Übersicht über die Fura-2-AM-basierten Ergebnisse der Ca²⁺-Messungen in der WT-, PEX19^{-/-}- sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und mit Induktion der LT-Biogenese103

Tabelle 24: Übersicht über die Fura-2-AM-basierten sowie mitochondrialen Ca²⁺-Messungen in der WT-, PEX19^{-/-}- sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und mit Induktion der LT-Biogenese130

1. Zusammenfassung

Während Lipidtröpfchen (LT) lange Zeit für inerte Organellen zur Speicherung von metabolischer Energie in Form von Neutrallipiden gehalten wurden, ist mittlerweile deutlich geworden, dass es sich um hoch dynamische Organellen mit einer Vielzahl von physiologischen Funktionen handelt [50,122]. Diese umfassen neben der Speicherung von Neutrallipiden auch die kontrollierte Freisetzung von Fettsäuren [106], den Schutz der Zellen vor Lipotoxie [131] und die Speicherung von Cholesterolestern [50,106]. In den Fokus der Forschung gelangten LT auch wegen ihrer Assoziation mit einer Vielzahl von häufigen Erkrankungen, so sind Akkumulationen von LT mit Erkrankungen wie Adipositas, Typ-2-Diabetes und Atherosklerose assoziiert [174]. Von Schrul und Kopito wurde vor kurzem ein SRP (Signalerkennungspartikel)-unabhängiger Lokalisationsweg zur Integration des Haarnadel-Proteins UBXD8 und vermutlich auch weiterer LT-Proteine ins endoplasmatische Retikulum (ER) entdeckt, welcher auf einer farnesylierten Form von PEX19 beruht [151]. Erste Experimente deuteten auf eine verlangsamte Lipolyse in Zellen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 hin (AG Schrul, unveröffentlicht). Die vollständige Regulation der Lipolyse ist noch unverstanden, aber es konnte ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase und einer gestörten LT-Biogenese, einhergehend mit einer veränderten Lipolyse, aufgezeigt werden [21,113,182]. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob PEX19-vermittelte Funktionen Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase haben. Dazu sollten Fura-2-AM basierte Experimente zur Untersuchung der gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration, des ER- Ca^{2+} -Lecks, des SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) sowie der Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher erfolgen. Organell-spezifische Messungen sollten die mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase näher beleuchten. Zudem sollten Immunoblots Aufschluss über eine mögliche veränderte Abundanz Ca^{2+} -kontrollierender Transporter und Kanäle geben. In dieser Arbeit wurde eine HeLa PEX19 *knockout* Zelllinie (PEX19^{-/-}) sowie eine HeLa PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie, welche ausschließlich eine farnesylierungsdefiziente Form von PEX19 exprimiert, im Vergleich zu Wildtyp HeLa-Zellen untersucht. Die PEX19^{-/-}-Zelllinie weist eine vollständige Deletion der Peroxisomen sowie ein verändertes LT-Proteom auf, wohingegen die PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zwar Peroxisomen besitzt, aber auch ein verändertes LT-Proteom aufweist [151]. Mithilfe dieser Zelllinien ist eine Differenzierung zwischen Effekten fehlender Peroxisomen und eines veränderten LT-Proteoms möglich. In Fura-2-AM basierten Experimenten zeichneten sich niedrigere ER- Ca^{2+} -Konzentration, ein veränderter Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Induktion des SOCE sowie veränderte Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 ab, die nicht auf das Fehlen von Peroxisomen zurückzuführen waren. Die mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen mittels Organell-spezifischer Reporterproteine wiesen auf erhöhte

mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen hin, ließen sich jedoch nicht eindeutig einem peroxisomalen oder LT-Proteom Phänotyp zuordnen. Bei einem Teil der untersuchten in die Ca^{2+} -Homöostase involvierten Transporter und Kanäle, insbesondere SERCA, PMCA, MCU und VDAC sowie Atmungskettenproteinen zur mitochondrialen Charakterisierung, war eine deutliche Reduktion der Abundanz ermittelbar. Damit ließen sich in der vorliegenden Arbeit erstmals PEX19-abhängige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase nachweisen, die mit der beobachteten verminderten Lipolyse korrelieren. Inwieweit die gestörte Ca^{2+} -Homöostase dabei Ursache oder Folge der eingeschränkten Lipolyse ist lässt sich nicht abschließend klären. Allerdings deuten die Ergebnisse auf eine mögliche Störung des Energiehaushaltes in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 hin, die ursächlich für die gestörte Ca^{2+} -Homöostase und die möglicherweise daraus resultierende eingeschränkte Lipolyse verantwortlich sein könnte.

Abstract

Characterization of PEX19-dependent effects on Ca^{2+} homeostasis in HeLa cells

While lipid droplets (LDs) have been long considered as inert organelles for the storage of fatty acids in the form of neutral lipids, by now it became clear that they are highly dynamic organelles with a variety of physiological functions [50,122]. Besides the storage of neutral lipids these also include the controlled release of fatty acids [106], the protection of the cell against lipotoxicity [131] and the storage of cholesterol esters [50,106]. Also due to their involvement in a multitude of frequent diseases they got into focus of research as accumulation of LDs has been associated with diseases such as adipositas, diabetes type 2 and atherosclerosis [174]. Recently Schrul and Kopito discovered an SRP (signal recognition particle)-independent localisation pathway for the integration of the hairpin protein UBXD8 and probably also further LD proteins into the endoplasmic reticulum (ER) that depends on a farnesylated form of PEX19 [151]. Preliminary experiments suggest a defect in lipolysis in absence of wild type PEX19 (AG Schrul, unpublished). The complete regulation of lipolysis is not yet understood but a connection between an altered Ca^{2+} homeostasis and a disturbed biogenesis of LDs accompanied by an altered lipolysis has been shown [21,113,182]. The aim of this thesis was to investigate if PEX19-mediated functions have effects on cellular Ca^{2+} homeostasis. Therefore Fura-2-AM based experiments should be performed to determine the whole cell Ca^{2+} concentration, the ER Ca^{2+} leak, SOCE (store-operated Ca^{2+} entry) as well as non-ER Ca^{2+} storage. In addition, organelle specific measurements should be performed to elucidate the mitochondrial Ca^{2+} storage. Moreover immunoblot-based experiments should reveal potentially altered abundances of Ca^{2+} controlled transporters and channels. In order to differentiate between effects derived from the absence of peroxisomes and an altered LD proteome different cell lines were investigated: a HeLa PEX19 knockout cell line (PEX19^{-/-}) and a HeLa PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} cell line exclusively expressing a farnesylation-deficient form of PEX19 were analysed together with wild type HeLa cells for comparison. The PEX19^{-/-} cell line shows a complete loss of peroxisomes next to an altered LD proteom whereas the PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} cell line has peroxisomes but is also characterised by an altered LT proteom [151]. By means of these cell lines it is possible to differentiate between effects of absent peroxisomes and an altered LD proteom. The Fura-2-AM based experiments revealed a lower ER Ca^{2+} concentration, a varied course of the cytosolic Ca^{2+} concentration after SOCE induction as well as an altered non-ER Ca^{2+} storage in absence of wild type PEX19, which could not be attributed to the loss of peroxisomes. The mitochondrial Ca^{2+} measurements indicated elevated mitochondrial Ca^{2+} concentrations.

However, they could not be clearly assigned to a peroxisomal or LD proteom phenotype. Some of the analysed transporters and channels involved in the Ca^{2+} homeostasis, especially SERCA, PMCA, MCU and VDAC as well as respiratory chain proteins for mitochondrial characterisation showed a significant decrease in protein abundance. Thus, in this work PEX19-dependent effects on Ca^{2+} homeostasis could be determined for the first time. The results may indicate a disturbance in cellular energy balance in the absence of PEX19, which could be the cause for the disturbed Ca^{2+} homeostasis and potentially also for a reduction in lipolysis.

2. Einleitung

2.1. Lipidtröpfchen

2.1.1. Aufbau

Bereits Ende des 17. Jahrhunderts wurden durch van Leeuwenhoek Fetttropfen in Milch, die heute als Lipidtröpfchen (LT) bekannt sind, entdeckt [188,192]. Erste Beschreibungen, dass LT auch als intrazelluläre Organellen existieren, lieferten Ende des 19. Jahrhunderts Richard Altmann und E.B. Wilson [139,183]. LT sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten zu finden. Ihr Vorkommen in Eukaryoten beschränkt sich jedoch nicht nur auf Adipozyten, sondern sie kommen in fast allen eukaryotischen Zelltypen vor. Ihre subzelluläre Lokalisation ist dabei in der Regel das Zytosol, wenngleich in Hepatozyten LT auch im Nukleus nachgewiesen werden konnten [93,169,175]. Bemerkenswert ist auch die riesige Bandbreite der Größe dieses Organells, so können LT in reifen Adipozyten einen Durchmesser von bis zu 200 µm erreichen und praktisch das ganze zytosolische Volumen einnehmen. Auf der anderen Seite sind in Milch-sezernierenden Zellen Mikrolipidtropfen mit einem Durchmesser von gerade einmal 50 nm beschrieben worden [121].

Wie in Abbildung 1 veranschaulicht, enthalten LT im Kern Neutrallipide, vor allem Triacylglycerole oder Sterolester [50,106]. Durch die damit einhergehende Hydrophobizität des Kernes weisen die LT eine einzigartige Membran auf, die aus einer Phospholipid-Einzelschicht besteht [165]. Hierbei orientieren sich die Phospholipide mit ihren polaren Kopfgruppen zum wässrigen Zytosol, während die hydrophoben Acylketten der Fettsäuren in den Kern zeigen [175]. Die am häufigsten vorkommenden Phospholipide der Phospholipid-Einzelschicht sind Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamine (PE) [13]. In diversen Studien hat sich ein spezifisches LT-Proteom von ca. 100 bis 150 Proteinen in Säugerzellen abgezeichnet, die ganz maßgeblich zur Funktion der LT beitragen [124,188]. Dabei lassen sich grundsätzlich peripher assoziierte Proteine von monotopisch integrierten Membranproteinen unterscheiden [19].

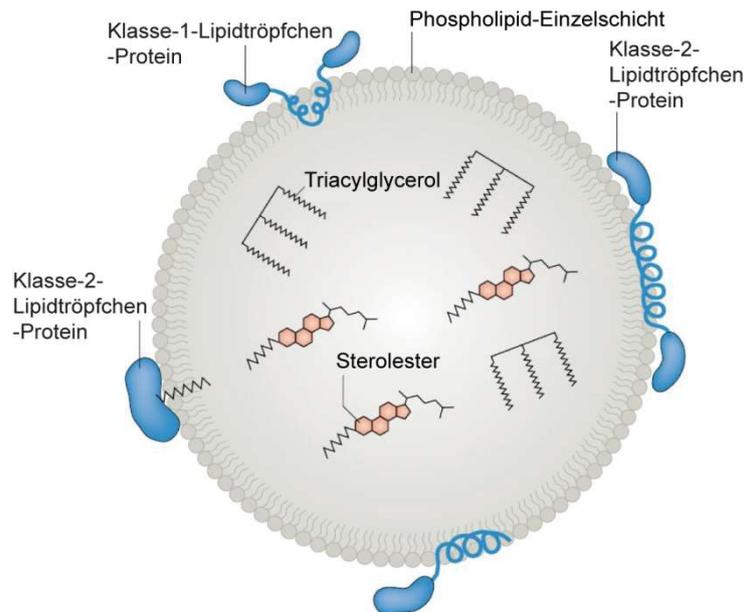


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Lipidtröpfchens (LT). Der hydrophobe Kern besteht aus Neutrallipiden, hauptsächlich Triacylglycerolen oder Sterolestern. Umgeben werden die Neutrallipide von einer Phospholipid-Einzelschicht, in die verschiedene LT-spezifische Proteine entweder monotopisch stabil integriert sind (Klasse-1-LT-Proteine) oder an die periphere Proteine assoziiert sind (Klasse-2-LT-Proteine). (Verändert nach Olzmann und Carvalho, 2019).

2.1.2. Physiologische Funktionen der Lipidtröpfchen

Während man LT lange Zeit als statische, inerte Organellen zur reinen Langzeitspeicherung von Lipiden betrachtete, wandelte sich die Sicht mit der Zeit hin zu einem hoch dynamischen Organell mit einer Vielzahl von physiologischen Funktionen [50,122]. Die Hauptaufgaben der LT umfassen die Speicherung von Neutrallipiden zur Energiegenerierung, Membran- und Steroidsynthese [106]. Zur Energiegewinnung werden die durch Lipolyse freigesetzten Fettsäuren in Mitochondrien und Peroxisomen der β -Oxidation zugeführt; zu beiden Organellen können LT direkte Kontaktseiten aufbauen [124]. Die Freisetzung der Fettsäuren erfolgt dabei durch Lipasen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Ein bekannter Aktivierungsweg läuft über die Bindung eines Hormons an einen G-Proteingekoppelten Rezeptor, der zur Aktivierung der Adenylcyclase führt, welche cyclisches AMP (cAMP) generiert. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, welche wiederum die hormonsensitive Lipase (HSL) phosphoryliert und aktiviert [64]. Die hormonsensitive Lipase (HSL) galt lange Zeit als das limitierende Enzym für die initialen Schritte der Lipolyse. Allerdings konnte gezeigt werden, dass sich die Lipase ATGL (Adipozyten-Triglycerid-Lipase) für die Hydrolyse der Triacylglycerole und damit für den ersten Schritt im Fettsäureabbau verantwortlich zeigt, wohingegen die HSL eher eine Präferenz zur Hydrolyse der Diacylglycerole aufweist [190,194]. Aber die Proteinkinase A phosphoryliert nicht nur HSL, sondern auch Perilipin,

infolgedessen es zur Translokation der HSL aus dem Zytosol zur Oberfläche der LT kommt [106].

Eine weitere wichtige Funktion von LT neben den bereits genannten hauptsächlich katabolen Funktionen stellt der Schutz der Zelle vor zu hohen Konzentrationen freier Fettsäuren im Zytosol dar, welche aufgrund ihrer amphipatischen Eigenschaften die Integrität der Zellmembran schädigen können [124,153]. Statt als Fettsäuren im Zytosol werden sie im LT als inerte Triacylglycerole gespeichert und verlieren somit ihre lipotoxischen Eigenschaften [131]. Auch für die Cholesterin-Homöostase nehmen LT eine wichtige Rolle ein, indem sie Cholesterin als Cholesterolester speichern [50,106,114]. Interessanterweise konnten auch vom Lipidstoffwechsel weitgehend unabhängige Funktionen der LT identifiziert werden, so konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass LT vermutlich als temporäre Histonspeicher während der frühen Embryogenese dienen [39].

2.1.3. Lipidtröpfchen und ihre Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen

Eine aus dem Gleichgewicht geratene LT-Homöostase zeigt sich für eine große Vielzahl von Erkrankungen verantwortlich. Insbesondere die exzessive Erhöhung der LT-Anzahl führt zu vielen immer häufiger vorkommenden Erkrankungen weltweit, wie Adipositas, Typ-2-Diabetes, Fettleber und Atherosklerose [174]. Dabei lassen sich Adipositas und eine gestörte Glucose-Homöostase unter dem Begriff des metabolischen Syndroms subsumieren [49]. Perilipin 1 ist ein wichtiger Regulator der Lipolyse in weißen Adipozyten und ist unter anderem für den Schutz der Triacylglycerole vor Lipolyse bei nicht-induziertem Lipolyse-Signalweg wichtig. In Perilipin 1-*knockout*-Mäusen ließ sich über Ernährung kein Übergewicht induzieren, vermutlich durch eine dauerhaft erhöhte basale Lipolyse [107]. Bezugnehmend auf die Fettleber konnten in Hepatozyten Triacylglycerol-reiche LT beobachtet werden, die unter anderem von einer normalerweise nur in Adipozyten aktivierten Perilipin 1-Expression begleitet waren [53]. Nicht nur die Perilipine, sondern auch die Enzyme der finalen Triacylglycerol-Synthese, DGAT1 (Diacylglycerol-O-Acyltransferase 1) und DGAT2 (Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2), stellen daher vielversprechende Kandidaten für neue medikamentöse Angriffspunkte dar [174]. Zudem implizieren zahlreiche Studien, dass eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase zu Akkumulationen von LT in Hepatozyten und damit zur Formierung einer nicht-alkoholischen Fettleber beiträgt [4].

Atherosklerose stellt einer der häufigsten Todesursache in Industrienationen dar und manifestiert sich im finalen Stadium mit Myokardinfarkten und Schlaganfällen [83]. Auf zellulärer Ebene kommt es dabei zu subendothelialen Lipoproteinablagerungen von LDL (*low*

density lipoproteins), Chylomikronen und VLDL (*very low density lipoproteins*). Diese werden von Makrophagen internalisiert, hydrolysiert und schließlich nach Veresterung durch ACAT (Sterol-O-Acyltransferase) in LT als Cholesterolester gespeichert. Nach Aufnahme von großen Mengen der Cholesterolester werden die Makrophagen aufgrund ihres charakteristischen mikroskopischen Aussehens als sogenannte Schaumzellen bezeichnet. Schließlich kommt es zur Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen, die zur Plaque-Formierung führen [83,118]. Doch auch bei Entzündungen und Karzinomen konnte eine erhöhte Anzahl von LT beobachtet werden [29]. Eine gesteigerte Lipogenese, bedingt durch eine erhöhte Aktivität lipogener Enzyme, stellt ein Charakteristikum vieler humaner Karzinome dar und ist in der Regel mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [29,164].

Eine gemeinsame Eigenschaft von Entzündungen und Neoplasien ist die Synthese von Eikosanoiden, die aus Arachidonsäure metabolisiert werden. Diesbezüglich konnten LT sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Schlüsselorganellen für die erhöhte Eikosanoid-Synthese identifiziert werden [28,29]. Erste Hinweise, dass Lipolyse und Zell-Proliferation in Verbindung stehen, wurden 2009 mit der Entdeckung einer Phosphorylierung und Aktivierung der Tgl4 (*Triacylglycerol lipase*), dem Hefeortholog zur ATGL, durch eine Cyclin-abhängige Kinase geliefert [87]. Neuere Studien zeigen, dass eine Überexpression der ATGL in Hepatozyten zu einer Inhibierung des Zellzyklus, resultierend in einer verlangsamten Proliferationsrate, führt [184]. In Zellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms konnte eine Akkumulation von LT beobachtet werden, die durch Speicherung von potentiell toxischen, gesättigten Fettsäuren und einer gleichzeitigen Abgabe von ungesättigten Fettsäuren maßgeblich zur hohen Hypoxietoleranz dieser Zellen beitragen [1]. Doch das Gleichgewicht der LT-Homöostase kann auch in Richtung einer erniedrigten Anzahl von LT verschoben sein. Derartige Pathologien werden als Lipodystrophien bezeichnet und können angeboren oder induziert sein, letzteres kann zum Beispiel durch Protease-Inhibitoren im Rahmen einer hochaktiven antiretroviralen Therapie bei HIV-Patienten ausgelöst werden [35,57]. Angeborene Lipodystrophien werden grundsätzlich in zwei klinisch manifeste Phänotypen eingeteilt, der angeborenen generalisierten Lipodystrophie (CGL) mit generalisiertem Fettverlust im ganzen Körper und der familiären partiellen Lipodystrophie (FPL) mit partiellem Fettverlust [57]. Bei der CGL führt eine Mutation des Berardinelli-Seip kongenitale Lipodystrophie 2 Gens, welches für das ER-Protein Seipin codiert, zu einem schweren Krankheitsbild [83].

Darüber hinaus konnten verschiedene Pathogene beobachtet werden, die LT für ihre Replikation nutzen. So konnte gezeigt werden, dass das Core Protein des Hepatitis-C-Virus unter anderem für die Kolokalisation des Replikationskomplexes mit LT wichtig ist. Diese

Kolokalisation scheint für die Assemblierung von neuen infektiösen Viren von Bedeutung zu sein, da Core-defiziente Leberzellen eine gestörte Virusproduktion zeigen [117]. Im Falle vom obligat intrazellulären Bakterium *Chlamydia trachomatis* sind dessen Inklusionsseiten von vielen kleinen LT umgeben, vermutlich um Neutrallipide bereitzustellen [86].

Abschließend lässt sich festhalten, dass LT somit als potentielle neue Angriffspunkte für anti-inflammatorische, anti-proliferative und anti-pathogene Therapien in Frage kommen.

2.1.4. Biogenese der Lipidtröpfchen

Im Gegensatz zu den meisten Organellen wird im Falle von LT angenommen, dass der Hauptanteil der Biogenese auf eine *de novo*-Entstehung zurückzuführen ist, obwohl grundsätzlich auch eine Teilung von LT beobachtet werden konnte [98]. Auch wenn der molekulare Mechanismus der LT-Biogenese noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, wurden als Entstehungsort schon früh Mikrodomänen des endoplasmatischen Retikulums (ER) favorisiert [175,180]. Ursächlich hierfür war der Nachweis von Enzymen zur Neutrallipidsynthese im ER, wie der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase und der Diacylglycerol-Acyltransferase [120]. Auch die Tatsache, dass die beiden Hauptphospholipide (PC und PE) der LT im ER synthetisiert werden, spricht für eine Biogenese im ER [50]. In weiteren Studien konnte zudem auf direkte funktionelle Verbindungen zwischen ER- und LT-Membran geschlossen werden, die einen bidirektionalen Transport von integralen Membranproteinen zwischen diesen beiden Organellen erlauben [79].

Das aktuell favorisierte Modell zur Entstehung von Triacylglycerol-enthaltenen LT beschreibt den initialen Schritt als die Synthese von Triacylglycerolen innerhalb der ER-Phospholipid-Doppelschicht [175]. Der finale Syntheseschritt zum Triacylglycerol wird hierbei durch Diacylglycerol-Acyltransferasen katalysiert [37]. Infolgedessen kommt es zu einer Anreicherung von Triacylglycerolen innerhalb der ER-Membran, einer Phospholipid-Doppelschicht, die zur Formierung einer sogenannten Öl-Linse führt. Es wird angenommen, dass mit der Ausbildung dieser linsenartigen Struktur, die Entropiekosten zur Aufrechterhaltung einer potentiell Membran-aufspaltenden Akkumulation von Lipiden möglichst gering gehalten werden. Als nächster Schritt erfolgt die Knospung eines entstehenden LT (Abbildung 2), der hierbei vom ER ins Zytosol abgeschnürt wird und eine sphärische Form einnimmt [17,175]. Doch auch hier ist nicht vollständig geklärt, ob alle LT komplett vom ER getrennt werden. So konnte in Säugerzellen eine komplette Abtrennung einiger LT vom ER gezeigt werden, wohingegen in Hefezellen für die untersuchten LT eine dauerhafte Verbindung der beiden Organellen nachgewiesen werden konnte [79,179].

Die Knospung selber ist wahrscheinlich durch die biophysikalischen Eigenschaften der ER-Membran definiert und ist unter anderem vom Winkel der Öl-Linse zur ER-Membran abhängig [17,166]. Daneben spielen aber auch Proteine eine entscheidende Rolle in der Biogenese der LT. Erstmals bei Patienten mit kongenitaler Lipodystrophie in den Fokus der Forschung geraten [103], konnten mittlerweile für Seipin wichtige Funktionen in der Steuerung der LT-Biogenese aufgezeigt werden, die unter anderem die Syntheserate, Knospung und Morphologie betreffen [36,178]. Zudem konnten vor kurzem sowohl die Struktur des Seipins aus *Drosophila* als auch des humanen Seipins mittels Kryoelektronenmikroskopie aufgedeckt werden [161,187].

Die bisher identifizierten LT-Proteine sind sehr wahrscheinlich nicht im LT-Kern zu finden und sind auch keine Transmembranproteine oder polytopischen Proteine, was mit der Hydrophobizität des LT-Kerns zu erklären ist [19]. So stellt sich das Lumen des LT-Kerns als energetisch ungünstige Umgebung zur Inkorporation von hydrophilen Domänen von Proteinen, welche bei Transmembranproteinen und polytopischen Proteinen ins Lumen ragen, dar [19]. Statt polytopischer Proteine oder Transmembranproteine finden sich zum Beispiel peripher assoziierte Proteine wie die Perilipine an LT, welche die am häufigsten vorkommenden Proteine auf der Oberfläche von adipozytären LT sind [30]. Zudem gibt es kleine GTPasen, welche über einen Lipidanker in der Phospholipid-Einzelschicht verankert sind [167]. Integrale Membranproteine können nur als monotopische Proteine integriert werden, welche die letzte Klasse der LT-Proteine darstellen. Bei diesen monotopisch integrierten Membranproteinen befinden sich die hydrophilen Domänen im Zytosol, wohingegen die hydrophoben Domänen entweder haarnadelartig in die LT-Membran inserieren oder amphipatisch über α -Helices in die LT-Membran eingelagert sind [19,124]. Obwohl die Integration von Proteinen in die LT-Phospholipid-Einzelschicht Membran nicht komplett verstanden ist, lassen sich prinzipiell zwei grundlegend voneinander zu unterscheidende Mechanismen differenzieren. Klasse-1-LT-Proteine, wie zum Beispiel DGAT2 oder UBXD8 (*ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein-8*), sind zunächst, wie in Abbildung 2 veranschaulicht, mit ihren hydrophoben Domänen in die ER-Membran integriert und translozieren danach in die Phospholipid-Einzelschicht der LT [19,82]. Die haarnadelartige hydrophobe Domäne der Klasse-1-LT-Proteine inseriert hierbei nur in die Phospholipid-Doppelschicht ohne diese zu durchspannen und lumenale Domänen zu haben. Daher können Klasse-1-LT-Proteine sowohl in die Phospholipid-Doppelschicht des ER als auch in die Phospholipid-Einzelschicht der LT inserieren [124]. Im Gegensatz dazu werden Klasse-2-LT-Proteine nach Translation an freien Ribosomen im Zytoplasma posttranslational in LT integriert. Bekannte Vertreter dieser Gruppe stellen die Perilipine dar [179]. Die

Inserierung in die Phospholipid-Einzelschicht erfolgt dabei meist über amphipathische α -Helices [124].

Eine Größenzunahme von LT kann auf der einen Seite durch lokale Triacylglycerol-Synthese induziert werden, die mit einer Anreicherung von Triacylglycerol-synthetisierenden Enzymen, wie DGAT, aus dem ER einhergeht [85,180]. Passend zu dieser Annahme konnten ER-LT Membrankontakte nachgewiesen werden, welche zur Lokalisierung von Triacylglycerol-synthetisierenden Enzymen auf LT beitragen [160,181]. Auf der anderen Seite können mehrere LT miteinander interagieren und dabei entweder mittels Permeation Neutrallipide vom kleineren LT zum größeren LT übertragen oder durch Koaleszenz zu einem größeren LT fusionieren [180].

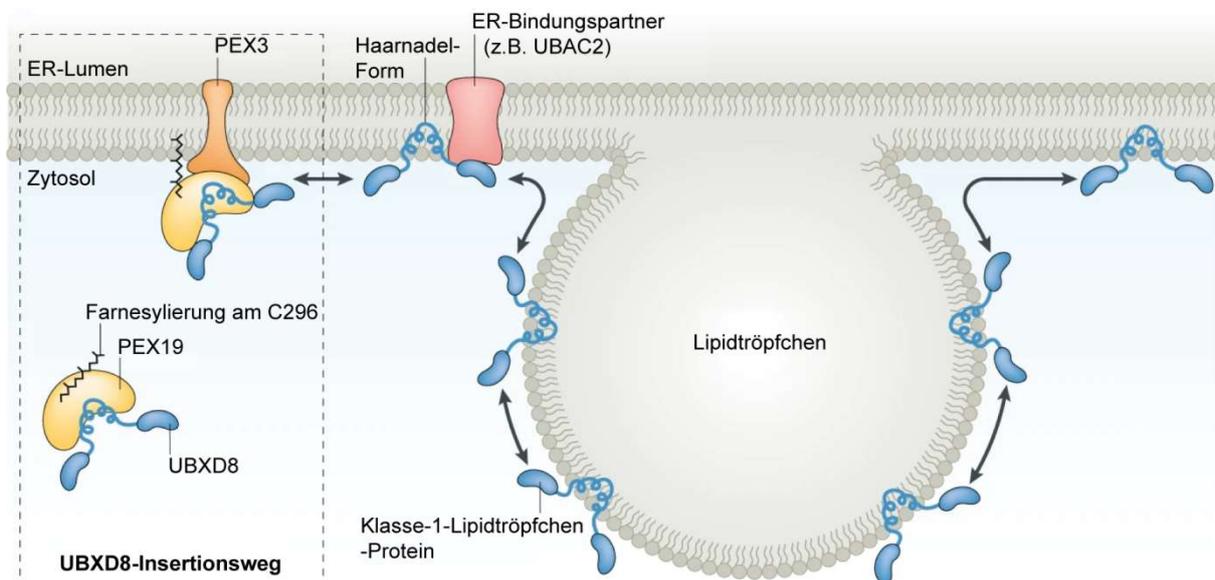


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines aus dem ER entstehenden Lipidtröpfchens (LT). Das entstehende LT schnürt sich von der ER-Membran ab. Klasse-1-LT-Proteine werden dabei zunächst in die ER-Membran inseriert bevor sie von der ER-Membran auf die Phospholipid-Einzelschicht des LT translozieren. Für das Klasse-1-LT-Protein UBXD8 (*Ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein 8*), konnte gezeigt werden, dass die Insertion in die ER-Membran von einem löslichen farnesylierten PEX19 (gelb) und membranständigen PEX3 (orange) abhängt. Die Farnesylierung von PEX19 findet am Cystein 296 statt. ER, Endoplasmatisches Retikulum; UBAC2, *Ubiquitin-associated domain-containing protein 2*. (Verändert nach Olzmann und Carvalho, 2019).

2.1.5. PEX19-abhängiger Transport von Lipidtröpfchen-Proteinen

In früheren Arbeiten von Schrul und Kopito wurde die Frage adressiert, wie Haarnadel-Proteine in die ER-Membran und nachfolgend in LT-Membranen transportiert und inseriert werden [151]. Während die meisten zu sezernierenden Proteine und auch Transmembranproteine mittels eines Signalerkennungspartikels (SRP) zum ER gelangen,

um dort co-translational durch den Sec61-Kanal ins ER-Lumen zu translozieren bzw. in die ER-Membran zu inserieren [10,137], wurde für das Haarnadel-Protein UBXD8 ein anderer SRP-unabhängiger Lokalisationsweg identifiziert [151]. Mithilfe einer PEX19-*knockout* Zelllinie und einem PEX3-*knockdown* ließen sich diese beiden Proteine als essentiell für eine korrekte Insertion von UBXD8 in ER-Domänen und anschließender Lokalisation zu LT nachweisen [151]. Bis dato waren diese beiden PEX-Proteine lediglich als Peroxisomen-spezifische Peroxine bekannt und für die peroxisomale Biogenese und den Import von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) als essentiell beschrieben [55,152]. Eine Deletion von PEX19 [112], PEX3 [156] oder PEX16 [69] führt zu einem vollständigen Fehlen von Peroxisomen. Kohärent dazu, sind für Mutationen in diesen drei PEX-Proteinen auch die schwersten klinischen Manifestationen des Zellweger-Syndroms beschrieben [54]. In weitergehenden Untersuchungen zu PEX19 und dessen Transportfunktion für UBXD8 wurde eine bereits bekannte Farnesylierung am C-Terminus von PEX19 näher untersucht. Während bereits gezeigt werden konnte, dass diese Farnesylierung für die Biogenese von Peroxisomen nicht essentiell ist [171], spielt sie doch eine entscheidende Rolle für die Lokalisierung von UBXD8 im ER und auf LT, wie in Abbildung 3 veranschaulicht [151].

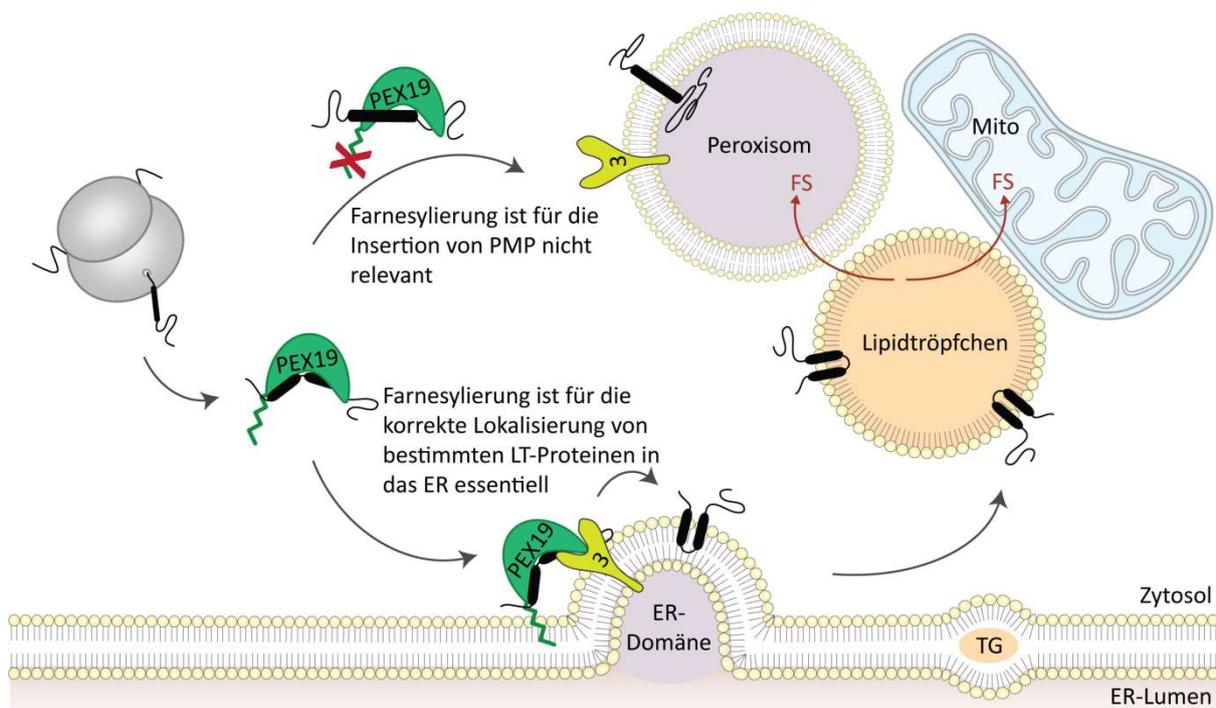


Abbildung 3: Das zytosolische PEX19 (grün) und das membrangebundene PEX3 („3“, gelb) sind für die Zielsteuerung von peroxisomalen Membranproteinen (PMP) und von LT-Proteinen essentiell. Während die PEX19-Farnesylierung für die Insertion von PMP in Peroxisomen nicht essentiell ist, ist die Farnesylierung notwendig, um bestimmte LT-Proteine in ER-Subdomänen zu inserieren und deren Lokalisation zu LT zu gewähren. ER, Endoplasmatisches Retikulum; FS, Fettsäuren; LT, Lipidtröpfchen; Mito, Mitochondrium; TG, Triacylglycerole. (Verändert nach Schrul und Schliebs, 2018).

Um die Funktion der Farnesylierung an PEX19 für die subzelluläre Lokalisation von LT-Proteinen zu untersuchen, wurde mittels CRISPR/Cas9 zunächst eine PEX19-*knockout*-Zelllinie (PEX19^{-/-}) aus einer HeLa Kyoto-Wildtyp-Zelllinie (WT) generiert [151]. Anschließend wurde in die PEX19^{-/-}-Zelllinie ein Gen zur Codierung einer nicht mehr farnesylierungsfähigen PEX19-Variante stabil eingebracht. Die Farnesylierungsdefizienz der PEX19-Variante beruht hierbei auf der Substitution von Cystein gegen Serin an Position 296, weshalb die Zelllinie als PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} bezeichnet wird. Damit exprimiert die PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ausschließlich farnesylierungsdefizientes PEX19-Protein [151]. Tabelle 1 fasst die wichtigsten Charakteristika der generierten Zelllinien zusammen. Während in der PEX19^{-/-}-Zelllinie Peroxisomen vollständig fehlen, lässt sich in der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie der peroxisomale Phänotyp retten und Peroxisomen nachweisen [151]. Bezogen auf das LT-Proteom gelangt UBXD8 mit der farnesylierungsdefizienten PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nicht mehr auf LT [151].

Tabelle 1: Zusammenfassung der PEX19-abhängigen Charakteristika der von Schrul und Kopito (2016) generierten Zelllinien. Dargestellt sind die HeLa WT-, die PEX19^{-/-}- sowie die PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit entsprechend skizzierten PEX19-Protein (grün) mit Cargo (schwarz). Das rote Kreuz bei PEX19^{-/-} kennzeichnet das vollständige Fehlen des PEX19, während es bei PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} die Farnesylierungsdefizienz markiert. Die WT-Zelllinie hat Peroxisomen und ein nicht verändertes LT-Proteom. In der PEX19^{-/-}-Zelllinie fehlen Peroxisomen sowie einen Teil der Proteine auf LT. Während Peroxisomen in der PEX19^{-/-}-Zelllinie wieder nachweisbar sind, bleibt das LT-Proteom aufgrund der fehlenden Farnesylierung verändert. LT, Lipidtröpfchen.

Zelllinie	WT	PEX19 ^{-/-}	PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S}
PEX19 Schema			
Peroxisomen	+	-	+
Lipidtröpfchen-Proteom	unverändert	verändert	verändert

Weitere unveröffentlichte massenspektrometrische Daten der AG Schrul einer PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zu WT-Zellen implizieren, dass nicht nur die korrekte Lokalisierung von UBXD8 auf LT von der Farnesylierung von PEX19 abhängen, sondern auch die weiteren ca. 30 LT-Proteine, die aktuell noch in der AG Schrul validiert werden (Abbildung 3).

In weiteren Vorarbeiten wurde die Abbaugeschwindigkeit von LT fluoreszenzmikroskopisch mithilfe eines Neutrallipidfarbstoffes, welches die Neutrallipide innerhalb des LT-Kerns

anfärbt, untersucht. Im Vergleich von der PEX19^{-/-}- und der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit der WT-Zelllinie konnte ein verzögerter Abbau der LT beobachtet werden, was auf eine eingeschränkte Lipolyse in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 schließen lässt (AG Schrul, unveröffentlicht).

2.2. Ca²⁺-Homöostase

2.2.1. Ca²⁺ als second messenger

Ca²⁺ ist das am häufigsten im Körper vorkommende Ion, wobei es hauptsächlich in kristalliner Form als Hydroxylapatit in den Knochen gespeichert wird [133]. Doch neben dieser Funktion als Strukturmolekül konnte bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts von Ringer gezeigt werden, dass es auch für die Kontraktion des Herzens notwendig ist [140]. Heute ist klar, dass Ca²⁺ ein sehr wichtiges Signalmolekül für eine Vielzahl von zellulären und physiologischen Prozessen darstellt, darunter Muskelkontraktion, Exozytose, Genexpression, enzymatische Aktivität, Immunantwort und Zelltod [84,193]. Die Zelle hält große Konzentrationsunterschiede an Ca²⁺ zwischen den einzelnen Kompartimenten sowie dem Extrazellulärraum aufrecht und investiert dafür viel Energie. Zwischen den beiden größten Kompartimenten Zytosol und Extrazellulärraum besteht ein Konzentrationsgradient, der mit ~100 nM freiem Ca²⁺ im Zytosol und einer 20.000-fach höheren Konzentration extrazellulär besonders groß ausfällt [42,132]. Um diese Ca²⁺-Homöostase aufrechtzuerhalten und gleichzeitig dynamische Ca²⁺-Ausströme zu ermöglichen, verfügen Zellen, wie in Abbildung 4 gezeigt, über zahlreiche Ca²⁺-regulierende Proteine. Die Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erfolgt dabei über eine koordinierte und induzierbare Aktivität von Proteinen, die Ca²⁺ in oder aus bestimmten Kompartimenten pumpen können [8].

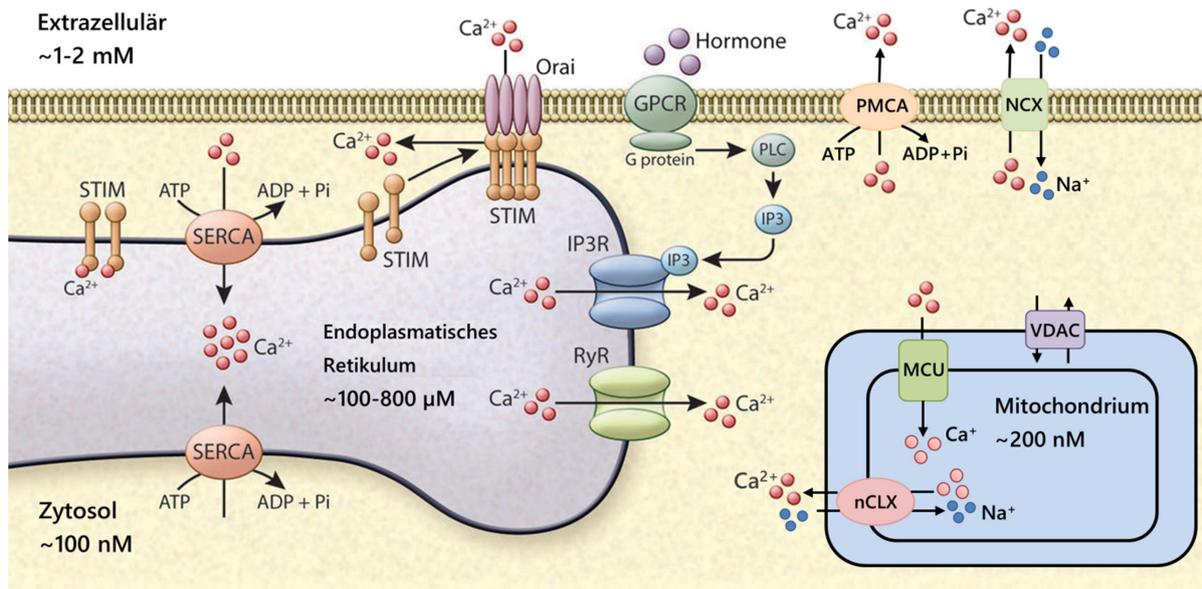


Abbildung 4: Schematische Darstellung der an der zellulären Ca^{2+} -Homöostase beteiligten Transporter und Kanäle. Zwischen den verschiedenen Kompartimenten einer Zelle sowie dem Extrazellulärraum werden große Konzentrationsunterschiede aufrechterhalten. An der Aufrechterhaltung ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, welche hier schematisch ihren entsprechenden Lokalisationen in der Zelle zugeteilt worden sind. Im ER dient die ATP-abhängige SERCA-Pumpe der Wiederherstellung der Ca^{2+} -Homöostase nach kontrolliertem Efflux von Ca^{2+} durch IP₃-Rezeptoren und Ryanodin-Rezeptoren aus dem ER ins Zytosol sowie dem Ausgleich des kontinuierlichen Leck-Ausstroms von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol. Bei einem Abfall der Ca^{2+} -Konzentration im ER dissoziieren Ca^{2+} von den STIM-Proteinen. Diese oligomerisieren und translozieren entlang der ER-Membran zu Plasmamembran-ständigen Orai-Kanälen. Dort angekommen aktivieren STIM-Proteine die Orai-Kanäle und es kommt zu einem Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol und folglich durch SERCA ins ER. Daneben pumpen Ca^{2+} -Clearance Kanäle, wie PMCA und NCX, exzessive Ca^{2+} -Konzentrationen aus dem Zytosol aus der Zelle. Da Mitochondrien nach dem ER den potentiell zweitgrößten Ca^{2+} -Speicher einer Zelle repräsentieren, verfügen sie über eine eigene Proteinmaschinerie zur Ca^{2+} -Regulation. Diese umfasst das nicht Ca^{2+} -spezifische VDAC in der äußeren Membran sowie die Ca^{2+} -spezifischen Transporter MCU und nCLX in der inneren mitochondrialen Membran. SERCA, *Sarco/Endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase; IP₃R, Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP₃)-Rezeptor; RyR, Ryanodin-Rezeptor; PMCA, *Plasma membrane* Ca^{2+} ATPase; NCX, Natrium- Ca^{2+} exchanger; STIM, *Stromal interaction molecule*; VDAC, *Voltage dependent anion channel*; MCU, *Mitochondrial* Ca^{2+} uniporter; nCLX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger; ATP, Adenosintriphosphat; ADP, Adenosindiphosphat; Pi, Monophosphat. (Verändert nach Arruda und Hotamisligil, 2015).

2.2.2. Ca^{2+} -Clearance

Unter dem Begriff Ca^{2+} -Clearance versteht man den Transport von überschüssigem Ca^{2+} aus dem Zytosol in andere Kompartimente der Zelle oder in den Extrazellulärraum [78]. Diesem Prozess wird eine hohe physiologische Relevanz zuteil, da exzessive Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} -gesteuerte Signalwege stören und bis hin zum Zelltod führen können [32,128]. Für die Aufrechterhaltung der physiologisch niedrigen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von ~100 nM im Rahmen der Ca^{2+} -Clearance zeichnen sich in erster Linie zwei ATP-abhängige

Transporter und zwei Antiporter verantwortlich [32,193]. Einer der ATP-abhängigen Transporter ist SERCA (*Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*), welches in der ER-Membran lokalisiert ist und Ca²⁺ aus dem Zytosol ins ER befördert [84,193]. Da im nächsten Abschnitt genauer auf die ER-Ca²⁺-Homöostase und SERCA eingegangen wird, wird an dieser Stelle näher auf die in der Plasma-Membran lokalisierten Proteine zur Ca²⁺-Clearance eingegangen, die den ATP-abhängigen Transporter PMCA sowie die beiden Antiporter NCX und NCKX umfassen. Dabei kommt der ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimierten PMCA (*Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) eine ähnliche Rolle wie SERCA zu, allerdings transportiert die PMCA Ca²⁺ aus dem Zytosol über die Plasmamembran in den Extrazellularraum [148,172,193]. Die gleiche Transportrichtung für Ca²⁺ weisen die beiden Transporter NCX (*Natrium-Ca²⁺ exchanger*), wie in Abbildung 4 gezeigt, und NCKX (*Natrium-Ca²⁺-Kalium exchanger*) auf, wobei NCKX neben einem Ca²⁺ zusätzlich ein Kalium-Ion aus der Zelle befördert [155].

Für den Transport von Ca²⁺ aus dem Zytosol in den Extrazellularraum muss dieses entgegen seines Konzentrationsgefälles transportiert werden. Während PMCA die erforderliche Energie aus der ATP-Spaltung bezieht, nutzen NCX und NCKX den bestehenden Natrium-Konzentrationsgradienten zum Transport. Doch noch andere ganz entscheidende Eigenschaften unterscheiden PMCA von den beiden Antiportern NCX und NCKX und zwar die Affinität sowie die Transportkapazität [193]. So hat PMCA mit einem Km-Wert_[Ca²⁺] von 0,2-0,5 µmol/L die deutlich höhere Affinität für Ca²⁺ im Vergleich zu den Transportern NCKX und NCX, letzterer hat einen Km-Wert_[Ca²⁺] von 1-10 µmol/L [128]. Auf der anderen Seite ist die Transportkapazität von PMCA relativ gering und die der Transporter sehr hoch [193]. Damit erscheinen die Transporter eher für die schnelle Depletion von exzessiv hohen zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen verantwortlich zu sein, wohingegen PMCA und auch SERCA, beide mit hohen Affinitäten für Ca²⁺, den Hauptteil der Ca²⁺-Clearance leisten [76,78].

2.2.3. Ca²⁺-Kanäle des ER

Das ER ist mit einer lumenalen Ca²⁺-Konzentration von bis zu 1,5 mM der größte intrazelluläre Ca²⁺-Speicher der Zelle [168]. Zur Aufrechterhaltung dieser hohen Ca²⁺-Konzentration verfügt das ER über die ATP-abhängige SERCA, die analog zu PMCA, eine hohe Affinität für Ca²⁺ aufweist [168]. Daneben erfordert die ER-Ca²⁺-Homöostase aber auch lumenale Proteine zur Ca²⁺-Speicherung sowie kontrollierbare Ca²⁺-Efflux-Proteine. Calsequestrin, Calreticulin und BiP stellen wichtige Ca²⁺-speichernde Proteine im Lumen des ER dar [84]. Sie senken die freie Ca²⁺-Konzentration, wodurch Präzipitationen von

Calciumphosphaten vermieden werden, und können aber gleichzeitig in kürzester Zeit große Mengen an Ca^{2+} freigegeben [115,133]. Im ER erfolgt die Synthese, Modifikation und Faltung von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen [137]. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Faltungskapazität, akkumulieren fehlgefaltete Proteine, es kommt zu ER-Stress und schließlich zur Aktivierung der UPR (*Unfolded Protein Response*) [173]. Bei längerer Aktivierung der UPR führt diese zur Apoptose [173]. Schon bei zahlreichen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei einigen Typen von Diabetes mellitus, konnte eine reduzierte Ca^{2+} -Konzentration im ER, die ebenfalls zu ER-Stress führt, für die UPR-induzierte Apoptose Insulin-sezernierender β -Zellen des Pankreas verantwortlich gemacht werden [115].

Die Hauptefflux-Wege von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol erfolgen über den vor allem in Muskelzellen und Neuronen nachweisbaren Ryanodin-Rezeptor sowie über den ubiquitär exprimierten Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP_3)-Rezeptor. Bei letzterem kommt es nach Bindung eines extrazellulären Agonisten zur intrazellulären IP_3 -Bildung, so dass IP_3 durch direkte Bindung an den IP_3 -Rezeptor dessen Öffnung induziert und ein Ca^{2+} -Ausstrom ins Zytosol erfolgt [84,115]. Daneben gibt es einen kontinuierlichen Ca^{2+} -Leck aus dem ER ins Zytosol durch Ca^{2+} -permeable Kanäle im ER, wie zum Beispiel Sec61 [91]. Neben der Auffüllung des ER nach induziertem Ca^{2+} -Efflux durch IP_3 - oder Ryanodin-Rezeptoren arbeitet die SERCA daher auch kontinuierlich diesem passiven ER- Ca^{2+} -Leck entgegen [91].

Ein wichtiger Mechanismus zur Wiederherstellung der ER- Ca^{2+} -Homöostase nach Ca^{2+} -Efflux aus dem ER ist der SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*). Bei diesem kommt es nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER zum Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Eine wichtige Schlüsselrolle nehmen dabei die homologen ER-Proteine STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*) und STIM2 (*Stromal interaction molecule 2*) ein, wobei in den meisten Geweben STIM1 stärker exprimiert wird als STIM2 [159]. STIM-Proteine verfügen an ihrer luminal gelegenen N-terminalen Domäne über Ca^{2+} -bindende EF-Hand Domänen, welche als Ca^{2+} -Sensoren fungieren. Unter basalen Ca^{2+} -Konzentrationen im ER ($\sim 400 \mu\text{M}$) ist Ca^{2+} an die EF-Hand Domänen gebunden und die STIM-Proteine liegen, vermutlich in dimerisierter Form, verteilt über die ganze ER-Membran vor. Ein Ca^{2+} -Efflux aus dem ER führt nun zu einer Dissoziation des Ca^{2+} von den EF-Hand Domänen der STIM-Proteine, woraufhin diese schnell oligomerisieren und entlang der ER-Membran zu sogenannten ER-Plasma-Membran-Kontaktseiten translozieren. Dort aktivieren sie Ca^{2+} -selektive Orai-Kanäle der Plasma-Membran, welche zu einem Einstrom von Ca^{2+} ins Zytoplasma führen. Von dort aus kann Ca^{2+} dann durch SERCA ins ER transportiert werden und die Ca^{2+} -Homöostase lässt sich wiederherstellen [134,159].

Ein potenter und zugleich irreversibler Hemmer der SERCA-Pumpe stellt das Sesquiterpenlacton Thapsigargin dar [5], welches eine Aktivierung des SOCE induziert [73]. Der Name leitet sich von seinem natürlichen Vorkommen in den Wurzeln und Früchten der Pflanze *Thapsia garganica* L. ab, die auch als tödliche Karotte bekannt ist [5]. Eine potentielle Nutzung von Thapsigargin als Chemotherapeutikum wird aufgrund seiner Apoptose-induzierenden Wirkung zur Zeit in Form der Vorstufe Mipsagargin (G-202) erprobt [5].

2.2.4. Die Bedeutung der Nicht-ER- Ca^{2+} Speicher für die Ca^{2+} -Homöostase

Auch wenn das ER als Hauptspeicher von Ca^{2+} in der Zelle dient, partizipieren auch die meisten anderen Organellen in der Ca^{2+} -Homöostase und damit auch in Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen. Insbesondere für Mitochondrien konnte bereits in den 1960er Jahren eine Ca^{2+} -Aufnahme gezeigt werden [44]. Zunächst passiert Ca^{2+} die äußere Membran von Mitochondrien durch VDAC (*Voltage dependent anion channel*), welches nicht spezifisch für Ca^{2+} ist und den Durchtritt von bis zu 5 kDa großen Molekülen erlaubt. Für den Einstrom von Ca^{2+} in die Mitochondrienmatrix durch MCU (*Mitochondrial Ca^{2+} uniporter*) in der inneren mitochondrialen Membran ist allein der bestehende elektrische Gradient durch die negativ geladene mitochondriale Matrix ausreichend [193]. Daneben stehen Effluxsysteme für überschüssiges mitochondriales Ca^{2+} zur Verfügung. In erregbaren Zellen kann Ca^{2+} über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter aus der Matrix transportiert werden, wohingegen in nicht-erregbaren Zellen ein $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter diese Aufgabe übernimmt [8,127]. Aufgrund der niedrigeren Ca^{2+} -Affinität der darin involvierten Transporter wurde der Ca^{2+} -Aufnahme in Mitochondrien lange Zeit lediglich eine Rolle in pathophysiologischen Zuständen bei Ca^{2+} -Überladung zugeschrieben [44]. Doch inzwischen ist bekannt, dass Ca^{2+} die Aktivität mitochondrialer Proteine, welche in den Citrat-Zyklus involviert sind, modulieren und so Einfluss auf die ATP-Syntheserate nehmen kann. Darüber hinaus konnte die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration auch als Schlüsselement zur Cytochrom C induzierten Apoptose identifiziert werden [44,70]. Da in Mitochondrien Ca^{2+} -Konzentrationen von bis zu mehreren 100 μM nach Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration gemessen werden konnten, ist Ca^{2+} nicht nur für die mitochondriale Funktion wichtig, sondern Mitochondrien wirken selber auch als dynamische Ca^{2+} -Puffer der Zelle und sind somit direkt in die Ca^{2+} -Homöostase involviert [8,44].

Neben ihrer Funktion in der α - und β -Oxidation von Fettsäuren, der Synthese von Gallensalzen und Phospholipiden und dem Abbau von beispielsweise Prostaglandinen, können Peroxisomen zusätzlich die Ca^{2+} -Homöostase beeinflussen [176]. In diesem

Zusammenhang konnte bereits eine membrangebundene Ca^{2+} -ATPase in Peroxisomen nachgewiesen werden [138]. Mithilfe peroxisomal lokalisierender Ca^{2+} -Reporter wurde im Lumen von Peroxisomen eine 20-fach höhere basale Ca^{2+} -Konzentration als im Zytosol gemessen [92]. Nach Stimulierung eines Ca^{2+} -Efflux aus dem ER durch Aktivierung des IP_3 -Signalweges konnten in Peroxisomen Ca^{2+} -Konzentrationen von bis zu 100 μM gemessen werden [92]. Allerdings ist die Datenlage hier inkonsistent, da eine andere Studie im Vergleich zum Zytosol keine höheren Ca^{2+} -Konzentrationen im Lumen von Peroxisomen nachweisen konnte und auch nach Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nur sehr langsame Anstiege der peroxisomalen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet wurden [48]. Aufgrund der Tatsache, dass Peroxisomen jedoch nur geringe Anteile des Zellvolumens einnehmen, gilt eine Funktion als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher als unwahrscheinlich, stattdessen muss der Effekt von Ca^{2+} auf die peroxisomale Funktion weiter erforscht werden [92].

Über LT als potentielle Ca^{2+} -Puffer der Zelle ist wenig bekannt. Eine Studie von Barba *et al.* konnte jedoch zeigen, dass in Kardiomyozyten nach stimulierter Ischämie-Reperfusion eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in Zellarealen mit LT nachgewiesen werden konnte [11]. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass ein protektiver Effekt von LT vor dem Zelltod, auf einer Reduzierung von potentiell toxisch hohen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen beruht. Zudem konnte in neuroepithelialen Zellen während der Neuralrohrbildung eine Ca^{2+} -Akkumulation in LT festgestellt werden, was möglicherweise eine wichtige Funktion als intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher in diesen Zellen darstellt [33]. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} die LT-Homöostase beeinflusst, was im nächsten Abschnitt ausführlicher behandelt wird.

2.2.5. Die Rolle von Ca^{2+} in der Lipidtröpfchen-Homöostase

Wie eingangs erwähnt, stellt die Berardinelli-Seip kongenitale Lipodystrophie 2 (BSCL2) einer der schwersten Lipodystrophien dar, einhergehend mit einem fast vollständigen Verlust von Fettgewebe, Hyperlipidämie, Diabetes, muskulärer Hypotonie und Ausbildung einer Leberzirrhose [62]. Verursacht wird sie durch Mutationen im Seipin [103], welches ein integrales ER-Membran-Protein ist [102]. Bi *et al.* konnten zeigen, dass Seipin sowohl in *Drosophila* als auch in humanen Zellen in der Lage ist, direkt an SERCA zu binden und so potentiell modulierende Wirkung möglich macht. Dabei ließ sich die Bindung von Seipin an SERCA durch eine Mutation von Alanin an Position 212 in der Schleifenregion von Seipin, was in einigen BSCL2-Patienten der Fall ist, komplett aufheben. Auf funktionaler Ebene führte dies zumindest in *Drosophila* zu einer stark reduzierten SERCA-Aktivität, so dass es auf der einen Seite zu einer erniedrigten Ca^{2+} -Konzentration im ER und auf der anderen

Seite durch erhöhte STIM-Aktivität zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kam. Dies resultierte in *Drosophila* passend zum Phänotyp der BSCL2 im Menschen in einer reduzierten Lipogenese bei gleichzeitig verstärkter β -Oxidation [21].

Der Lipidmetabolismus wird jedoch nicht nur durch eine Veränderung der ER- Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass der SOCE den Lipidmetabolismus kontrolliert [113]. Eine Krankheit, die zum Fehlen des SOCE in allen Geweben führt, ist die autosomal-rezessive CRAC Kanalopathie, die zu einer schweren Immundefizienz verbunden mit ektodermaler Dysplasie und muskulärer Hypotonie führt [88]. In Zellen von Patienten mit einer CRAC Kanalopathie konnten Maus *et al.* eine erhöhte Anzahl von LT im Vergleich zu Zellen von gesunden Menschen nachweisen. Darüber hinaus konnte eine reduzierte Fettsäureoxidation durch eine verminderte Expression mitochondrialer Schlüsselenzyme für die Fettsäureoxidation, wie beispielsweise der Acyl-CoA Dehydrogenase, nachgewiesen werden. Eine gestörte Lipolyse aufgrund einer verminderten Aktivität der Hormon-sensitiven Lipase (HSL) konnte auf SOCE als Initiator des aktivierenden Signalweges für die HSL zurückgeführt werden. So kontrolliert zytosolisches Ca^{2+} die Aktivität von Plasmamembran-assoziierten Adenylylcyclasen, welche cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) generieren. Das cAMP steuert die Aktivität der Proteinkinase A, die schließlich unter anderem die HSL durch Phosphorylierung aktiviert [113].

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Akkumulation von LT in Hepatozyten zu einem verminderten SOCE und reduzierter Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt [182]. Als die wahrscheinlichste Ursache für die Inhibierung des SOCE ließ sich eine Aktivierung der Proteinkinase C nachweisen, welche Orai1 phosphorylieren und so ein direkt in den SOCE involviertes Protein in seiner Aktivität reduzieren kann [182].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nicht nur die ER- Ca^{2+} -Konzentration, sondern auch der SOCE die LT-Homöostase beeinflusst. Zudem kann auch eine Akkumulation von LT zu einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase führen.

2.3. Zielstellung der Arbeit

Metabolische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus oder Atherosklerose, stellen weltweit Erkrankungen mit immer höherer Prävalenz dar [49] und werden unter anderem mit einer dysregulierten LT-Homöostase assoziiert [124]. Trotz dieser Schlüsselrolle in vielen Pathologien, ist die vollständige Regulation der Lipogenese und Lipolyse von LT noch unverstanden. Studien konnten einen direkten Zusammenhang zwischen einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase und einer gestörten LT-Biogenese, einhergehend mit einer veränderten Lipolyse, aufzeigen [21,113,182]. Ferner konnte eine direkte Interaktion des für die Biogenese von LT wichtigen Seipins mit dem für die Ca^{2+} -Homöostase des ER verantwortlichen SERCA nachgewiesen werden [21]. PEX19 ist für die korrekte Lokalisation einiger LT-Proteine essentiell [151] und vorläufige Daten deuten darauf hin, dass Zellen ohne PEX19 mehr Triacylglycerole in LT speichern. Ob es einen Zusammenhang zwischen PEX19-Funktionen und Ca^{2+} -Homöostase gibt ist ungeklärt.

Das Hauptziel bestand darin zu untersuchen, ob PEX19-vermittelte Funktionen Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase haben. Dazu sollten bereits etablierte PEX19^{-/-} Zellen im Vergleich zu Wildtyp-HeLa-Zelllinien mittels Fura-2 basierter Ca^{2+} -Bildgebung untersucht werden. Um zu unterscheiden ob etwaige Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase auf dem Fehlen von Peroxisomen oder einer Veränderung des LT-Proteoms beruhen wurden zusätzlich PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Zellen, in denen die Peroxisomenbiogenese wiederhergestellt ist, untersucht [151]. Effekte, die durch ein verändertes PEX19-abhängiges LT-Proteom verursacht werden, sollten vor allem unter metabolischen Bedingungen, die eine vermehrte Bildung von LT zur Folge haben, zum Tragen kommen. Deshalb sollten alle Ca^{2+} -Messungen auch nach Zugabe von Oleat zu den Zellen durchgeführt werden [95]. Zunächst sollte getestet werden, ob die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration verändert ist. Weitere Messungen sollten das ER- Ca^{2+} -Leck, den SOCE sowie vom ER unabhängige intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher untersuchen. Ergänzend zu dem Fura-2-AM basierten Messverfahren sollte auch der Einsatz von Organell-spezifischen Ca^{2+} -Reportern erfolgen. Da Mitochondrien Fettsäuren metabolisieren und somit direkt im Lipidmetabolismus involviert sind und direkte Kontakte zu LT aufbauen können [191], sollten die mitochondrialen Ca^{2+} -Level mithilfe mitochondrialer Ca^{2+} -Reporter näher untersucht werden. Schließlich sollte die Abundanz von verschiedenen Transportern und Kanälen der Ca^{2+} -Homöostase auf Proteinebene mittels Immunoblot quantifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit sollte durch systematische Analyse des Ca^{2+} -Haushaltes neue Erkenntnisse bei der Charakterisierung PEX19-abhängiger Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase gewinnen. Damit sollte ein wichtiger Schritt zur möglichen und bisher noch nicht gezeigten Involvierung vom PEX19-abhängigen LT-Proteom in die Ca^{2+} -Homöostase gemacht werden, um so potentiell Kandidaten für zukünftige weitere medikamentöse Angriffspunkte für die immer höhere Prävalenz von metabolischen Erkrankungen zu eruieren.

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien

Humane Cervixkarzinom Epithelzellen (HeLa-Zellen)

Im Jahre 1951 gelang es, mit den HeLa-Zellen die erste potentiell unsterbliche humane Zelllinie zu etablieren [59]. Sie entstammten einer Gewebeprobe aus der Patientin Henrietta Lacks, welche ihrerseits an einer aggressiven Form eines Cervixkarzinoms erkrankt war. Die Abkürzung HeLa stellt eine Abkürzung aus ihrem Namen dar. Histopathologische Untersuchungen ergaben, dass es sich bei den entarteten Zellen um eine seltene Art eines Adenokarzinoms handelte [100,111].

Die Entartung wurde unter anderem durch eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) 18 induziert. Eine Infektion mit HPV 18 führt zur Expression zweier Onkoproteine, E6 und E7. Das Onkoprotein E7 führt dabei zum Fortschreiten des Zellzyklus, indem es die Funktion von Proteinen der Retinoblastomfamilie stört. Die Apoptose wird durch Bindung des Onkoproteins E6 an p53 inhibiert [66,100]. HeLa-Zellen sind die weltweit am häufigsten genutzte Zelllinie [90], nicht zuletzt bedingt durch ihr einfaches Kultivierungsverhalten. So teilen sich HeLa-Zellen etwa alle 24 h und benötigen alle 2-4 Tage eine Passagierung.

Bei denen in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um HeLa-Zellen der Kyoto-Zelllinie, genauer um eine wildtypische Zelllinie, eine PEX19^{-/-}-Zelllinie und zwei Klone einer PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Letztere exprimiert ausschließlich farnesylierungsdefizientes PEX19 [151].

Die nachfolgende Tabelle listet die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zelllinien auf. Die HeLa-Zelllinien beruhen auf einem *knockout* von PEX19 sowie spontaner Integration einer farnesylierungsdefizienten PEX19-Genvariante ins Genom [151].

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Name	Zelllinienname	PEX19-Genotyp	Herkunft
HeLa WT	HeLa Kyoto	wildtypisch	AG Schrul
HeLa PEX19 ^{-/-}	HeLa Kyoto	deletiert	AG Schrul
HeLa PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} Kl. 15	HeLa Kyoto	Verändertes <i>PEX19</i> -Gen (G887C) eingebracht, resultiert in Expression eines farnesylierungsdefizienten PEX19 _{C296S}	AG Schrul
HeLa PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} Kl. 19	HeLa Kyoto	Verändertes <i>PEX19</i> -Gen (G887C) eingebracht, resultiert in Expression eines farnesylierungsdefizienten PEX19 _{C296S}	AG Schrul

3.1.2. Bakterienstamm

Die nachfolgende Tabelle listet den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stamm zur Transformation von Pericam MT auf.

Tabelle 3: Übersicht über den verwendeten Bakterienstamm.

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5α	F'φΦ/lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 <i>recA</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen

3.1.3. Kits, Chemikalien und Geräte

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits.

Kits	Hersteller
HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Bezugsquelle
1 x PBS (pH 7,2)	Thermo Fisher Scientific (Katalognummer: 11530546)
10 x PBS (pH 7,4)	Thermo Fisher Scientific (Ref.: 70013-026; LOT.: 1908885)
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG
30% Acrylamid, 37,5:1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agar	FORMEDIUM™
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG
BSA	Sigma-Aldrich (Katalognummer: A7906-100g; LOT.: SLBT8252)
BSA, fettsäurefrei	Sigma-Aldrich (Katalognummer: A6003-10g; LOT.: SLCB1005)
93% Calciumchlorid, anhydriert	Alfa Aesar
<i>Complete EDTA-free protease inhibitor</i>	Hoffmann-La Roche AG
DMEM	Thermo Fisher Scientific (Katalognummer: 11594486)
DTT	Carl Roth GmbH + Co. KG
99% EGTA	Carl Roth GmbH + Co. KG
Eindeckmedium Fluoromount G	Electron Microscopy Science (Katalognummer: 17984-25)

mind. 99,8% Ethanol	Sigma Aldrich (Cat# 32205)
99% Ethanol, vergällt mit 1% PE	Biesterfeld Spezialchemie GmbH
FBS	Invitrogen AG (Katalognummer: S 0115; LOT-Nummer: 0054 B)
Fura-2-AM	Invitrogen AG (Katalognummer: F1221)
Glukose, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG
H ₂ O, UltraPure	Invitrogen AG
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG
HEPES	VWR International
Hoechst-Farbstoff	Thermo Fisher Scientific (Cat# H1399)
Ionomycin, Calciumsalz	Life Technologies (REF: 124222; LOT.: 1702558)
Isopropanol	VWR International
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art.-Nr. X968.3)
Magermilchpulver	Sucofin®
Magnesiumdichlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Methanol	Thermo Fisher Scientific
MitoTracker® RedCMXRos	Hoffmann-La Roche AG
Natriumchlorid	VWR International
Natriumoleat	Sigma-Aldrich (Katalognummer: O7501-5G)
PEI ~25 kDa	Polysciences (Katalognummer: 23966-2; LOT.:696676)
16% PFA	Science Services GmbH (Bestellnummer: E15710-S)

Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ≥ 98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
PMSF	Carl Roth GmbH + Co. KG (Katalognummer: 6367.1)
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG
<i>Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Katalognummer: 1610373)
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sulfosalicylsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG
Thapsigargin	Invitrogen AG (Katalognummer: T7459)
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich
TRIS	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100	Thermo Fisher Scientific (Katalognummer: 9002-93-1; LOT.: 166791)
0,05% Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific (Katalognummer: 11580526)
Trypton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tween-20	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Geräte und Materialien.

Geräte und Materialien	Bezugsquelle
96-Well-Zellkulturschale, 6-Well-Zellkulturschale	SARSTEDT AG & Co. KG
Absaugung IBS Integra VACUBOY (Zellkultur)	Integra Biosciences™
Absaugung, unsteril (Labor)	Integra Biosciences™
VC8 ³ Valve Commander	ALA Scientific Instruments, Inc.
APC Back-UPS 1400 VA	Schneider Electric GmbH
Attofluor™ Cell Chamber	Thermo Fisher Scientific
Blockheizgerät SBH200DL	stuart®
Blottingpapier	VWR International

Brutschrank HERA cell 150 (Zellkultur)	Heraeus Holding GmbH
Colibri Controller	Carl Zeiss AG
Deckgläser 25 mm # 1,5	Menzel-Gläser
Dual digital CCD camera ORCA-D2	Hamamatsu Photonics K.K.
Einmalimpföse	Greiner Bio-One
Einmalküvette	SARSTEDT AG & Co. KG
Entwicklungsbehälter für Immunoblots	LI-COR Biosciences GmbH
Falcon 15 ml; 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Feinwaage ALS 120-4	KERN & SOHN GmbH
Filter Fura-2 424931	Carl Zeiss AG
Filter Nr. 46 HE (für Pericam MT)	Carl Zeiss AG
Filter Nr. 54 HE (für D3cpv)	Carl Zeiss AG
Filter Visitron (340/26 BrightLine HC, 387/11 BrightLine HC)	AHF Analysentechnik AG
Filter Visitron (T510/80m)	Chroma Technology GmbH
Gelkamm	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Gilson Pipetten 1000 µl; 200 µl; 20 µl; 10 µl, 2 µl	Gilson®
Glasschraubflaschen	Schott AG
Hamilton Spritze SYR 50 µl	Hamilton Company
Heating Unit XL S	Carl Zeiss AG
Innova 42 - Inkubator für Mikroorganismen	New Brunswick Scientific
Inverses Fluoreszenzmikroskop Visitron	Carl Zeiss AG
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axio A1	Carl Zeiss AG
Inverses Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Carl Zeiss AG
Inverses Fluoreszenzmikroskop Leica DMI8	Leica Kamera
Kamera (Seriennummer: 255183)	Visitron Systems GmbH
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Laufkammer MiniProtean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc.
LI-COR Odyssey	LI-COR Biosciences GmbH
Magnetrührer RCT basic	IKA® Werke

Mikroskop ECLIPSE TS100 (Zellkultur)	Nikon Corporation
Mikroskop-Digitalkamera	Sony Corporation
Milli-Q® Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA
Mini-Protean® TGX™ Precast Gels 4-15%	Bio-Rad Laboratories, Inc.
NanoDrop	Peqlab Biotechnologie GmbH
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	GE Healthcare
Parafilm	Bemis®
Pasteurpipetten 230 mm	VWR International
Perfussionssystem VM8	ALA Scientific Instruments, Inc.
pH-Meter pH7110	inoLab®
Pipettenspitzen TipOne	STARLAB INTERNATIONAL GmbH
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Präzisionswischtücher für NanoDrop	Kimberley-Clark Corporation
Pressure Regulator PR-10	ALA Scientific Instruments, Inc.
Reaktionsgefäß 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG
Rolltaumler SRT6	stuart®
Scanner	Seiko Epson K. K.
Serologische Pipetten 2ml; 5ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG
Spectra-5 und X-Light confocal unit	Visitron Systems GmbH
Spektrophotometer Ultrospec 10	Amersham Biosciences Corp.
Sterilbank HERA safe	Heraeus Holding GmbH
Taumler gyro-rocker SSL3	stuart®
Tecan Reader SPARK 20M	Tecan Group AG
TempModule S	Carl Zeiss AG
Thermomixer C	Eppendorf AG
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf AG

Tischzentrifuge 5424	Eppendorf AG
Trans Blot Turbo Transfer-System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Vakuum-Pumpe	SCHEGO Schemel & Goetz GmbH & Co. KG
Vernichtungsbeutel	SARSTEDT AG & Co. KG
<i>VisiChrome High Speed Polychromator System</i>	Visitron Systems GmbH
VortexGenie 2	Scientific Industries, Inc.
Waagen	Sartorius AG und Fisher Scientific International, Inc.
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG
Xenon-Gasentladungslampe (Lambda DG-4)	Sutter Instruments Company
Zellkulturschaber	Fisher Scientific International, Inc.
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturschalen 35 x 10 mm	Greiner Bio-One International GmbH

Tabelle 7: Übersicht über die verwendete Software.

Software	Bezugsquelle
Adobe Illustrator	Adobe Inc.
AxioVision Software	Zeiss (Jena)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.
Huygens Essential	Scientific Volume Imaging B.V.
Image Studio Lite 2 (Version 5.2.5.)	LI-COR
Leica Application Suite X	Leica Microsystems GmbH
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation
Microsoft Word	Microsoft Corporation
VisiView2.1.1	Visitron Systems GmbH

3.1.4. Plasmide

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz	Erhalten von
Pericam MT	Plasmid zur Expression des mitochondrialen Ca ²⁺ -Sensors Pericam MT.	[123]	AG van der Laan
D3cpv	Plasmid zur Expression des mitochondrialen Ca ²⁺ -Sensors D3cpv.	[126]	AG van der Laan

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Zellkulturtechniken

Tabelle 9: Übersicht über die zur Kultivierung von HeLa-Zellen verwendeten Medien.

Zellkultur	Konzentration
<u>Zellkulturmedium</u>	
DMEM	
FBS	10% (v/v)
<u>Zellkulturmedium mit Oleat</u>	
DMEM	
FBS	10% (v/v)
Natriumoleat	200 µM
BSA, fettsäurefrei	0,2% (w/v)

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte, wie in Tabelle 9 aufgeführt, im Kulturmedium DMEM (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 11594486)/10% FBS (Invitrogen AG; Katalognummer: S 0115; LOT.: 0054 B) bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturschalen (100 x 20 mm). Die Lagerung von DMEM/10% FBS, DMEM und FBS erfolgte bei 4°C. Es wurde alle 8 Wochen eine PCR-basierte Testung auf Mykoplasmen durchgeführt. Zur Fotodokumentation der Zellkulturschale kam eine fest am Mikroskop verbaute Digitalkamera (Sony) zur Verwendung.

Zur Aufteilung der Zellen erfolgte zunächst die Bestimmung der prozentualen Konfluenz der Zellen unter dem Mikroskop. Es folgte die Absaugung des alten Mediums und das Waschen mit 10 ml 1 x PBS pH 7,2 (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 11530546, Lagerung bei RT). Nach Absaugen des 1 x PBS pH 7,2 wurde 1 ml Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 11580526, Lagerung bei 4°C) hinzugegeben und so geschwenkt, dass der komplette Boden der Zellkulturschale benetzt wurde. Trypsin ist eine Endopeptidase und dadurch in der Lage, Zellverbindungen zu Oberflächen und anderen Zellen aufzulösen. Das enthaltene EDTA wirkt als Komplexbildner von zweiwertigen Kationen synergistisch zum Trypsin, da es zur Destabilisierung von Membranproteinen führt [27]. Anschließend wurde der Großteil des Trypsins abgesaugt und die Zellkulturschale mit dem verbliebenen Trypsin im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach 3-5 Minuten wurde das Ablösen der Zellen durch die Trypsinierung mikroskopisch kontrolliert und die Zellen in 10 ml raumtemperaturwarmen Kulturmedium DMEM/10% FBS resuspendiert, bis makroskopisch

keine Zelladhäsionen mehr erkennbar waren. Schließlich folgte die Verdünnung der Zellsuspension in neuen Zellkulturschalen mit entsprechend vorgelegtem Kulturmedium und das Mischen durch eine Achter- und Kreuzbewegung. In der Regel wurde für diese sogenannte Passagierung der Zellen für eine Inkubationsdauer von zwei Tagen eine Verdünnung von 1:8 (Zellsuspension:Medium) gewählt. Dies entsprach etwa 700.000 Zellen/10 ml. Ziel der Verdünnung war es nach zwei Tagen exponentiell wachsende Zellen zu haben, die eine Konfluenz von 90-95% nicht übersteigen. Bei längerer Inkubationsdauer von mehr als zwei Tagen wurde die Verdünnung entsprechend angepasst. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter Auszählung aller 4 Großquadrate. Zur Berechnung der Zellzahl wurde daher folgende Formel eingesetzt:

Mittelwert der gezählten Zellen in einem Quadrat*10⁴ = Zellzahl/ml

Für die Ca²⁺-Messungen wurden die Zellen in Zellkulturschalen (35 x 10 mm) ausgesät, die jeweils ein 25 mm Deckglas enthielten. Die Zielkonfluenz für die Ca²⁺-Bildgebung lag bei 80%, weil so einerseits möglichst viele Zellen in einem Messfeld gemessen werden konnten und andererseits noch zellfreie Flächen zur Messung des Hintergrundsignales vorhanden waren. Für eine Ca²⁺-Bildgebung nach 24 h Inkubationszeit stellte sich für die WT-Zelllinie eine Aussaat von 250.000 Zellen und für die PEX19^{-/-}- sowie Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine Aussaat von 300.000 Zellen in jeweils 2 ml Kulturmedium als geeignet heraus. Da die Zugabe von Oleat ins Medium erst einen Tag nach Zellaussaat erfolgen und eine Inkubation mit Oleat für ca. 16 h gewährleistet werden sollte, erfolgte die Ca²⁺-Bildgebung in Oleat-behandelten Zellen nach 48 h Inkubationszeit. Dabei wurden zu Beginn der 48 h Inkubationszeit 90.000 Zellen der WT-Zelllinie und 100.000 Zellen der PEX19^{-/-}- sowie Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie in jeweils 2 ml Kulturmedium ausgesät.

3.2.1.2. Induktion der Lipidtröpfchen-Biogenese

Die Behandlung mit Oleat führt in HeLa-Zellen zur Akkumulation von Triglyceriden in Form von Lipidtröpfchen (LT) [65]. Zur Induktion der LT-Biogenese wurde Natriumoleat mit einer Endkonzentration von 200 µM im Komplex mit 0,2% fettsäurefreiem BSA für eine Inkubationsdauer von ca. 16 h zu den HeLa-Zellen im Kulturmedium DMEM/10% FBS gegeben (siehe Tabelle 9). Dazu wurde zunächst eine 200 mM Stocklösung des Natriumoleats (Sigma-Aldrich; Katalognummer: O7501-5G, Stocklösung 200 mM in 100% Ethanol, Lagerung bei -20°C) in Ethanol (mind. 99,8%; Sigma Aldrich; Cat# 32205) gelöst

und bei -20°C gelagert. Die 10% Stocklösung des BSA (fettsäurefrei; Sigma-Aldrich; Katalognummer: A6003-10g; LOT.: SLCB1005) wurde mit 1 x PBS pH 7,2 (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 11530546) angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Zur Oleat-Behandlung der Zellen wurden zunächst das Kulturmedium DMEM/10% FBS sowie die Stocklösung des BSA im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Stocklösung des Natriumoleats wurde kurz bei RT aufgetaut. Anschließend wurde das Kulturmedium im Falcon vorgelegt. Es folgte das Vortexen der beiden Stocklösungen, bevor das 10% BSA zum im bereits im Falcon vorgelegten Kulturmedium hinzupipettiert wurde. Dann wurde das Natriumoleat hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Nach der folgenden 10-minütigen Inkubation im Wasserbad wurde die Lösung ein weiteres Mal durch Vortexen gemischt, um eine möglichst hohe Komplexierung des Oleats mit BSA zu erreichen. Das alte Kulturmedium der Zellen wurde durch Absaugen entfernt und die Lösung aus Kulturmedium, Natriumoleat und BSA am Rand der Zellkulturschale zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 16 h bei 37°C , 5% CO_2 und hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Der Erfolg der Induktion der LT-Biogenese ließ sich am nächsten Tag mithilfe eines Lichtmikroskopes anhand der Bildung von dunkel erscheinenden LT im Zytoplasma der Zelle überprüfen.

3.2.2. Ca^{2+} -Messungen

3.2.2.1. Zytoplasmatische Ca^{2+} -Messungen

Zur Messung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ein experimenteller Ansatz basierend auf Fura-2-AM eingesetzt. Bei Fura-2-AM handelt es sich um einen chemischen, fluoreszenzbasierten Ca^{2+} -Sensor, der in Abhängigkeit von der Bindung an Ca^{2+} sein Absorptionsmaximum verändert [63]. Prinzipiell lassen sich in der Gruppe der chemischen, fluoreszenzbasierten Ca^{2+} -Sensoren zwei Gruppen voneinander differenzieren. Zum einen gibt es ratiometrische Ca^{2+} -Sensoren wie Fura-2-AM, zum anderen gibt es nicht ratiometrische Ca^{2+} -Sensoren wie Fluo-4 [23]. Ratiometrische Ca^{2+} -Sensoren wie Fura-2-AM haben dabei den großen Vorteil, dass die Kalkulation nicht auf den absoluten Signalen der Fluoreszenzsignale beruht, sondern auf dem relativen Verhältnis der beiden Fluoreszenzsignale zueinander basiert. So werden Effekte wie Photobleichung und eine unterschiedliche Beladung der Zellen herausgerechnet [145]. Daneben hat Fura-2-AM den großen Vorteil, dass keine Transfektion der Zellen zur Messung von Ca^{2+} notwendig ist, sondern stattdessen eine noninvasive Beladung der Zellen mit Fura-2-AM möglich ist [23]. Bei der Beladung der Zellen mit Fura-2-AM kommt es nach Permeation des Fura-2-AM durch die Zellmembran zur Abspaltung der Acetoxymethylestergruppen durch unspezifische

zelluläre Esterasen [24,145]. Infolgedessen verbleibt das Fura-2 im Zytosol der Zelle, wobei hier die exklusive Lokalisation im Zytosol von der Aktivität der unspezifischen Esterasen abhängig ist [143]. Bei unzureichender Esteraseaktivität ist nicht auszuschließen, dass Fura-2-AM in zytosolische Organellen gelangt, die ebenfalls Esteraseaktivität besitzen und so zur Fehllokalisierung des Fura-2 führen könnte [143]. In dieser Arbeit wurde jedoch auf eine genauere Lokalisierung des Fura-2 verzichtet, da in HeLa-Zellen bereits gezeigt werden konnte, dass Fura-2 mit einer sehr ähnlichen Beladungsmethode nur zytosolisch lokalisiert [22]. Zusammenfassend stellte die Fura-2-AM basierte Messung des zytosolischen Ca^{2+} damit eine etablierte und geeignete Messmethodik zur Untersuchung einer möglicherweise veränderten Ca^{2+} -Homöostase in Abhängigkeit von PEX19 dar.

Fura-2-AM besitzt 5 Acetoxymethylgruppen, die über Esterbindungen an Fura-2 gebunden sind. Als hydrophobes Molekül kann Fura-2-AM die Plasmamembran durchdringen und ins Zytosol gelangen, wo die Abspaltung der Acetoxymethylgruppen durch zytosolische Esterasen erfolgt. Infolgedessen entsteht das sehr hydrophile Fura-2, welches keine zellulären Membranen mehr passieren kann [143]. Die Bindung von Ca^{2+} an Fura-2 führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm (Ca^{2+} -frei) zu 340 nm (Ca^{2+} -gebunden) [129]. Dabei bleibt das Emissionsmaximum von Fura-2 bei einer Wellenlänge von etwa 510 nm sowohl im Ca^{2+} -gebundenen als auch Ca^{2+} -freien Zustand nahezu identisch. Infolgedessen ermöglicht dies eine ratiometrische Messung, die sich als Division der Emission bei Anregung mit 340 durch die Emission bei Anregung mit 380 nm ergibt (F340/380) [63]. Aufgrund der im inversen Fluoreszenzmikroskop Visitron (Carl Zeiss AG) verwendeten optischen Filter wurde in dieser Arbeit mit einer Wellenlänge von 340 nm („340/26 BrightLine HC“) bzw. 387 nm („387/11 BrightLine HC“) angeregt und bei einer Wellenlänge von 510 nm („ET510/80m“) die Emission gemessen (siehe Abbildung 5). Hieraus ergab sich eine ratiometrische Messung F340/387. Die Lichtquelle war eine Xenon-Gasentladungslampe Lambda DG-4 (Sutter Instruments Company).

Tabelle 10: Übersicht über die Zusammensetzung der für die Fura-2-AM basierten zytosolischen Ca^{2+} -Messungen verwendeten Puffer. Die Puffer wurden weder sterilfiltriert noch autoklaviert, sondern nach Einstellung des pH-Wertes zu je 50 ml aliquotiert und bei 4°C gelagert.

Ca^{2+}-Bildgebung	Konzentration	Einwaage
<u>Ringer-Lösung (pH 7,4) 1 Liter</u> NaCl MgCl ₂ KCl HEPES Glukose Der pH-Wert wurde mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Milli-Q Wasser	 140 mM 1 mM 4 mM 10 mM 10 mM	 8,18 g 95 mg 298 mg 2,38 g 1,80 g ad 1 L
<u>Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl₂ (pH 7,4) 600 ml</u> CaCl ₂ Der pH-Wert wurde mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Ringer-Lösung (pH 7,4)	 1 mM	 67 mg ad 600 ml
<u>Ringer-Lösung mit 0,5 mM EGTA (pH 7,4) 500 ml</u> EGTA Der pH-Wert wurde mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Ringer-Lösung (pH 7,4)	 0,5 mM	 38 mg ad 500 ml

Die Puffer für die Ca^{2+} -Bildgebung wurden, wie in Tabelle 10 dargestellt, zusammengesetzt, wobei Calciumchlorid (93%, anhydriert; Alfa Aesar) und 99% EGTA (Carl Roth GmbH + Co. KG) verwendet worden sind. Zur Beladung der Zellen mit Fura-2-AM (Invitrogen AG; Katalognummer: F1221; Stocklösung: 1 mM in DMSO; immer frisch ansetzen) wurde das Medium der über Nacht in den Zellkulturschalen (35 x 10 mm) angewachsenen Zellen verworfen und die Zellen, wie in Abbildung 5 dargestellt, für 15 Minuten bei RT im Dunkeln in 1,5 ml Ringer-Lösung mit 1 mM CaCl₂ und 4 μM Fura-2-AM inkubiert. Anschließend erfolgte mithilfe einer Pinzette die Entnahme des Deckglases in die Messkammer (Attofluor™ *Cell Chamber*, Thermo Fisher Scientific) für das Mikroskop. Der nachfolgende Waschschrift

erfolgte mit 300 µl der Ringer-Lösung, mit der auch die Ca^{2+} -Messung durchgeführt wurde. Sie enthielt daher 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM EGTA oder war nominal Ca^{2+} -frei. Der Waschschrift wurde wiederholt und schließlich 300 µl der Messlösung (1 mM Ca^{2+} /0,5 mM EGTA/nominal Ca^{2+} -frei, je nach experimentellen Fragestellungen) zu den Zellen gegeben. Nach Einspannen in das Mikroskop wurde die Messung gestartet und nach einem bestimmten Zeitpunkt Thapsigargin (Invitrogen AG; Katalognummer: T7459, Stocklösung: 1 mM in DMSO, Lagerung bei -20°C), Ionomycin (Life Technologies (REF: 124222; LOT.: 1702558) oder Ca^{2+} , alle in Ringer-Lösung verdünnt, durch manuelles Pipettieren hinzugegeben. Die Zeitpunkte für die Zugabe von Thapsigargin waren dabei 1 bzw. 3 Minuten nach Beginn der Messung, während die Ionomycin-Zugabe 1 bzw. 15 Minuten nach Messbeginn erfolgte. Die Zugabe von Ca^{2+} erfolgte nach 15 Minuten Messzeit. Thapsigargin fungiert als irreversibler Hemmer der SERCA-Pumpe [5]. Ionomycin ist ein Ca^{2+} -Ionophor, welches das Passieren von Ca^{2+} über alle zellulären Membranen erlaubt [96]. Zur genauen Analyse des SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) kam zudem ein leicht abgewandelter Mikroskopaufbau der AG Niemeyer zum Einsatz, der sich von dem oben beschriebenen darin unterschied, dass eine elektronisch gesteuerte Applikation der Ringer-Lösungen (1 µM Thapsigargin/ 1 mM Ca^{2+} / 1 mM EGTA) in einer Durchflussskammer erfolgte. Das dabei verwendete Mikroskop war ein inverses Fluoreszenzmikroskop Axio A1 (Carl Zeiss AG) mit einem Fura-2-Filter (424931; Carl Zeiss AG). Dieser mikroskopische Aufbau beinhaltete darüber hinaus ein *VisiChrome High Speed Polychromator System* (Visitron Systems GmbH) und eine Kamera (Seriennummer: 255183; Visitron Systems GmbH). Zur elektronisch gesteuerten Applikation der Ringer-Lösungen diente ein VC8³ *Valve Commander*, ein *Pressure Regulator* PR-10 sowie das Perfussionssystem VM8 (ALA Scientific Instruments, Inc.). Hierbei erfolgte die Applikation der EGTA-Lösung nach 18 Minuten Messzeit.

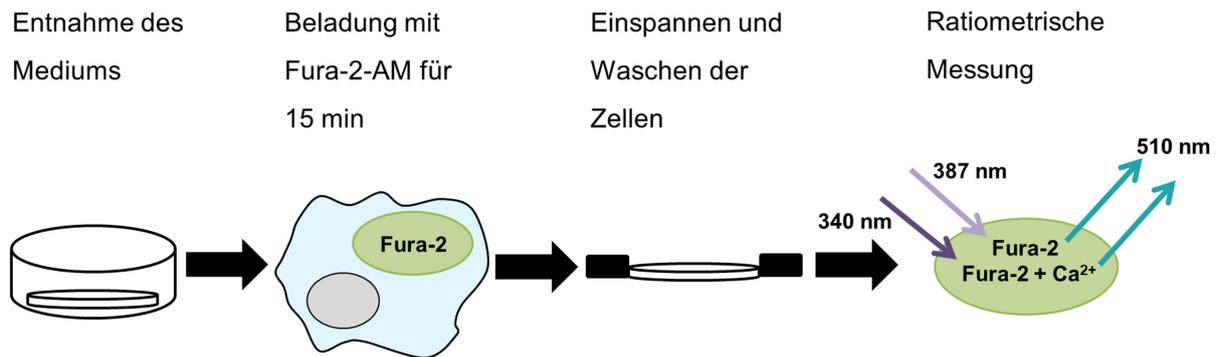


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messungen in lebenden Zellen. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Fura-2-AM beladen. Danach folgte die Einspannung in eine Deckglashalterung, wo die Zellen mehrmals mit Ringer-Lösung (1 mM Ca^{2+} /0,5 mM EGTA/nominal Ca^{2+} -frei) gewaschen wurden. Zur ratiometrischen Ca^{2+} -Messung erfolgte anschließend die fluoreszenzmikroskopische Messung bei Anregung mit 387 bzw. 340 nm und Emissionsmessung bei 510 nm.

Die Fluoreszenzmessung wurde mithilfe der Software VisiView durchgeführt. Hierzu wurde nach Einspannen der Deckgläser ins inverse Fluoreszenzmikroskop Visitron zunächst lichtmikroskopisch mit 200 x Vergrößerung eine Stelle auf dem Deckglas ausgesucht, die eine ca. 80% Konfluenz der Zellen aufwies. Nach Einstellen der Fokusebene wurde, wie in Abbildung 6 gezeigt, eine Aufnahme bei Anregung mit 387 nm und Emissionsmessung bei 510 nm angefertigt. Dann wurden drei Hintergrundmessflächen ausgewählt, bevor jede einzelne Zelle im Sichtfeld als ROI (*Region of interest*) markiert wurde. Bei einem Binning von 4 wurden die Zellen für 20 ms belichtet und alle 3 Sekunden fand eine Exzitation bei 340 bzw. 387 nm statt. Eine Korrektur der Emissionswerte bei Anregung mit 340 bzw. 387 nm erfolgte durch Subtraktion des Mittelwertes der drei Hintergrundmessflächen. Schließlich ließen sich so um das Hintergrundsignal korrigierte Mittelwerte der Quotienten der Fluoreszenzemissionen 340/387 nm über die Zeit berechnen. Die gesamte Messung fand unter nicht kontrollierter Raumtemperatur statt. Von dieser Berechnung wurden Zellen mit stark abweichenden Quotienten, welche oft apoptotischen bzw. nekrotischen Ereignissen geschuldet waren, ausgeschlossen.

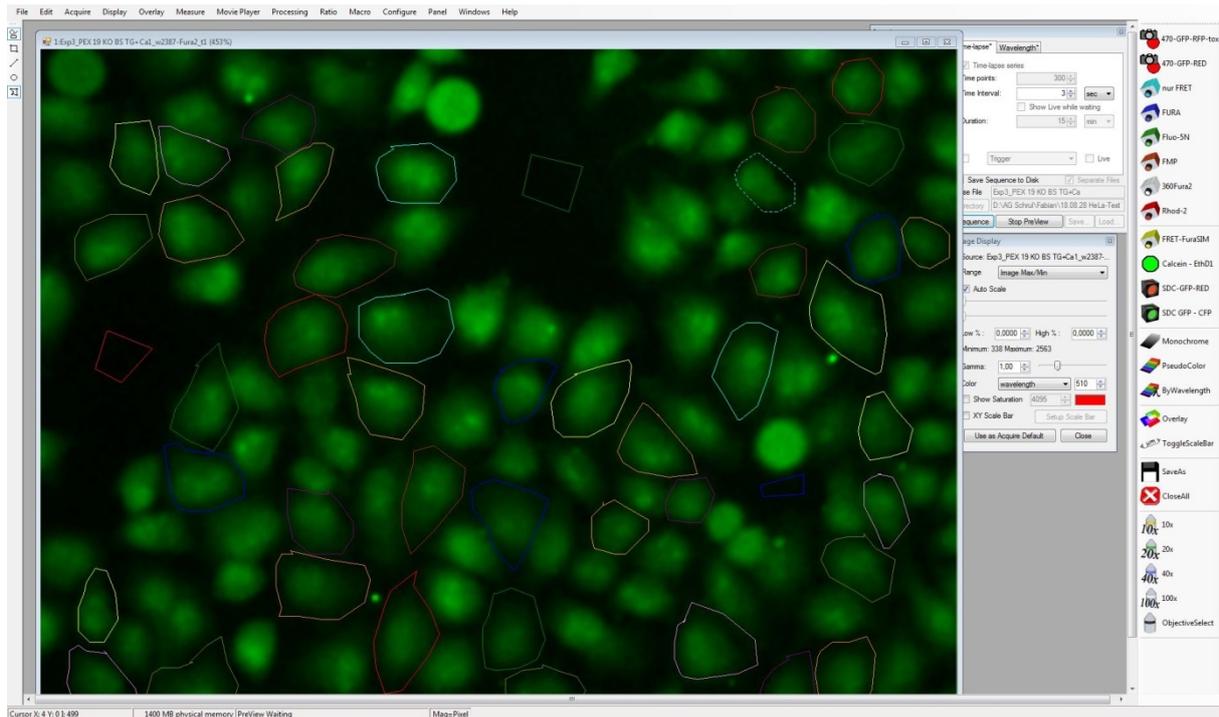


Abbildung 6: Programmoberfläche von VisiView während der Markierung der Zellen für die nachfolgende Fura-2-AM basierte Messung des zytosolischen Ca^{2+} in HeLa-Zellen. Die Aufnahme entstand bei 200 x Vergrößerung mit einer Anregung bei 387 nm und Emissionsmessung bei 510 nm. Die drei trapezförmigen Hintergrundmessflächen liegen im zellfreien Bereich des Bildausschnittes. Die bereits markierten Zellen sind farbig umrandet und als ROI (*Region of interest*) markiert.

Nach Thapsigargin-Gabe kommt es zur Demaskierung des ER- Ca^{2+} -Lecks [34], wodurch es zu einem raschen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} kommt. Auch Ionomycin führt durch seine Wirkung als Ionophor [96] zu einem schnellen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Efflux der Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern [125]. Um Unterschiede dieser raschen Anstiege der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration besser vergleichen zu können, wurde zusätzlich das Delta des Maximums berechnet. Dazu wurde das Minimum in den ersten drei Minuten und das Maximum über die gesamte Messdauer jeder Zelle bestimmt. Anschließend wurde von jeder Zelle die Differenz zwischen Maximum und Minimum berechnet. Der Mittelwert der Differenz von Maximum und Minimum jeder Zelle ergab dann das Delta Maximum.

3.2.2.2. Berechnung der Steigung bzw. des Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Fura-2-AM basierten Messverfahren

Zur genaueren Bestimmung der Kinetiken des Anstiegs und Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kam ein zum im vorangegangenen Abschnitt beschriebener leicht abgewandelter Versuchsaufbau zum Einsatz. Dieser war ebenfalls Fura-2-AM basiert, allerdings erfolgte die Applikation der Ringer-Lösungen (1 μM Thapsigargin/ 1 mM Ca^{2+} / 1 mM EGTA) elektronisch gesteuert in einer Durchflusskammer. So wurde zunächst in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Messlösung Thapsigargin zu den Zellen gegeben, auf die eine Ca^{2+} -enthaltende Ringer-Lösung nach 400 Sekunden folgte. Nach 1100 Sekunden erfolgte die Messung in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung. Schließlich wurde die Berechnung des Anstiegs und Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Ca^{2+} -Zugabe bzw. Zugabe EGTA-enthaltender Ringer-Lösung mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Dazu wurde zunächst der zeitliche Bereich gewählt, in dem der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nach Ca^{2+} -Zugabe zu verzeichnen war, dieser lag zwischen 380-450 Sekunden. In diesen Bereich wurde für jede Zelllinie getrennt eine Trendlinie (*log (agonist) vs. response – Variable slope (four parameters)*) gelegt, für die sich Determinationskoeffizienten R^2 zwischen 0,9961 und 0,990 ergaben. Anschließend wurde die Steigung der Trendlinie bestimmt. Analog dazu wurde auch für die Bestimmung des Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verfahren. Der zeitliche Bereich des Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Wechsel in EGTA-enthaltende Ringer-Lösung wurde zwischen 1095-1125 Sekunden eingegrenzt. Bei der Berechnung der Trendlinie (*Plateau followed by one phase decay; $Y_0 < 2$; $k > 0,0$*) für jede Zelllinie ergaben sich R^2 zwischen 0,9789 und 0,9931. Dann wurde der Abfall der Trendlinie bestimmt.

3.2.2.3. Kalibrierungsmessungen zur Berechnung der absoluten Ca^{2+} -Konzentration

Die ratiometrisch berechneten Werte der Fura-2-AM basierten Ca^{2+} -Messungen sollten in absolute Ca^{2+} -Konzentrationen umgerechnet werden. Dazu war es zunächst notwendig, ratiometrische Ca^{2+} -Messungen mit der maximal möglichen sowie minimal möglichen Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Fura-2 durchzuführen. Dazu wurden Kalibrierungslösungen, wie in Tabelle 11 aufgeführt, hergestellt.

Tabelle 11: Übersicht über die Zusammensetzung der für die Kalibrierungsmessungen zur Berechnung der absoluten Ca^{2+} -Konzentration genutzten Puffer. Die Puffer wurden weder sterilfiltriert noch autoklaviert, sondern nach Einstellung des pH-Wertes bei 4°C gelagert.

Kalibrierungsmessungen für Ca^{2+} -Bildgebung	Konzentration	Einwaage
<u>Ringer-Eichlösung mit 50 mM CaCl_2 (pH 7,4) 100 ml</u> CaCl_2 Der pH-Wert wurde mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Ringer-Lösung (pH 7,4)	50 mM	550 mg ad 100 ml
<u>Ringer-Eichlösung mit 15 mM EGTA (pH 7,4) 100 ml</u> EGTA Der pH-Wert wurde mit NaOH (1 M) auf 7,4 eingestellt. Ringer-Lösung (pH 7,4)	15 mM	570 mg ad 100 ml

3.2.2.3.1. Bestimmung von R_{max} für jede der untersuchten Zelllinien

Die Bestimmung des maximalen ratiometrischen Messwertes (R_{max}) wurde bei maximal möglicher Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Fura-2 durchgeführt. Hierzu wurden die HeLa-Zellen nach Beladung mit Fura-2, wie unter zytosolische Ca^{2+} -Messungen beschrieben, dreimal mit je 300 μl Ringer-Lösung (nominal Ca^{2+} -frei) gewaschen. Anschließend wurde eine basale dreiminütige fluoreszenzmikroskopische ratiometrische Ca^{2+} -Messung in 300 μl Ringer-Lösung (nominal Ca^{2+} -frei) durchgeführt, bevor nach drei Minuten die Zugabe von 300 μl Ringer-Lösung mit CaCl_2 (50 mM) und Ionomycin (20 μM) erfolgte und für 12 Minuten weiter gemessen wurde. Daraus resultierte eine R_{max} -Messung bei einer CaCl_2 -Konzentration von 25 mM und einer Ionomycin-Konzentration von 10 μM . In Kombination mit dem Ionophor Ionomycin [96] konnte nun sowohl das intrazelluläre als auch das von außen in die Messlösung zugegebene Ca^{2+} ins Zytosol der Zellen gelangen. Infolgedessen sollte sich eine maximal mögliche Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Fura-2 einstellen. Der Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Messung im Rahmen der Bestimmung von R_{max} über die Zeit ist exemplarisch für die WT-Zelllinie in Abbildung 7 dargestellt. Zur Wiederholung wurde die Messung mit HeLa-Zellen auf einem zweiten Deckglas durchgeführt.

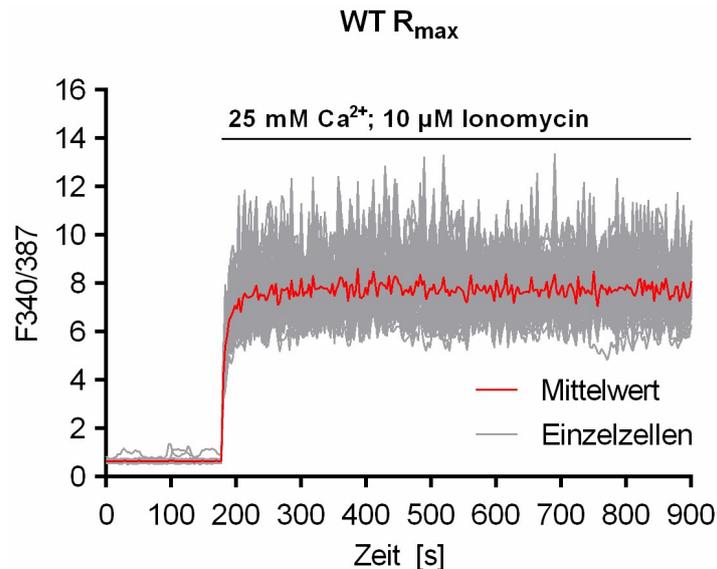


Abbildung 7: Die Ermittlung von R_{\max} des Quotienten F340/387 in der HeLa-WT-Zelllinie. Gezeigt sind die Quotienten F340/387 jeder gemessenen Zelle über eine Messzeit von 15 Minuten. Die grauen Linien zeigen die Quotienten jeder einzelnen Zelle, während die rote Linie den Mittelwert aller Zellen darstellt. Nach Beladung mit Fura-2-AM wurden die Zellen dreimal mit je 300 μl Ringer-Lösung (nominal Ca^{2+} -frei) gewaschen. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Messung erfolgte nach drei Minuten die Zugabe von Ringer-Lösung mit 50 mM CaCl_2 und 20 μM Ionomycin, so dass sich Endkonzentrationen von 25 mM Ca^{2+} und 10 μM Ionomycin ergaben. Dadurch sollte eine maximale Ca^{2+} -Bindung an Fura-2 erreicht werden.

3.2.2.3.2. Bestimmung von R_{\min} für jede der untersuchten Zelllinien

Ziel dieser Ca^{2+} -Messungen war es, die minimal mögliche Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Fura-2 zu erreichen, so dass sich der minimale ratiometrische Messwert (R_{\min}) für jede Zelllinie berechnen ließ. Zunächst erfolgte, wie unter zytosolische Ca^{2+} -Messungen beschrieben, die Beladung der HeLa-Zellen mit Fura-2-AM. Für die Waschschrte wurden 300 μl Ringer-Eichlösung mit EGTA (15 mM) und Ionomycin (20 μM) hinzugegeben und für 10 Minuten bei RT abgedunkelt inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und erneut 300 μl Ringer-Eichlösung mit EGTA (15 mM) und Ionomycin (20 μM) hinzugegeben. Dieser Schritt wurde ein drittes Mal wiederholt. Ziel war es, durch die Zugabe des Ca^{2+} -Chelators EGTA mit Ionomycin eine vollständige Depletion der Ca^{2+} -Ionen aus dem extra- und intrazellulären Raum zu erreichen. Zur fluoreszenzmikroskopischen Messung wurden ebenfalls 300 μl der bereits zuvor verwendeten Ringer-Eichlösung mit EGTA (15 mM) und Ionomycin (20 μM) als Messlösung genutzt und eine 5-minütige ratiometrische Ca^{2+} -Messung durchgeführt. In Abbildung 8 ist der Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Messung im Rahmen der Bestimmung von R_{\min} über die Zeit exemplarisch für die WT-Zelllinie gezeigt. Die Messung wurde durch Auswahl eines anderen Ausschnittes von Zellen auf dem Deckglas wiederholt.

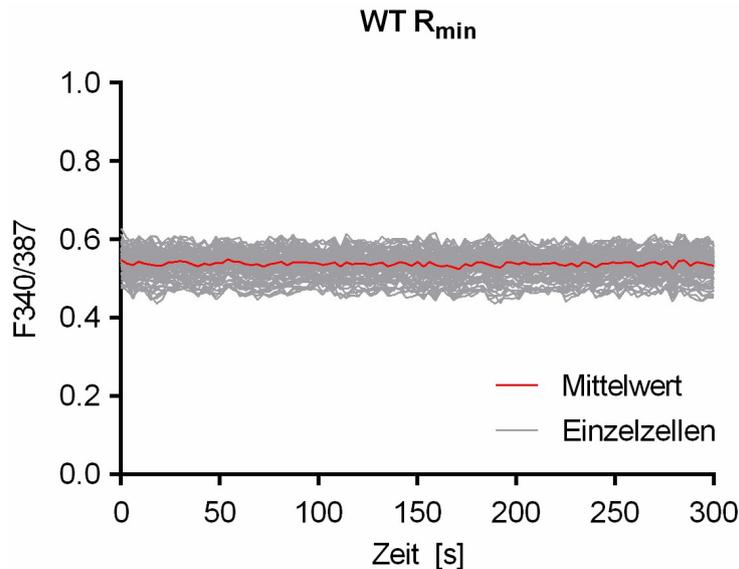


Abbildung 8: Die Ermittlung von R_{\min} des Quotienten F340/387 in der HeLa-WT-Zelllinie. Gezeigt sind die Quotienten F340/387 jeder gemessenen Zelle über eine Messzeit von 5 Minuten. Die grauen Linien zeigen die Quotienten jeder einzelnen Zelle, während die rote Linie den Mittelwert aller Zellen darstellt. Nach Beladung mit Fura-2-AM wurden die Zellen dreimal für 10 Minuten mit je 300 μ l Ringer-Lösung mit 15 mM EGTA und 20 μ M Ionomycin inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Messung erfolgte in 300 μ l Ringer-Lösung mit 15 mM EGTA und 20 μ M Ionomycin. Durch Depletion aller freien Ca^{2+} -Ionen sollte eine minimale Ca^{2+} -Bindung an Fura-2 erreicht werden.

3.2.2.3.3. Die Berechnung der absoluten Ca^{2+} -Konzentration

Zur Berechnung der absoluten Ca^{2+} -Konzentration wurde zunächst R_{\max} bestimmt. Dazu wurden alle ratiometrischen Messwerte aller Zellen aus beiden R_{\max} -Messungen einer Zelllinie in einer Tabelle zusammengefügt. Anschließend wurde für jede einzelne Zelle das Maximum über die gesamte Messzeit bestimmt und die Maxima aller gemessenen Zellen gemittelt. Analog dazu wurden auch die R_{\min} -Werte berechnet, mit dem Unterschied, dass hier für jede einzelne Zelle das Minimum über die gesamte Messzeit bestimmt wurde und die Minima aller Zellen gemittelt wurden. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der R_{\max}/R_{\min} -Messungen aller Zelllinien.

Tabelle 12: Die errechneten R_{\max}/R_{\min} -Werte der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19. SEM = Standardfehler des Mittelwertes.

	WT	PEX19 ^{-/-}	PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} KI. 15	PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S} KI. 19
R_{max}	9,34	9,34	8,90	10,75
SEM	0,14	0,16	0,16	0,28
R_{min}	0,52	0,54	0,52	0,52
SEM	0,00	0,00	0,00	0,00

Die Berechnung der absoluten Ca²⁺-Konzentration basiert auf der von Gryniewicz *et al.* im Jahre 1985 [63] publizierten Formel zur Umrechnung der Fura-2-AM-Signale:

$$[Ca^{2+}] = K_d \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

K_d entspricht dabei einer messanlagenspezifischen Dissoziationskonstante für Fura-2. Diese wurde von der AG Cavalié (Universität des Saarlandes) bestimmt und mir freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Damit ergab sich folgende Gleichung (K_d = 3742,5):

$$[Ca^{2+}] = 3742,5 \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)}$$

Mithilfe dieser Gleichung, den zelllinienspezifischen R_{\max}/R_{\min} -Werten (Tabelle 12) und den gemessenen ratiometrischen Messwerten R konnte nun auf absolute Ca²⁺-Konzentrationen [nM] geschlossen werden.

3.2.2.4. Bestimmung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration

3.2.2.4.1. Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Tabelle 13: Übersicht über die zur Kultivierung von Mikroorganismen genutzten Medien und Reagenzien. Das LB-Medium wurde nach der Einwaage autoklaviert.

Kulturmedien für Mikroorganismen	Einwaage/Volumen
<u>100 mg/ml Ampicillin-Stocklösung</u>	
Ampicillin	1 g
ddH ₂ O	ad 10 ml
<u>LB-Medium 1 Liter</u>	
LB-Medium	25 g
ddH ₂ O	ad 1 l
<u>Ampicillin-enthaltende LB-Agar-Platten</u>	
LB-Medium	25 g
Agar	15 g
ddH ₂ O	ad 1 l
100 mg/ml Ampicillin-Stocklösung (Zugabe nach Autoklavierung und Abkühlung auf etwa 40-50°C)	1/1000

Das Plasmid Pericam MT (basierend auf dem pcDNA3-Vektor) wurde freundlicherweise von der AG van der Laan (Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Zur Transformation des für den mitochondrialen Ca^{2+} -Sensor Pericam MT codierenden Plasmides Pericam MT wurden hitzeschockkompetente *E. coli* DH5 α Zellen genutzt, die freundlicherweise von Julia Hach (AG Robert Ernst, Universität des Saarlandes) bereitgestellt wurden. Als Transformationsmethode wurde eine auf Inoue *et al.* (1990) basierende Hitzeschock-Transformation gewählt [77]. Nach Auftauen der *E. coli* DH5 α auf Eis wurden 50 μl Zellsuspension zu 100 ng gereinigter Plasmid-DNA von Pericam MT gegeben und durch vorsichtiges Hoch- und Herunterpipettieren gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis gelagert. Danach erfolgte der Hitzeschock durch Inkubation bei 42°C im Thermomixer für 45 Sekunden. Unmittelbar nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gelagert, bevor 500 μL LB-Medium (*lysogeny broth medium*) hinzugegeben wurde. Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in Tabelle 13 gezeigt. Es folgte eine Inkubation für 1 h auf dem Thermomixer bei 37°C und 400 rpm zur Expression der auf dem transformierten Plasmid codierten Gene. Dabei ist insbesondere die Expression des für die Ampicillin-Resistenz verantwortlichen Genes wichtig, um in der nachfolgenden Ausplattierung auf 0,1 mg/ml Ampicillin-enthaltenden LB-Agar-Platten eine

Selektion der erfolgreich mit dem Plasmid Pericam MT transformierten *E. coli*-Zellen zu ermöglichen. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C und 400 rpm wurden die Zellen 10 Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 50 µl Restvolumen verworfen. In diesem Restvolumen wurde das Zellpellet resuspendiert. Zur Selektion wurden 30 µl der Zellsuspension auf einer Ampicillin-enthaltenden LB-Agar-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte der Erfolg der Transformation durch das Wachstum von *E. coli*-Kolonien überprüft werden.

3.2.2.4.2. Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurde zunächst eine aus der Hitzeschock-Transformation hervorgegangene Kolonie zur Inokulation einer Vorkultur mit einem Volumen von 5 ml 0,1 mg/ml Ampicillin-enthaltendem LB-Medium verwendet. Nach Inkubation bei 37°C und 220 rpm über Nacht wurden mit 1 ml Vorkultur 100 ml einer Hauptkultur bestehend aus 0,1 mg/ml Ampicillin-enthaltendem LB-Medium angeimpft. Nach erneuter Inkubation bei 37°C und 220 rpm über Nacht erfolgte die Reinigung des Plasmids Pericam MT aus den transformierten *E. coli*-Zellen der Hauptkultur durch das NucleoBond PC 100 (Midi-Prep) Kit der Firma Invitrogen. Die Reinigung wurde entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt, wobei zur Elution der DNA 150 µl ddH₂O verwendet wurden.

3.2.2.4.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein NanoDrop (PqLab) verwendet. Dabei wird die Probe mit Licht im Wellenbereich von 220 bis 340 nm bestrahlt und anschließend das Maximum der Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA, bestimmt. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Probe wird zusätzlich noch das Maximum der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, welche dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht [7].

Konzentration DNA [µg/ml] = $A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$

Extinktionskoeffizient = 50 µg/ml (doppelsträngige DNA) [7]

3.2.2.4.4. Transfektion von HeLa-Zellen

Die Plasmide Pericam MT und D3cpv (beide basierend auf dem pcDNA3-Vektor) wurden freundlicherweise von der AG van der Laan (Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Zur Transfektion der HeLa-Zellen mit den für die mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv codierenden Plasmiden eignete sich für die verwendete Polyethylenimin (PEI)-basierte Transfektionsmethode eine Konfluenz der Zellen von ca. 50%. Daher wurden am Vortag der Transfektion 150.000 Zellen zu je 2 ml Medium in einer 6-Well-Zellkulturschale ausgesät. Als Transfektionsreagenz wurde PEI verwendet. Die Transfektion mit PEI beruht auf der Eigenschaft, dass PEI als stark kationisches Polymer in der Lage ist, die zu transfizierende negativ geladene DNA zu binden [26]. Die Stocklösung enthielt 1 mg/ml PEI (Polysciences; Katalognummer: 23966-2; LOT.:696676) und wurde durch Auflösen in H_2O , Ultra pure (Invitrogen AG) bei einer Temperatur von 55°C bis zur vollständigen Auflösung des PEI hergestellt. Der pH-Wert der PEI-Stocklösung wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt und bei -20°C gelagert. 100 μl Aliquots der PEI-Stocklösung wurden bei 4°C gelagert. Ein einzelner Transfektionsansatz für Zellen in einer Schale mit 2 ml Kulturmedium DMEM (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 11594486)/10% FBS (Invitrogen AG; Katalognummer: S 0115; LOT-Nummer: 0054 B) setzte sich wie in Tabelle 14 gezeigt zusammen. Das für eine Transfektion von HeLa-Zellen optimale Verhältnis von DNA zu PEI wurde zuvor mit 1:4 bestimmt.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes zur Transfektion von HeLa-Zellen mittels PEI (Polyethylenimin).

Transfektionsansatz	Volumen/Menge
H_2O , UltraPure	ad 100 μl
1,5 M NaCl (in H_2O , Ultra pure, sterilfiltriert)	10 μl
Vorsichtiges Mischen	
DNA	1 μg
PEI (1 mg/ml)	4 μl

Dieser Ansatz wurde durch Vortexen gründlich gemischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die tropfenweise Zugabe des Transfektionsansatzes zu den Zellen mit anschließendem kurzem Schwenken der 6-Well-Zellkulturschale. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37°C , 5% CO_2 und hoher Luftfeuchtigkeit für 48 h. Schließlich wurde zunächst die mitochondriale Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren in den mit den Plasmiden Pericam MT und D3cpv transfizierten Zellen überprüft. Erst nach dieser Überprüfung wurden mit den transfizierten Zellen ratiometrische Ca^{2+} -Messungen durchgeführt.

3.2.2.4.5. Färben und Fixieren der transfizierten HeLa-Zellen

Tabelle 15: Zusammensetzung der 1 x PBS- und der Fixierlösung für HeLa-Zellen.

Fixierung von Zellen	Konzentration
<u>1 x PBS pH 7,4</u>	
ddH ₂ O	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat	10 mM
Der pH-Wert wurde mit HCl (1 M) auf 7,4 eingestellt. Lagerung bei RT.	
<u>4% PFA-Lösung in 1 x PBS</u>	
H ₂ O	
16% PFA	25% (v/v)
10 x PBS pH 7,4	10% (v/v)

Zunächst wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und das alte Medium abgenommen. Je 500 µl frisches Kulturmedium (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 11594486)/10% FBS (Invitrogen AG; Katalognummer: S 0115; LOT-Nummer: 0054 B) mit einer Endkonzentration von 0,2 µM MitoTracker[®] Red CMXRos (Hoffmann-La Roche AG) wurde zu den Zellen gegeben und kurz geschwenkt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation unter Ausschluss von Licht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Mito-Tracker[®] Red CMXRos ist ein membrangängiger Farbstoff für Mitochondrien in lebenden Zellen, dessen Anreicherung in Mitochondrien abhängig von deren Membranpotential ist und der bei der Fixierung der Zellen nicht ausgewaschen wird. Es erfolgten drei Waschschrte à 3-5 Minuten mit je 1 ml 1 x PBS pH 7,4 (siehe Tabelle 15). Es folgte das Ansetzen einer 4% PFA-Lösung (siehe Tabelle 15) aus den Stocklösungen 16% PFA (Science Services GmbH; Bestellnummer: E15710-S, Lagerung bei 4°C) sowie 10 x PBS pH 7,4 (Thermo Fisher Scientific; Ref.: 70013-026; LOT.: 1908885, Lagerung bei RT) und ddH₂O (autoklaviert). Danach wurden die Zellen mit je 1 ml frisch angesetzter 4% PFA-Lösung für 20 Minuten bei RT fixiert. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei RT wurde die Fixierlösung verworfen und erneut dreimal mit je 1 ml 1 x PBS pH 7,4 für 3-5 Minuten gewaschen. Nun wurde Hoechst-Farbstoff 33342 (Thermo Fisher Scientific; CAT# H1399; Stocklösung 10 mg/ml in DMSO, Lagerung bei -20°C) in einem Verhältnis von 1:10.000 mit 1 x PBS pH 7,4 durch Vortexen gemischt. Es folgte eine 3-minütige Inkubation mit je 1 ml Volumen des in 1 x PBS pH 7,4 verdünnten Hoechst-Farbstoffes pro Well unter abgedunkelten Bedingungen bei RT, um die Zellkerne der Zellen anzufärben. Es wurde erneut dreimal mit je 1 ml 1 x PBS pH 7,4 für

3-5 Minuten gewaschen. Schließlich erfolgte die Vorbereitung von Objektträgern mit 1 Tropfen Eindeckmedium Fluoromount G (Electron Microscopy Science; Katalognummer: 17984-25) und die Deckgläser wurden mit den fixierten Zellen nach unten zeigend vorsichtig auf die Objektträger gelegt. Zur Trocknung wurden die Objektträger abgedunkelt bei RT über Nacht gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung bei 4°C in Objektträgerkästchen aufbewahrt.

3.2.2.4.6. Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv wurden die zuvor gefärbten und fixierten Zellen in einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI8) untersucht. Es wurde insgesamt mit drei verschiedenen Fluoreszenzkanälen angeregt. Für die Detektion des Zellkerns wurde der DAPI-Kanal gewählt, für die Signale des MitoTracker der Cy3-Kanal und für die Eigenfluoreszenz der mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren der GFP-Kanal. Die Belichtungszeiten der einzelnen Kanäle sind getrennt nach Pericam MT und D3cpv in Tabelle 16 aufgeführt. Es wurde mit 630 x Vergrößerung gearbeitet. Die Aufnahmen wurden mit der Leica Application Suite erstellt und im Anschluss zur besseren Schärfe der Aufnahmen mit der Software Huygen Essential dekonvoluiert.

Tabelle 16: Die Belichtungszeiten im DAPI-Kanal, Cy3-Kanal und GFP-Kanal zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Pericam MT und D3cpv.

	DAPI-Kanal	Cy3-Kanal	GFP-Kanal
Pericam MT	153 ms	66 ms	154 ms
D3cpv	5 ms	5 ms	20 ms

3.2.2.4.7. Mitochondriale Ca^{2+} -Messungen

Die Bestimmung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration erfolgte mittels der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv, welche schematisch in Abbildung 9 dargestellt sind. Während Pericam MT nur aus einem Fluorophor, dem zirkulär mutierten YFP (*Yellow fluorescent protein*), besteht [123], verfügt D3cpv über die beiden Fluorophore cpVenus (*Circularly permuted venus*), eine Variante des YFP, und CFP (*Cyan fluorescent protein*) [126]. Beide Sensoren beruhen auf dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin, welches nach Ca^{2+} -Bindung mit dem M13-Peptid interagiert [123,126]. Das M13-Peptid ist der Teil der Myosin-leichte-

Ketten-Kinase, der die Bindungsregion des Calmodulins beinhaltet [123]. Die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Calmodulin und dem M13-Peptid führt bei Pericam MT zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von YFP [123]. Bei D3cpv kommt es zu einer Konformationsänderung der Fluorophore CFP (*Cyan fluorescent protein*) und cpVenus (*Circularly permuted venus*) zueinander, welches in einer FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-induzierten Donoremission des cpVenus resultiert [126]. Dabei kommt es zu einer Übertragung der Exzitationsenergie vom Donor CFP auf den Akzeptor YFP [126]. Neben dem M13-Peptid verfügen sowohl Pericam MT als auch D3cpv über Signalsequenzen zur Lokalisation in die mitochondriale Matrix [123,126]. Neben den strukturellen Unterschieden besteht eine unterschiedliche Ca^{2+} -Affinität der beiden Sensoren, so weist Pericam MT einen $K_d\text{-Wert}_{[\text{Ca}^{2+}]}$ von $\sim 1,7 \mu\text{M}$ [3,123] auf, während D3cpv einen $K_d\text{-Wert}_{[\text{Ca}^{2+}]}$ von $\sim 0,6 \mu\text{M}$ hat [126].

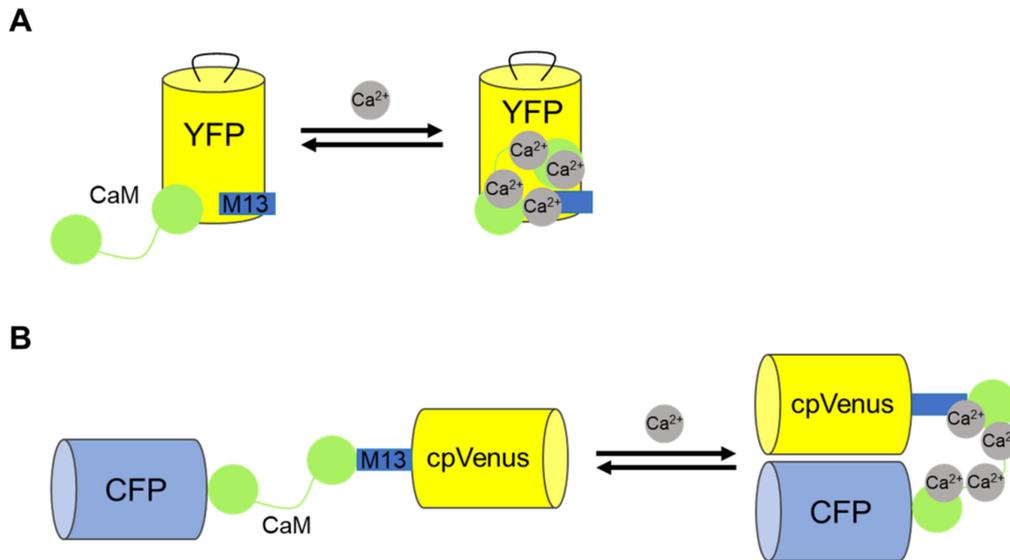


Abbildung 9: Schematische Darstellung der mitochondrialen Ca²⁺-Sensoren Pericam MT (A) und D3cpv (B). A: Pericam MT besteht aus dem Ca²⁺-bindenden Protein Calmodulin und dem M13-Peptid. Eine Bindung von Ca²⁺ an Calmodulin resultiert in einer Veränderung des Anregungsmaximums von YFP [123]. B: D3cpv besteht aus den beiden Fluorophoren CFP (*Cyan fluorescent protein*) und cpVenus (*Circularly permuted venus*). cpVenus ist eine Variante des YFP (*Yellow fluorescent protein*). Beide Fluorophore sind über Calmodulin und das M13-Peptid miteinander verbunden, wobei D3cpv mutierte Varianten von Calmodulin und M13 aufweist. Eine Bindung von Ca²⁺ an Calmodulin führt zu einer Konformationsänderung der beiden Fluorophore zueinander, so dass eine FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-induzierte Donoremission des cpVenus auftritt [126]. Beide Ca²⁺-Sensoren verfügen über Signalsequenzen zum Import in die mitochondriale Matrix (nicht gezeigt). Schemata modifiziert nach A: EMBL (<https://www.embl.de/eamnet/html/calcium/proteins/camgaandpericams.htm>); B: Drago *et al.*, 2008.

Zur Messung der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration wurden die Deckgläser mit den Zellen nach der Transfektion mit Pericam MT bzw. D3cpv und einer Transfektionszeit von 48 h in die Messkammer eingespannt und einmalig mit 500 µl auf 37°C vorgewärmter Ringer-Lösung mit 1 mM Ca²⁺ gespült (Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 10). Für die Messung wurden erneut 500 µl vorgewärmte Ringer-Lösung mit 1 mM Ca²⁺ zu den Zellen gegeben. Die nachfolgenden Messungen fanden in einem auf 37°C vorgewärmten, inversen Inkubationsfluoreszenzmikroskop Observer Z1 (Carl Zeiss AG) statt. Die zur Fluoreszenzmessung verwendeten Filter waren Filter Nr. 46 HE (Carl Zeiss AG) für Pericam MT und Filter Nr. 54 HE (Carl Zeiss AG) für D3cpv. Zur Steuerung der Temperatur dienten eine *Heating Unit XL S* sowie ein *TempModule S* der Carl Zeiss AG. Für die Messung des mitochondrialen Ca²⁺ wurde zunächst fluoreszenzmikroskopisch ein Ausschnitt auf dem Deckglas ausgewählt, der möglichst viele transfizierte Zellen enthielt. Dazu wurde mit einer Anregungswellenlänge von 420 nm die Fluoreszenzemission des YFP beobachtet und die Fokusebene eingestellt. Die zu messenden Zellen wurden mithilfe der Mikroskop-Software AxioVision (Zeiss) als ROI (*Region of interest*) markiert und eine Hintergrundmessfläche im

zellfreien Bereich gesetzt. Insgesamt wurde die Messung mit vier Ausschnitten auf jedem Deckglas wiederholt. Ziel der Messung war es, über einen Messzeitraum von vier Minuten die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration im Gleichgewicht zu erfassen. Alle Lösungen, die während der Messungen zu den Zellen gegeben wurden, waren auf 37°C vorgewärmt. Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die Zugabe von Ionomycin bzw. EGTA unterschieden sich zwischen Pericam MT und D3cpv, daher erfolgt im Weiteren eine getrennte Aufführung beider Messabläufe.

Pericam MT wurde mit einer Wellenlänge von 420 nm angeregt, was nah am Anregungsmaximum des nicht Ca^{2+} -gebundenen Pericam MT (415 nm) lag [123]. Die zweite zur Exzitation des Pericam MT verwendete Wellenlänge lag bei 505 nm und somit nah am Anregungsmaximum der Ca^{2+} -gebundenen Form des Pericam MT mit 494 nm [123]. Die Belichtungszeiten wurden so gewählt, dass keine Übersättigung bei der Aufnahme der emittierten Fluoreszenzsignale eintrat. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 600-800 ms. Schließlich wurde der Quotient der um das Hintergrundsignal korrigierten Emissionsintensitäten von F505/420 nm berechnet, so dass sich ratiometrische Messwerte ergaben. Zur Kontrolle, ob der Ca^{2+} -Sensor auf steigende Ca^{2+} -Konzentrationen reagiert, wurde nach jeder Messung des letzten Zellausschnittes eines Deckglases nach 1,5 Minuten Messzeit Ringer-Lösung mit einer Endkonzentration von 1 mM Ca^{2+} und 10 μM Ionomycin zu den Zellen gegeben. Bei der mit Pericam MT transfizierten WT-Zelllinie wurde zusätzlich nach 7 Minuten Messzeit EGTA in einer Endkonzentration von 1 mM zu den Zellen pipettiert, um zu testen, ob der Sensor auf verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen reagiert.

Im Falle des mitochondrialen Ca^{2+} -Sensors D3cpv wurde mit einer Anregungswellenlänge von 420 nm das CFP (*Cyan fluorescent protein*) angeregt und die Emissionsspektren von CFP bzw. YFP (*Yellow fluorescent protein*) gemessen. Die Belichtungszeit von CFP lag bei 100 ms. Dabei spiegelt eine Emission im Emissionsbereich von CFP die Ca^{2+} -ungebundene Form des D3cpv wider, während die FRET-induzierte Akzeptoremission des YFP die Ca^{2+} -gebundene Form des D3cpv darstellt [126]. Durch die um das Hintergrundsignal korrigierten Emissionsintensitäten ließ sich dann der Quotient YFP/CFP bilden und so ratiometrische Werte für die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration berechnen.

Bei den mit D3cpv transfizierten Zellen wurde beim letzten Zellausschnitt nach 4 Minuten Messzeit Ringer-Lösung mit einer Endkonzentration von 1 mM Ca^{2+} und 10 μM Ionomycin zu den Zellen gegeben, um zu kontrollieren, ob D3cpv auf steigende mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen reagiert. Zur Kontrolle des Sensors hinsichtlich seiner Fähigkeit eine verminderte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration anzuzeigen, wurde nach 9 Minuten Ringer-Lösung mit einer Endkonzentration von 4 mM EGTA hinzugegeben.

Bei den ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen sowohl mit Pericam MT als auch mit D3cpv wurden Zellen mit stark abweichenden Quotienten, welche oft auf apoptotischen bzw. nekrotischen Ereignissen beruhten, ausgeschlossen.

3.2.3. Bestimmung der Proteinabundanz mittels Immunoblot

3.2.3.1. Zellernte und Herstellung von 1% Triton X-100 Lysaten

Tabelle 17: Zusammensetzung des 1 x PBS-Puffers.

Zellernte	Konzentration
<u>1 x PBS pH 7,4</u>	
ddH ₂ O	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat	10 mM
Der pH-Wert wurde mit HCl (1 M) auf 7,4 eingestellt. Lagerung bei 4°C.	

Zur Untersuchung der Proteinabundanz verschiedener Ca^{2+} -regulierender Proteine war es zunächst notwendig, HeLa-Zellen zu ernten und Zelllysate herzustellen. Dazu wurden alle vier Zelllinien jeweils in zwei parallelen Ansätzen in Zellkulturschalen (100 x 20 mm) so ausgesät, dass nach ca. 40 h Subkonfluenz erreicht war. Bei jeweils einer Schale jeder Zelllinie wurde ca. 16 h vor der Zellernte Oleat hinzugegeben (siehe Kapitel 3.2.1.2), um die LT-Biogenese zu induzieren [65]. Nach Entnahme der subkonfluenten HeLa-Zellen aus dem Inkubator erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis, um die Proteaseaktivität zu minimieren. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und 10 ml kaltes 1 x PBS pH 7,4 (siehe Tabelle 17) am Rand der Zellkulturschale zu den Zellen gegeben. Dann wurde das 1 x PBS pH 7,4 abgesaugt und 1 ml kaltes 1 x PBS pH 7,4 hinzugegeben. Zur mechanischen Lösung der Zelladhärenzen vom Boden der Zellkulturschale kam ein Zellkulturschaber zum Einsatz. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurden in Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt. Eine anschließende Zentrifugation bei 500 x g für 4 Minuten bei 4°C führte zur Sedimentierung der HeLa-Zellen, so dass der Überstand abgesaugt werden konnte. Im nächsten Schritt wurden 250 µl des frisch mit PMSF (Carl Roth GmbH + Co. KG, Katalognummer: 6367.1) und *Complete EDTA-free protease inhibitor* (Hoffmann-La Roche AG) versetzten 1% Triton X-100 Lysepuffers (siehe Tabelle 18) zu den Zellpellets gegeben und die Zellen durch vorsichtiges Entlangziehen an einem Reaktionsgefäßständer bis zur vollständigen Lösung des Zellpellets resuspendiert. Zur eigentlichen Lyse der Zellen folgte eine 10-minütige

Inkubation auf Eis. Triton X-100 gehört zu den nicht-ionischen Zelldetergentien und führt zur Lyse der Plasmamembran [31], wobei die nukleäre Membran in der Regel ihre Integrität behält [74]. Um unaufgebrochene Zellen sowie Zellkerne vom Lysat zu trennen, wurde eine Zentrifugation mit 13000 x g für 10 Minuten bei 4°C durchgeführt. Schließlich wurden die Zellysate in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 18: Übersicht über die Zusammensetzung des 1% Triton X-100 Lysepuffers. Der 1% Triton X-100 Lysepuffer wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. PMSF und *Complete EDTA-free protease inhibitor* wurden erst kurz vor Verwendung des 1% Triton X-100 Lysepuffers hinzugegeben.

Zellaufschluss	Konzentration	Volumen
<u>1% Triton X-100 Lysepuffer (50 ml)</u>		
1 M HEPES/KOH pH 7,5 (sterilfiltriert)	50 mM	2,5 ml
5 M NaCl	150 mM	1,5 ml
10% Triton X-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG)	1% (v/v)	5 ml
50% Glycerin	10%	10 ml
0,5 M EDTA/NaOH pH 8,0 (sterilfiltriert)	1 mM	100 µl
Milli-Q-Wasser (Es wurde 1/50 vom Gesamtvolumen weggelassen, um später frisch Proteaseinhibitoren zuzugeben.)		ad 49 ml
Sterilfiltriert und gelagert bei 4°C.		
<u>Frisch zugeben</u> (für 2 ml gebrauchsfertigen 1% Triton X-100 Lysepuffer):		
1% Triton X-100 Lysepuffer		1952 µl
250 mM PMSF	1 mM	8 µl
<i>Complete EDTA-free protease inhibitor</i> 50 x Stock	1 x	40 µl

3.2.3.2. Proteinmengenbestimmung mittels BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration kam ein Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz. Es wurde entsprechend der Herstellervorgaben verfahren. Der Test wurde von Smith *et al.* im Jahre 1985 entwickelt und beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ an Peptidbindungen in alkalischer Umgebung. Bicinchoninsäure bindet

spezifisch an das reduzierte Cu^{1+} , wobei sich ein stabiler Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm ausbildet. Die Zunahme der Absorption verhält sich dabei über einen großen Bereich proportional zu der Proteinkonzentration [157].

Anschließend wurden die Proben mit 1% Triton X-100 Lysepuffer und 4 x Laemmli-Probenpuffer auf eine Proteinkonzentration von 30 bzw. 40 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ eingestellt. Es folgte das einmalige Erhitzen der Proben für 10 Minuten bei 65°C, um eine vollständige Denaturierung der in den Proben enthaltenen Proteine sicher zu stellen.

3.2.3.3. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese

Tabelle 19: Übersicht über die zur (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendeten Puffer und Gele.

(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Konzentration/Volumen
<u>4 x Laemmli-Probenpuffer</u>	
TRIS/HCl pH 6,8	200 mM
SDS	8% (w/v)
Glycin	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,04% (w/v)
<u>Frisch zugeben:</u>	
1 M DTT (bei -20°C gelagert)	200 mM
<u>SDS-Laufpuffer (in ddH₂O)</u>	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	3,47 mM
<u>4% Sammelgel (4 Gele)</u>	
ddH ₂ O	4,8 ml
0,5 M TRIS/HCl pH 6,8	2 ml
30% Acrylamid, 37,5:1	1,08 ml
10% SDS	80 μl
TEMED	8 μl
10% APS	80 μl

<u>10% Trenngel (4 Gele)</u>	
ddH ₂ O	8,96 ml
2 M TRIS/HCl pH 8,8	4 ml
30% Acrylamid, 37,5:1	6,64 ml
10% SDS	200 µl
TEMED	16 µl
10% APS	160 µl

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Diese basiert auf dem anionischen Detergens SDS, welches durch Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zur Linearisierung der Polypeptidketten führt [144]. Zusätzlich sorgt das im Probenpuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) durch Reduktion von Disulfidbrücken für eine Auflösung der Tertiärstruktur [72]. Durch die Bindung von SDS, welche weitgehend proportional zu steigenden Molekulargewichten zunimmt, erhalten alle Protein-SDS-Komplexe eine negative Ladung, welche die Eigenladungen der Proteine überdeckt [144]. Durch Anlegen einer Spannung an ein SDS-Gel, welches je nach Konzentration des Polyacrylamids über unterschiedlich große Poren verfügt, lassen sich die von SDS umhüllten Proteine nach ihrer Größe auftrennen. Je kleiner das Molekulargewicht des aufzutrennenden Proteins, desto schneller läuft es im Polyacrylamid in Richtung zur Anode [144]. Für eine bessere Auftrennung der Proteine im SDS-Gel kam ein diskontinuierliches Gel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, zur Verwendung [89].

In dieser Arbeit kamen sowohl selbst hergestellte 10% Gele als auch von Bio-Rad Laboratories, Inc. erworbene Mini-Protean® TGX™ Precast Gels 4-15% Gradientengele zum Einsatz. Die Herstellung der 10% Gele erfolgte durch Gießen des 10% Trenngels und Überschichtung mit Isopropanol (siehe Tabelle 19). Nach ca. 15 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert und es folgte die Überschichtung mit dem 4% Sammelgel nach dem Entfernen des Isopropanols. In das 4% Sammelgel wurde ein Gelkamm gesteckt, der zur Formierung der Geltaschen führt. Nach weiteren 15 Minuten war auch das Sammelgel auspolymerisiert und es folgte die Lagerung unter feuchten Bedingungen bei 4°C, um ein Austrocknen der Gele zu vermeiden. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele in die mit SDS-Laufpuffer versetzten MiniProtean® Tetra Cell Laufkammern (Bio-Rad Laboratories, Inc.) eingespannt und die Taschen mit jeweils 15 µl Probe befüllt, was einer Proteinmenge von 30 bzw. 40 µg entsprach. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufzutrennenden Proteine wurde zusätzlich ein „Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard“ der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. aufgetragen. Zunächst wurde für das Einlaufen der

Proben mithilfe des Power Pac HC (Bio-Rad Laboratories, Inc.) eine Spannung von 70 V für 20 Minuten an das Gel angelegt, bevor für 80 Minuten bei 140 V weiter aufgetrennt wurde. Es folgte der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm).

3.2.3.4. Immunoblot

Tabelle 20: Übersicht über die Zusammensetzung der für den Immunoblot verwendeten Puffer und Färbelösungen.

Immunoblot	Konzentration
<u>Transferpuffer</u>	
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol (frisch zugeben)	20% (v/v)
<u>TBS-T</u>	
TRIS/HCl (pH 7,5)	20 mM
NaCl	137 mM
Tween-20	0,2% (v/v)
<u>Ponceau Färbelösung</u>	
Ponceau S	0,2% (w/v)
Trichloressigsäure	3% (w/v)
Sulfosalicylsäure	3% (w/v)
<u>Blockierlösung</u>	
Magermilchpulver (Sucofin®)	5% (w/v)
1 x TBS-T	ad 100% (v/v)

Zum elektrophoretischen Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm) wurde ein „*semi-dry Blot*“ eingesetzt [104]. Hierbei wurde in Sandwich-Bauweise ein Blottingpapier, das Gel, die Nitrocellulosemembran und ein zweites Blottingpapier zusammengesetzt (Abbildung 10), wobei alle Bestandteile vor dem Zusammenbau in Transferpuffer (siehe Tabelle 20) äquilibriert worden waren. Mit den beiden mit Transferpuffer angefeuchteten Blottingpapieren bestehen auf beiden Seiten direkte Kontakte zu der Anode bzw. Kathode. Durch Anlegen einer Spannung von 20 V für 30 Minuten im Trans Blot Turbo Transfer-System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) wurden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert.



Abbildung 10: Schematischer Aufbau des elektrophoretischen Transfers der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran im Trans Blot Turbo Transfer-System der Firma Bio-Rad. Die Proteine werden durch ihre vom SDS induzierte negative Ladung in Richtung der Anode (+) vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Die Transferrichtung ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Um die Effizienz des Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran zu überprüfen, wurde diese direkt nach dem Blotten für 10 Minuten mit Ponceau-Färbelösung gefärbt. Die Ponceau-Färbelösung bindet dabei reversibel an positiv geladene Aminogruppen, wodurch ab Proteinmengen von >200ng pro Bande eine rötliche Bande sichtbar wird [61]. Das Bandenmuster wurde mittels Scanner festgehalten und die Ponceau-Färbelösung anschließend wieder mit Milli-Q-Wasser ausgewaschen. Vor dem Auswaschen erfolgte gegebenenfalls noch der Zuschnitt der Membran mittels Skalpell.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran erfolgte eine Inkubation mit Blockierlösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde der primäre Antikörper (in Blockierlösung) für 2 h bei RT zu der Nitrocellulosemembran gegeben. Nach Abnahme des Primärantikörpers wurde fünfmal für 5 Minuten mit je 10 ml 1 x TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (in Blockierlösung) für 1 h, der anschließend verworfen wurde. Nach wiederholten 5 Waschschritten mit je 10 ml 1 x TBS-T für je 5 Minuten wurde die Membran zur Detektion der fluoreszenzmarkierten Proteine vom LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences GmbH) mittels verschiedener Laser angeregt und die Fluoreszenzsignale aufgenommen. Die in dieser Arbeit verwendete Detektion der Fluoreszenz der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper wies gegenüber der Detektion der Chemilumineszenz den Vorteil eines größeren quantifizierbaren linearen Detektionsprofils auf [60]. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mithilfe der Software Image Studio Lite 2 (LI-COR Biosciences GmbH). Bei der Quantifizierung wurde auf das Fluoreszenzsignal der Ladekontrolle Tubulin normalisiert.

Eine Übersicht der bei der Immundetektion verwendeten Antikörper ist Tabelle 21 und Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 21: Übersicht über verwendete Primärantikörper. Die Abkürzung MG bezeichnet das geschätzte Molekulargewicht (*predicted molecular weight*) des zu detektierenden Proteins.

Name	Art.-Nr.	Hersteller	Spezies	Verdünnung	MG
Anti-IP3R3	BD 610313	BD Biosciences	Maus	1:1000	304 kDa
Anti-MCU	HPA016480	Sigma-Aldrich	Kaninchen	1:1000	40 kDa
Anti-NCLX	ab83551	abcam	Kaninchen	1:1000	64 kDa
Anti-PEX19	ab137072	abcam	Kaninchen	1:1000	33 kDa
Anti-PMCA	5F-10 MA3-914	Invitrogen	Maus	1:1000	140 kDa
Anti-SERCA	S1439	Sigma-Aldrich	Maus	1:1000	110 kDa
Anti-STIM1	11565-1-1AP	Proteintech	Kaninchen	1:1000	77 kDa
Anti-Total OXPHOS	ab110413	abcam	Maus	1:500	15-55 kDa
Anti-Tubulin	T6199	Sigma-Aldrich	Maus	1:10 000	50 kDa
Anti-Tubulin	ab6046	abcam	Kaninchen	1:500	50 kDa
Anti-VDAC	PC548	Calbiochem	Kaninchen	1:1000	31 kDa

Tabelle 22: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Art.-Nr.	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-Maus IRDye® 800CW	925-32210	LI-COR	Ziege	1:15000
Anti-Kaninchen IRDye® 800CW	925-32211	LI-COR	Ziege	1:15000
Anti-Maus IRDye® 680LT	925-68020	LI-COR	Ziege	1:20000
Anti-Kaninchen IRDye® 680LT	925-68021	LI-COR	Ziege	1:20000

3.2.4. Statistik

Zur Signifikanzberechnung der gemessenen Daten wurde sowohl bei den Fura-2-AM basierten Messergebnissen als auch bei den mit mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren gewonnenen Daten der Kolmogorov-Smirnov-Test eingesetzt. Da die gewonnenen Daten in der Regel nicht normalverteilt vorlagen sowie ungepaart waren, erwiesen sie sich als geeignet für die Auswertung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test [99]. Dazu wurden alle Messergebnisse jeder einzelnen Zelle der einen Zelllinie mit allen Messergebnissen jeder einzelnen Zelle der anderen Zelllinie unter einer spezifischen Messbedingung (z.B. Demaskierung des ER- Ca^{2+} -Lecks mittels Thapsigargin-Gabe) miteinander verglichen und hinsichtlich ihrer gleichen Verteilung untersucht. Diese Art der statistischen Auswertung von Fura-2-AM basierten Messdaten der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt auch in einer aktuellen Publikation zur Verwendung [56]. Zur Berechnung statistischer Signifikanzniveaus der durch Immunoblots ermittelten Proteinabundanz wurde der Welch-Test für normalverteilte und ungepaarte Daten mit ungleicher Varianz verwendet. Die Signifikanzniveaus waren bei allen statistischen Testungen wie folgt definiert:

*** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Eine alternative Signifikanzberechnung der Messergebnisse hätte darin bestanden, die arithmetisch gemittelten Messergebnisse aller Zellen einer Zelllinie pro Messtag in die Berechnung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test einzubringen. Allerdings hätte die Subsumierung aller Einzelzellmessergebnisse auf arithmetische Mittelwerte pro Messtag zum Verlorengehen von vielen Einzelzellmessdaten in der Berechnung der Signifikanz geführt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit entschieden die Signifikanzberechnung auf Grundlage von Einzelzellmessergebnissen durchzuführen. Damit einhergehend war die kritische Überprüfung der erhobenen signifikanten Unterschiede auf ihre biologische Relevanz.

4. Ergebnisse

Zur Identifizierung PEX19-abhängiger Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase wurden verschiedene HeLa-Zellen untersucht. Eine HeLa Wildtyp-Zelllinie (WT), eine HeLa PEX19-*knockout*-Zelllinie (PEX19^{-/-}) sowie eine PEX19^{-/-}-Zelllinie, welche eine stabile Integration eines Gens zur Expression eines farnesylierungsdefizienten PEX19 (PEX19_{C296S}) aufwies und als HeLa PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} bezeichnet wird [151]. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie genutzt, im Folgenden als Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie benannt. Mit der Untersuchung der verschiedenen HeLa-Zelllinien in den nachfolgenden Experimenten sollte es die Möglichkeit geben etwaige zu beobachtende Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase mit dem Vorhandensein eines wildtypischen PEX19, des Fehlens von Peroxisomen oder eines veränderten LT-Proteoms zu korrelieren. Zudem wurden die Ca^{2+} -Messungen immer mit Zellen unter basalen Bedingungen ohne Oleat-Behandlung und nach Oleat-Behandlung der Zellen durchgeführt. Da Oleat zur vermehrten Synthese von Triacylglycerolen und damit zu einer gesteigerten Lipidtröpfchen (LT)-Biogenese führt [95], sollten unter Oleat-Behandlung Effekte durch PEX19-abhängige Proteinzielsteuerungen zu LT stärker zum Tragen kommen.

4.1. Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Bildgebung

Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase in der WT-, PEX19^{-/-}- sowie Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie wurde zunächst eine Fura-2-AM basierte Messmethode verwendet. Dabei wird das zytosolische Ca^{2+} vor, während und nach Zugabe von pharmakologischen Substanzen zur Modulation der Ca^{2+} -Homöostase gemessen (siehe Kapitel 3.2.2.1).

4.1.1. Bestimmung der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von PEX19

Um zu untersuchen, ob die Deletion bzw. Mutation von PEX19 Effekte auf die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration hat, wurde nach 1 Minute Messzeit 10 μM Ionomycin hinzugegeben, welches alle zellulären Membranen permeabel für Ca^{2+} macht [96]. Der resultierende Efflux von Ca^{2+} aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in das Zytosol [125] lässt direkte Rückschlüsse auf die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu. Voraussetzung für diesen Versuch war eine Messung in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Messlösung, da sonst durch Permeabilisierung extrazelluläre Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol gelangen würden.

Wie in Abbildung 11B erkennbar, kam es nach Ionomycin-Gabe zu einem raschen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf 1200 bis 1500 nM in allen Zelllinien. Etwa 1 Minute nach Ionomycin-Gabe wurden in der WT-, PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie wieder basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen von etwa 80-100 nM beobachtet (Abbildung 11B). Für die Maxima nach Ionomycin-Gabe lassen sich Delta berechnen, die die Differenz vom niedrigsten Punkt zum höchsten Punkt der Ca^{2+} -Messung über die Zeit jeder Zelllinie widerspiegeln. Die Delta-Werte waren zwischen der WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie Kl. 15 vergleichbar, lediglich Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte ein signifikant erhöhtes Delta im Vergleich zur WT-Zelllinie und damit einen höheren initialen Efflux von Ca^{2+} ins Zytosol (Abbildung 11C). Zur Erfassung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit ließ sich zudem die Fläche unter der Kurve (AUC) für jede Zelllinie berechnen und auf die WT-Zelllinie normieren. Hierbei ließen sich statistisch signifikante Reduktionen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen von ca. 10% in der PEX19^{-/-}-, Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}- sowie Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie über die Zeit ermitteln (Abbildung 11D).

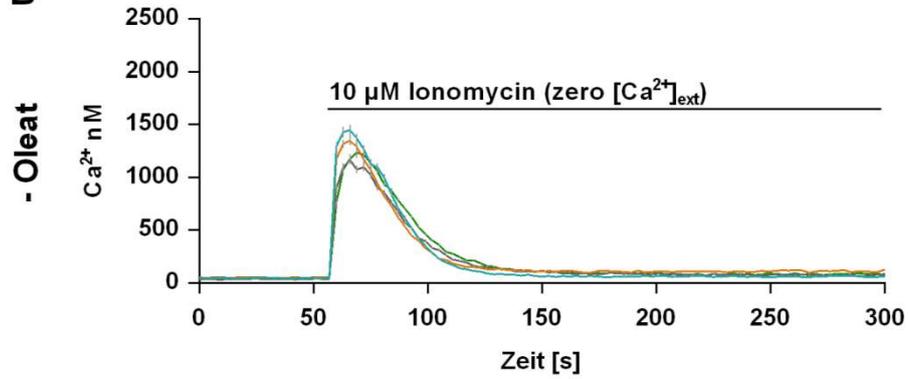
Vergleicht man die Messungen zur gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in unbehandelten Zellen nun mit den Messungen zur gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in Oleat-behandelten Zellen, ist zu beobachten, dass nach Ionomycin-Gabe die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der WT-Zelllinie auf bis zu 2000 nM anstieg (Abbildung 11E). Die PEX19^{-/-}- und die beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigten dagegen vergleichbare zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen von ca. 1300-1500 nM nach Ionomycin-Gabe (Abbildung 11E) wie die unbehandelten Zelllinien (Abbildung 11B) und damit deutlich niedrigere Konzentrationen an Ca^{2+} im Zytosol im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie (Abbildung 11E). Ungefähr nach 1 Minute ließen sich in der WT-, PEX19^{-/-}- und den Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie wieder basale Ca^{2+} -Konzentrationen detektieren (Abbildung 11E). Der Unterschied zwischen der WT-Zelllinie und der PEX19^{-/-}- bzw. der beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeichnete sich auch im Delta der Maxima ab, so zeigten die PEX19^{-/-}- und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie eine signifikante Reduktion um ca. 35% der initial nach Ionomycin-Gabe zu messenden zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen (Abbildung 11F). Dieser Unterschied konnte auch in den berechneten Flächen unter den Kurven beobachtet werden, so waren die PEX19^{-/-}- und die beide Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit ihrer berechneten AUC von ca. 70% deutlich unter den 100% der WT-Zelllinie (Abbildung 11G).

Zusammenfassend zeigten sich vergleichbare zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen nach Ionomycin-Gabe im Vergleich der WT- mit der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und des Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne Induktion der LT-Biogenese, lediglich Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie wies eine signifikante Erhöhung des Delta des Maximums im Vergleich zur WT-Zelllinie auf. Die Auswertung der Flächen unter den Kurven führte in allen Zellen ohne wildtypisches PEX19 zu einer signifikant reduziert gemessenen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit, wobei die absolute Reduktion hier bei maximal 10% im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie lag. In allen Oleat-behandelten Zelllinien ließ sich bei Abwesenheit von wildtypischem PEX19 eine Reduktion im gesamtzellulären Ca^{2+} -Gehalt im Vergleich zur ebenfalls Oleat-behandelten WT-Zelllinie beobachten, was sich sowohl in den Delta der Maxima als auch in den AUC widerspiegelte. Während also eine Akkumulation von LT durch Oleat-Behandlung in WT-Zellen mit einer vermehrten intrazellulären Speicherung von Ca^{2+} einherging, war dies in den Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 nicht der Fall. So verblieben bei $\text{PEX19}^{-/-}$ und den beiden Klonen von $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ die gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentrationen auf dem Niveau der Zelllinien ohne Induktion der LT-Biogenese. Da das endoplasmatische Retikulum (ER) mit einer lumenalen Ca^{2+} -Konzentration von bis zu 1,5 mM den größten intrazellulären Ca^{2+} -Speicher der Zelle darstellt [168], sollte im nächsten Schritt die Frage adressiert werden, ob der höhere intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt in der WT-Zelllinie nach Oleat-Behandlung durch eine höhere ER- Ca^{2+} -Konzentration erklärbar ist.

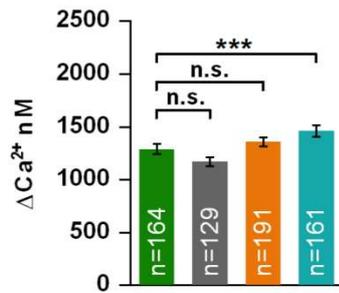
A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

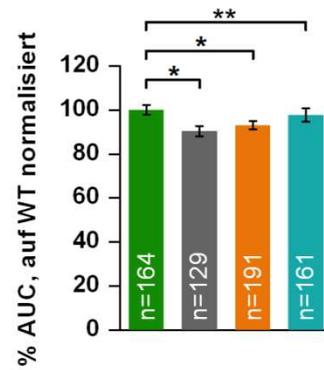
B



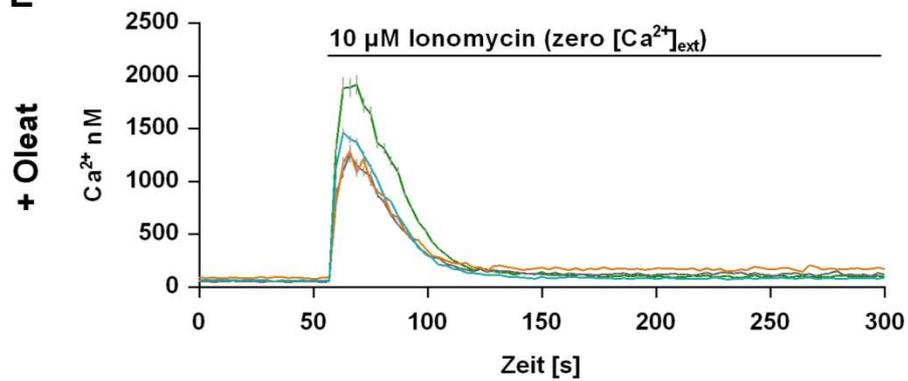
C



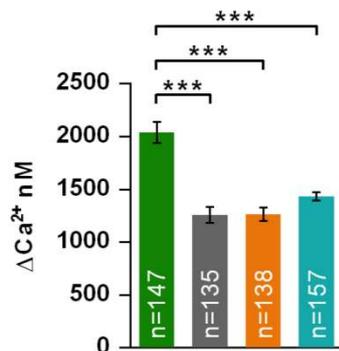
D



E



F



G

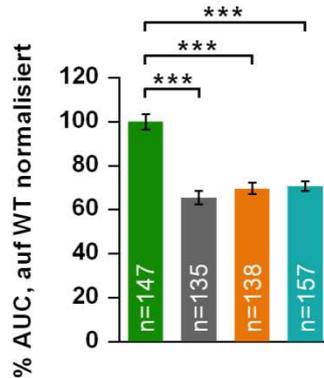


Abbildung 11: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Ionomycin-Zugabe in WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinien. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Bestimmung erfolgte Fura-2-AM-basiert durch Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin [10 μM] in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung sowohl bei unbehandelten Zellen (B-D) als auch bei Oleat-behandelten Zellen (E-G). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Ionomycin-Gabe erfolgte nach einer Messzeit von 1 Minute, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Außerdem wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) des zeitlichen Verlaufes der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (57-150 s) für jede Zelllinie berechnet und auf die Messungen in der entsprechenden WT-Zelllinie ohne bzw. nach Oleat-Behandlung normiert (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen (Unbehandelt N = 4 (außer PEX19^{-/-} N = 3)/Oleat-behandelt N = 3) mit ihren SEM. N = Biologische Replikate; n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. ***p \leq 0,001, **p \leq 0,01, *p \leq 0,05, n.s. = nicht signifikant.

4.1.2. Ein reduziertes ER- Ca^{2+} -Leck in Zellen ohne wildtypisches PEX19

Nachdem die Messergebnisse zur gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in Oleat-behandelten Zellen der PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen implizierten, sollte nun überprüft werden, ob eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Phänotyps in einer Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration in einem Ca^{2+} -speichernden Organell besteht. Da das ER der größte intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher der Zelle ist [168], sollte als erstes überprüft werden, ob im ER eine veränderte Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von wildtypischem PEX19 nachgewiesen werden kann. Dazu wurde ein indirektes Fura-2-AM-basiertes Experiment gewählt, bei dem durch Zugabe von Thapsigargin, einem irreversiblen Hemmer der SERCA-Pumpe [5], das passive kontinuierliche ER- Ca^{2+} -Leck demaskiert wird [91]. Dabei lässt sich einerseits direkt der Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol messen und andererseits indirekt auf die ER- Ca^{2+} -Konzentration schließen, da es durch die Verwendung von Thapsigargin zu einer kompletten Entleerung des ER- Ca^{2+} ins Zytosol kommt [6]. Neben der Entleerung des ER- Ca^{2+} kommt es aber zusätzlich noch zu einer Aktivierung des SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) [6]. Diese Aktivierung führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, wodurch das ER wieder mit Ca^{2+} aufgefüllt werden kann [134,159]. Um diesen Effekt zu vermeiden, war es notwendig die Messung in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Messlösung durchzuführen.

Die Thapsigargin-Gabe (1 μM) führte innerhalb weniger Sekunden zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der WT-Zelllinie auf ca. 600 nM (Abbildung 12B). Im Vergleich zur WT-Zelllinie fielen die Anstiege der Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol der

PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit Maximalwerten von ca. 500 nM geringer aus (Abbildung 12B). Basale zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen von etwa 50 nM wurden in allen Zelllinien innerhalb von etwa 3 Minuten wieder erreicht (Abbildung 12B). Bei der Auswertung der Delta der Maxima nach Thapsigargin-Gabe zeigten sich bei der PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie signifikant reduzierte zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen (Abbildung 12C). Zusätzlich wurde die AUC berechnet. In Bezug auf die PEX19^{-/-}- im Vergleich zur WT-Zelllinie zeigte sich eine signifikante Reduktion der AUC um 5% (Abbildung 12D). Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte ebenfalls eine signifikante Reduzierung der AUC um 7% im Vergleich zur WT-Zelllinie, während die AUC des Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie fast identisch mit dem AUC-Wert der WT-Zelllinie war (Abbildung 12D).

In Oleat-behandelten Zelllinien zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe von Thapsigargin (Abbildung 12E). Im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien (Abbildung 12B) zeigte sich jedoch ein anderer Kurvenverlauf bei den Oleat-behandelten Zelllinien. So ließen sich bei der WT- und beim Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nach Oleat-Behandlung die höchsten Anstiege des zytosolischen Ca²⁺ auf ca. 600 nM beobachten (Abbildung 12E). Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte zwar ein ähnliches Maximum wie ohne Oleat-Behandlung, jedoch ist der Kurvenverlauf nach Thapsigargin-Gabe deutlich breiter, was eine länger anhaltende Messung von zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen über dem Basalwert und somit einen verlängerten Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER indiziert (Abbildung 12B+E). Nur bei der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie ließ sich ein ähnlicher Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration beobachten wie ohne Oleat (Abbildung 12B+E). Die Auswertung der Delta der Maxima zeigte hier analog zu den beobachteten Maxima ohne Oleat-Behandlung für die Oleat-behandelten PEX19^{-/-}- und Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie signifikante Reduktionen des ER-Ca²⁺-Lecks um ca. 12% im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie (Abbildung 12C+F). Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte jedoch eine signifikante Erhöhung des initialen Ca²⁺-Ausstroms aus dem ER um ca. 5% verglichen mit der WT-Zelllinie (Abbildung 12F). Nach Berechnung der AUC zeigte nur noch die PEX19^{-/-}-Zelllinie eine signifikante Reduktion des über die Zeit aus dem ER ins Zytosol ausgetretenen Ca²⁺ im Vergleich zur WT-Zelllinie, denn bei beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ließen sich höhere zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen über die Zeit verglichen mit der WT-Zelllinie beobachten (Abbildung 12G).

Abschließend lässt sich sagen, dass der initiale Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER ins Zytosol ohne Oleat-Behandlung im Falle der WT-Zelllinie höher ausfällt als bei der PEX19^{-/-}-Zelllinie und

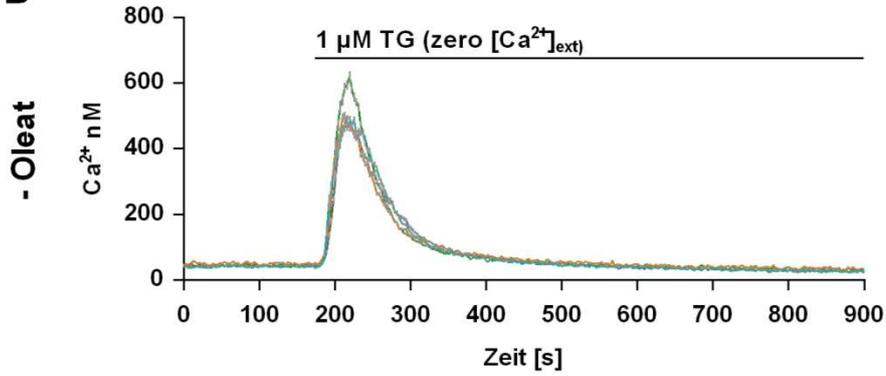
den beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Der gleiche Phänotyp lässt sich auch unter Oleat-Behandlung beobachten, mit der Ausnahme, dass hier Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine höhere initiale zytosolische Ca²⁺-Konzentration als die WT-Zelllinie aufwies. Anders verhielt es sich mit der Fläche unter der Kurve, also den über die Zeit aufsummierten gemessenen Ca²⁺-Konzentrationen im Zytosol. Ohne Induktion der LT-Biogenese waren die aufsummierten Ca²⁺-Konzentrationen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 im Vergleich zur WT-Zelllinie leicht reduziert oder nicht signifikant verändert. Nach Induktion der LT-Biogenese zeigten beide Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine erhöhte zytosolische Ca²⁺-Konzentration über die Zeit, wohingegen sich in der PEX19^{-/-}-Zelllinie eine erniedrigte zytosolische Ca²⁺-Konzentration über die Zeit im Vergleich zur WT-Zelllinie beobachten ließ.

Dieses Ergebnis ließ einen reduzierten ER-Ca²⁺-Ausstrom in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 vermuten, wenngleich auch der Oleat-behandelte Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie hier einen erhöhten ER-Ca²⁺-Ausstrom zeigte. Veränderungen der Ca²⁺-Konzentrationen im ER können potentiell auch durch eine Beeinflussung des wichtigsten Mechanismus zur Auffüllung der Ca²⁺-Ionen im ER, dem sogenannten SOCE, ausgelöst werden [134]. Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob farnesylierungsdefizientes bzw. deletiertes PEX19 Änderungen im SOCE bewirkt.

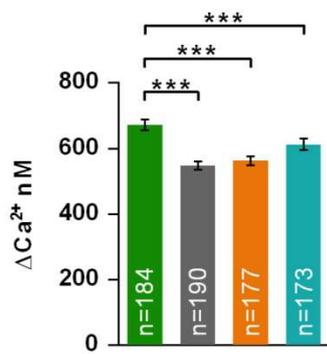
A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

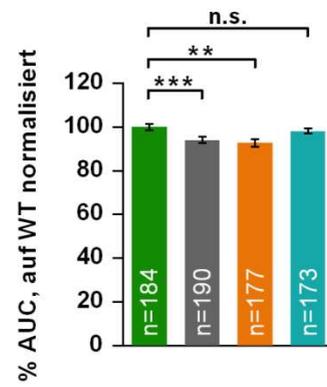
B



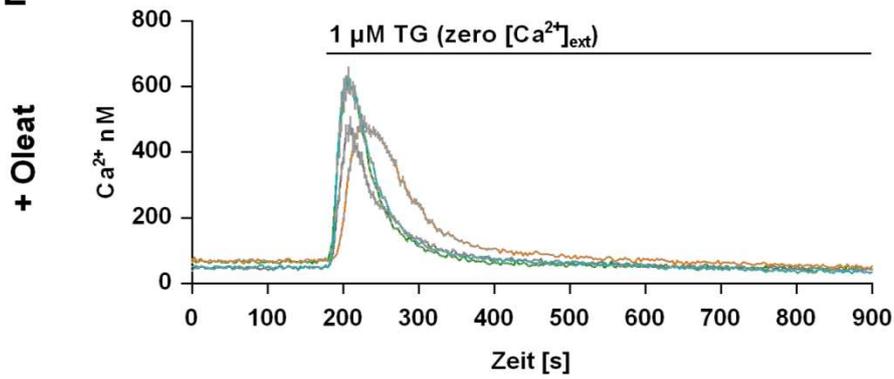
C



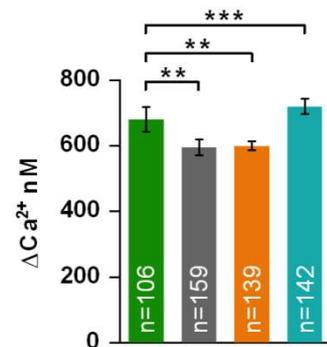
D



E



F



G

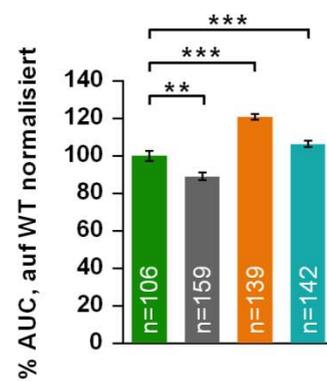


Abbildung 12: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin zu WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinien. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Die Quantifizierung des ER (Endoplasmatisches Retikulum)- Ca^{2+} -Lecks erfolgte Fura-2-AM-basiert durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung sowohl bei unbehandelten Zellen (B-D) als auch bei Oleat-behandelten Zellen (E-G). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Zusätzlich wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) des zeitlichen Verlaufes der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (177-399 s) für jede Zelllinie quantifiziert und auf die WT-Zelllinie ohne bzw. nach Oleat-Behandlung normiert (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen (Unbehandelt N = 4/Oleat-behandelt N = 3) mit ihren SEM. N = Biologische Replikate; n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. ***p \leq 0,001, **p \leq 0,01, n.s. = nicht signifikant.

4.1.3. Analyse des SOCE in Abhängigkeit von PEX19

Da in vorangegangenen Experimenten PEX19-abhängige Unterschiede im ER- Ca^{2+} -Leck ermittelt werden konnten, sollte nun untersucht werden, ob zwischen der WT-, PEX19^{-/-}- sowie Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ebenfalls Unterschiede im SOCE vorliegen. Denn der SOCE stellt den wichtigsten Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase im ER dar [134]. Hierfür wurden zunächst Fura-2-AM-basierte Experimente durchgeführt, bei denen es durch Zugabe von Thapsigargin zu einer Depletion des ER- Ca^{2+} ins Zytosol und infolgedessen zu einer Aktivierung des SOCE kam [6]. Voraussetzung zur Messung von aus dem Extrazellularraum in die Zelle einströmenden Ca^{2+} ins Zytosol war das Vorhandensein von Ca^{2+} im Messpuffer.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, zeigten sich bei der Kinetik der Thapsigargin-Antwort in allen unbehandelten als auch Oleat-behandelten Zelllinien Maxima nach Zugabe von Thapsigargin bei einer Messdauer von etwa 4 Minuten. Basale zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen wurden nach Thapsigargin-Zugabe weder bei der WT- noch bei der PEX19^{-/-}- oder den beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie innerhalb der Gesamtmessdauer von 15 Minuten wieder erreicht (Abbildung 13B+D).

Die Maxima nach Thapsigargin-Zugabe fielen in unbehandelten Zellen der WT-, PEX19^{-/-}- und Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne LT-Induktion mit ca. 2400 nM Ca^{2+} etwa gleich hoch aus (Abbildung 13B). Der Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte hier mit ca. 2000 nM Ca^{2+} als einziges einen niedrigeres Maximum nach Thapsigargin-Zugabe. Bei der Berechnung der Delta der Maxima wurde dieser Unterschied ebenfalls deutlich, wobei

sich hier bei beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie signifikant verminderte zu messende zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen ergaben (Abbildung 13C).

Nach Oleat-Behandlung erreichte das Maximum des Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit etwa 3000 nM die höchste zytosolische Ca²⁺-Konzentration im Vergleich zur WT-, PEX19^{-/-}- sowie Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Diese Beobachtung stellte sich bei Berechnung der Delta der Maxima jedoch als nicht signifikant erhöht im Vergleich zur WT-Zelllinie heraus (Abbildung 13D+E). Die WT-, die PEX19^{-/-}- und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie erreichten in etwa gleich hohe Maxima von ca. 2500 nM Ca²⁺ (Abbildung 13D). Bei den Berechnungen des Thapsigargin-induzierten Anstiegs der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der WT- und der PEX19^{-/-}- bzw. des Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie, aber in Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ließen sich signifikant niedrigere initiale zytosolische Ca²⁺-Konzentrationen im Vergleich zur WT-Zelllinie nach Thapsigargin-Gabe messen (Abbildung 13E).

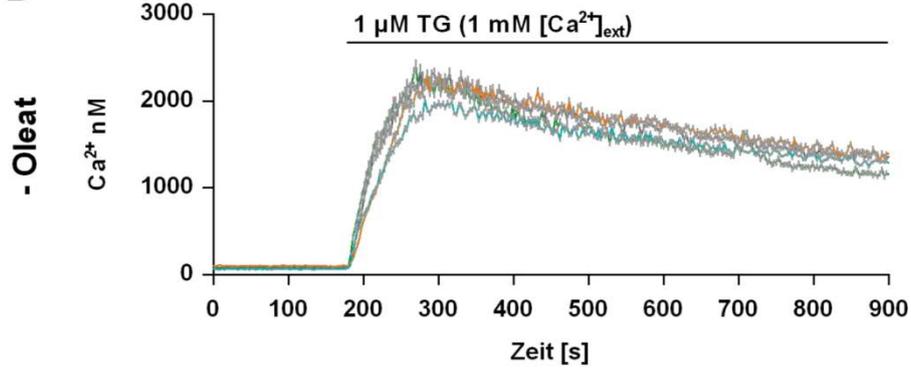
Bei genauerer Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration der WT-Zelllinie fiel auf, dass diese einen stärkeren Abfall der Ca²⁺-Konzentration im Zytosol über die Zeit im Vergleich zu den anderen Zelllinien zeigte (Abbildung 13B). Dieser Effekt wurde nach LT-Induktion nochmals verstärkt, hier trennt sich die Kurve der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration der WT-Zelllinie ungefähr beginnend ab 7 Minuten nach Thapsigargin-Zugabe weit von den Kurven der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration der PEX19^{-/-}- sowie beider Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ab, was in einer um etwa 700 nM geringeren zytosolischen Ca²⁺-Konzentration der WT-Zelllinie gegenüber der PEX19^{-/-}- und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie am Ende der Messung resultierte (Abbildung 13D).

Die ersten Experimente zur Untersuchung des SOCE zeigten damit eine veränderte SOCE-Antwort in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 auf, die in einer höheren zytosolischen Ca²⁺-Konzentration über die Zeit resultierte. Dieser Phänotyp ließ sich reproduzierbar nachweisen und war nach Induktion der LT-Biogenese erheblich stärker ausgeprägt. Zur besseren Differenzierung der durch Thapsigargin ausgelösten Depletion von ER-Ca²⁺ ins Zytosol und dem darauffolgenden Ca²⁺-Einstrom ins Zytosol durch einen aktivierten SOCE sollte ein veränderter Versuchsaufbau herangezogen werden, der eine verbesserte zeitliche Auftrennung der ER-Ca²⁺-Depletion und der SOCE-Antwort ermöglichen sollte.

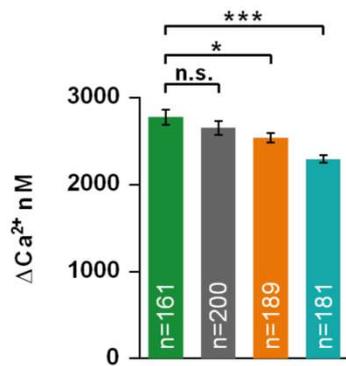
A

WT PEX19^{-/-} PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15 PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

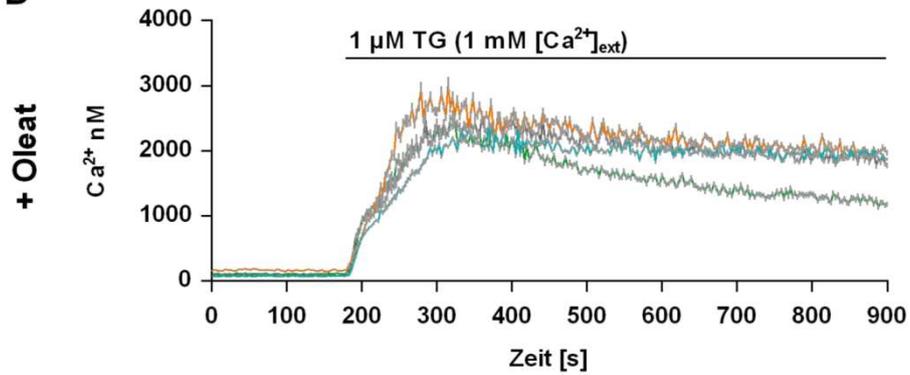
B



C



D



E

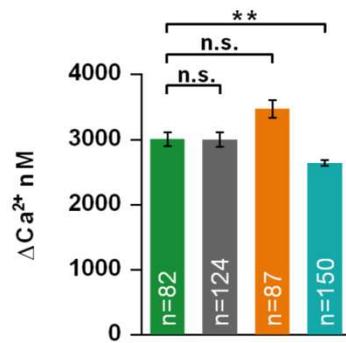


Abbildung 13: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin in WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinien. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, $\text{PEX19}^{-/-}$ sowie $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Durch Hinzugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [$1 \mu\text{M}$] in 1 mM Ca^{2+} enthaltender Ringer-Lösung sowohl bei unbehandelten Zellen (B-C) als auch bei Oleat-behandelten Zellen (D-E) wurde der SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) aktiviert. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen (Unbehandelt $N = 4$ (außer WT und $\text{PEX19}^{-/-}$ $N = 5$)/Oleat-behandelt $N = 3$) mit ihren SEM. N = Biologische Replikate; n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

4.1.4. Veränderung der SOCE-Antwort bei Fehlen von wildtypischem PEX19

Im folgenden Experiment wurde zunächst nach 3 Minuten Messzeit $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin hinzugegeben, um den ER- Ca^{2+} -Speicher zu leeren [6]. Im Unterschied zum vorherigen Experiment zur Untersuchung des SOCE befanden sich aber diesmal initial aufgrund nominal Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung als Messpuffer keine bzw. nur marginale Spuren von Ca^{2+} in der Messlösung. Um eine möglichst vollständige Entleerung von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol zu bewirken und die SOCE-Antwort erst zeitlich versetzt zur Thapsigargin-Gabe zu detektieren, erfolgte die Zugabe von 1 mM Ca^{2+} erst bei einer Messzeit von 15 Minuten. Dies ermöglichte auf der einen Seite die erneute Verifizierung des bereits in vorangegangenen Experimenten untersuchten ER- Ca^{2+} -Lecks und andererseits eine differenzierte Betrachtung der SOCE-Antwort.

Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der unbehandelten und der Oleat-behandelten Zelllinien lässt zwei Maxima erkennen, wovon das kleinere Maximum nach Thapsigargin-Gabe entstand und das größere Maximum nach Hinzugabe von Ca^{2+} in die Messlösung (Abbildung 14B+F). In den unbehandelten Zellen ist die Höhe des Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe in der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und in beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie reduziert (Abbildung 14B). Die Auswertung der Delta der Maxima ergab ein vergleichbares Bild, in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 war das initiale ER- Ca^{2+} -Leck um etwa 20% niedriger als bei Vorhandensein von wildtypischem PEX19 (Abbildung 14C). Analog dazu waren auch die ermittelten Flächen unter den Kurven der Maxima nach Thapsigargin-Gabe in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 signifikant niedriger als in der WT-Zelllinie (Abbildung 14D). Das zweite Maximum, induziert durch Zugabe von Ca^{2+} , führte insgesamt zu deutlich höheren

zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen von bis zu etwa 5000 nM Ca^{2+} für die WT-Zelllinie und bis zu ca. 3000 nM Ca^{2+} für die PEX19^{-/-}- und die beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie (Abbildung 14B). Dieser Phänotyp spiegelte sich auch in der Berechnung der Delta-Werte für das Maximum nach Ca^{2+} -Gabe wider, so konnten für die PEX19^{-/-}- und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie signifikante um etwa 40% reduzierte initial zu messende zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen nach Zugabe von Ca^{2+} in die Messlösung nachgewiesen werden (Abbildung 14E). Bei genauerer Betrachtung des weiteren zeitlichen Verlaufes der Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol fällt auf, dass alle Zelllinien eine zweistufige Kinetik im Abfall des zytosolischen Ca^{2+} aufzeigten. Die ersten 250 Sekunden nach Ca^{2+} -Zugabe war ein steilerer und nicht-linearer Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu beobachten als in den darauffolgenden 650 Sekunden. Ferner wies die WT-Zelllinie einen etwas stärker ausgeprägten Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf als die PEX19^{-/-}- und beide Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie, was insbesondere bei Betrachtung der Ca^{2+} -Konzentrationen am Messende sichtbar war (Abbildung 14B).

Beim Vergleich dieser Beobachtungen mit den Ergebnissen der Oleat-behandelten Zelllinien des WT, PEX19^{-/-} und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} fiel zunächst auf, dass die Maxima nach Thapsigargin-Gabe in allen Zelllinien höhere initial zu messende zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen indizierten als ohne Oleat-Behandlung (Abbildung 14F). Das Verhältnis der berechneten Delta der Maxima nach Thapsigargin-Gabe zwischen der WT-, PEX19^{-/-}- und der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie blieb jedoch vergleichbar mit denen der unbehandelten Zellen, so ließen sich in der PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie signifikant reduzierte initiale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe nachweisen (Abbildung 14G). Durch die Unterschiede in der Kurvenform der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen unmittelbar nach Thapsigargin-Gabe, ergaben sich für die berechneten Flächen unter den Maxima nach Thapsigargin-Gabe jedoch nur noch für die PEX19^{-/-}-Zelllinie eine signifikant um 10% verminderte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur WT-Zelllinie. Im Falle der beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie waren keine signifikanten Unterschiede der berechneten AUC im Vergleich zur WT-Zelllinie beobachtbar (Abbildung 14H). Damit bestätigten die Messungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe in der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie die im vorangegangenen Experiment gewonnenen Daten zum ER- Ca^{2+} -Leck (vergleiche Abbildung 12). Die Delta der Maxima bei beiden Oleat-behandelten Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie waren im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment diesmal im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie signifikant vermindert (vergleiche Abbildung 12). Bei der Berechnung der AUC erwies sich dieser Unterschied jedoch nicht mehr als signifikant (Abbildung 14H). Dennoch weisen die Ergebnisse auf eine reduzierte ER- Ca^{2+} -Konzentration

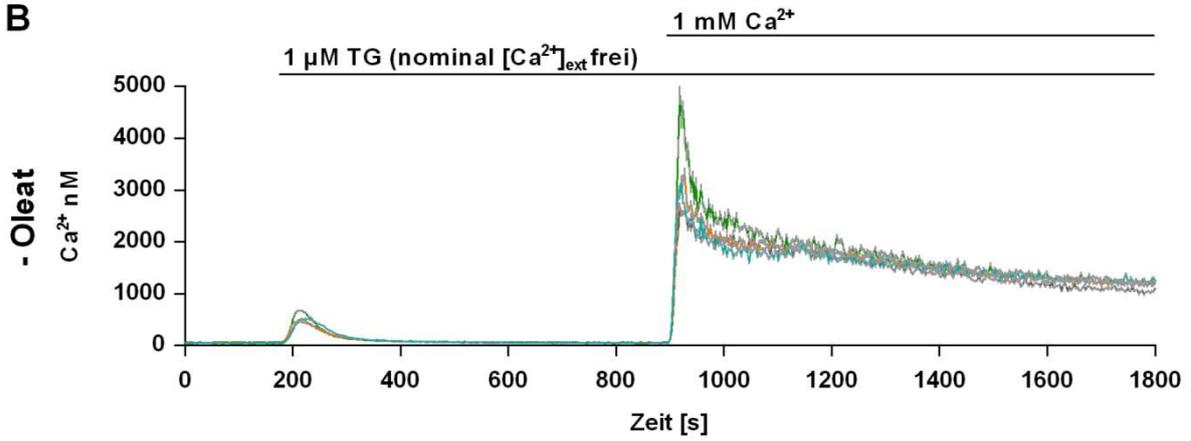
in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 hin. Nach Zugabe von Ca^{2+} waren in allen Oleat-behandelten Zelllinien in etwa vergleichbare Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen von etwa 3500 nM Ca^{2+} zu beobachten (Abbildung 14F). Die Berechnung der initialen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen ergab keine signifikanten Unterschiede für die PEX19^{-/-}- und Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie, nur Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie wies eine signifikante Reduzierung des Delta um 17% auf (Abbildung 14I). Die zweistufige Kinetik des Abfalls der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen, welche bereits in den unbehandelten Zellen beobachtet werden konnte, war auch hier in allen Zelllinien erkennbar. Allerdings war im Vergleich zu der unbehandelten WT-Zelllinie unter Induktion der LT-Biogenese der Phänotyp des stärkeren Abfalls der Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytosol der WT-Zelllinie im Vergleich zur PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie über die Zeit stärker ausgeprägt (Abbildung 14F).

Schließlich verifizierte diese Versuchsreihe den bereits in den vorherigen Experimenten beschriebenen Phänotyp bezüglich der Ca^{2+} -Konzentration im ER, so zeigten sowohl die PEX19^{-/-}- als auch die Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie ohne und mit Induktion der LT-Biogenese reduzierte Ca^{2+} -Ausströme aus dem ER. Die SOCE-Antwort stellte sich in den Experimenten mit einer zweistufigen Kinetik dar und war insbesondere von einem stärkeren Abfall der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit in WT-Zellen im Vergleich zu Zellen der PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie gekennzeichnet, was sich unter Oleat-Behandlung noch stärker zeigte. Um mehr über mögliche Ursachen für diese Beobachtung herauszufinden, wurde ein Experiment angeschlossen, welches eine genauere Differenzierung zwischen SOCE und der Ca^{2+} -Clearance erlauben sollte.

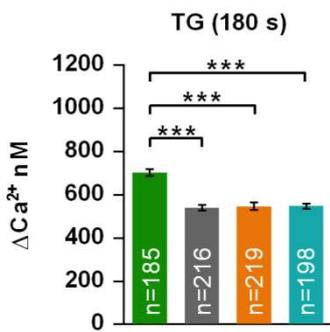
A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

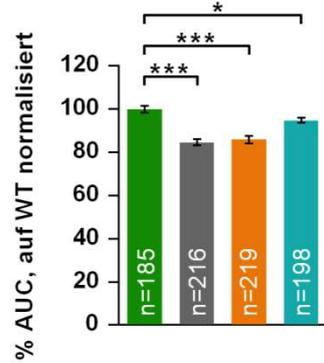
B



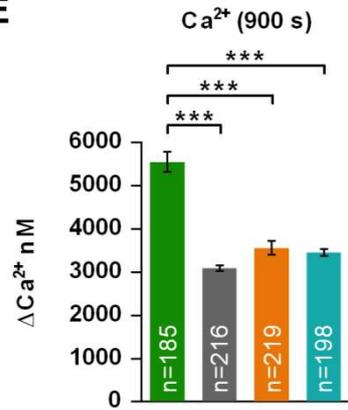
C



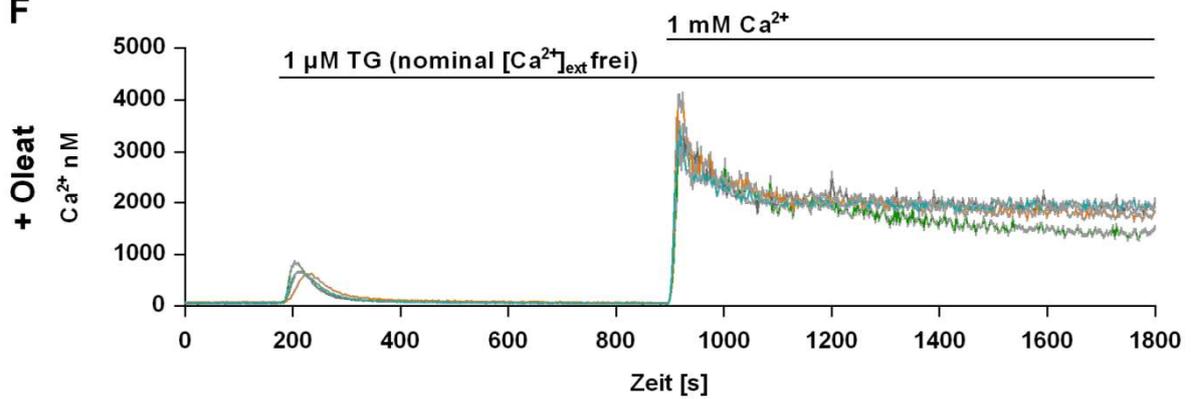
D



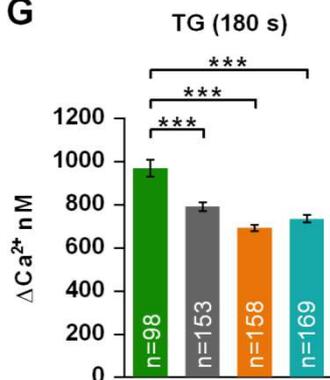
E



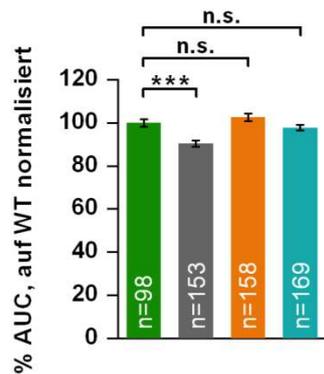
F



G



H



I

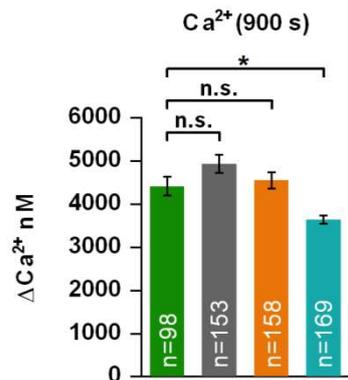


Abbildung 14: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER. Nach Zugabe von Thapsigargin (TG) folgte die Hinzugabe von Ca^{2+} in der WT-, PEX19^{-/-}- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin [1 μM] wurde das ER (Endoplasmatische Retikulum)- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die Messung erfolgte zunächst in nominal Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung, so dass erst durch sequentielle Zugabe von Ca^{2+} in die Messlösung nach 15 Minuten der SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) aktiviert werden konnte. Die komplette Messung fand sowohl bei unbehandelten Zellen (B-E) als auch bei Oleat-behandelten Zellen (F-I) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+F). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+G). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ca^{2+} hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls das Delta für jede Zelllinie bestimmt (E+I). Zusätzlich wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) des zeitlichen Verlaufes der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe (177-399 s) für jede Zelllinie quantifiziert und auf die entsprechende WT-Zelllinie ohne bzw. nach Oleat-Behandlung normiert (D+H). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen (Unbehandelt N = 4/Oleat-behandelt N = 3) mit ihren SEM. N = Biologische Replikate; n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. ***p \leq 0,001, *p \leq 0,05, n.s. = nicht signifikant.

4.1.4.1. PEX19 beeinflusst die Ca^{2+} -Clearance

Nachdem sich eine veränderte SOCE-Dynamik in der PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie beobachten ließ, sollte nun die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration im zeitlichen Verlauf genauer analysiert werden, um zwischen SOCE und Ca^{2+} -Clearance differenzieren zu können. Denn während der Messung der SOCE-Antwort kommt es nicht nur zur Aktivierung des SOCE, sondern die exzessiv hohen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen lassen auch eine Aktivierung der Ca^{2+} -Clearance vermuten [78]. Der Mechanismus der Ca^{2+} -Clearance arbeitet einer potentiell toxischen Überladung des Zytosols mit Ca^{2+} entgegen, indem einerseits SERCA Ca^{2+} ins ER transportiert und andererseits unter anderem die PMCA Ca^{2+} aus dem Zytosol in den Extrazellularraum pumpt [172,193]. Eine Berechnung der Zu- oder Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration bei Zugabe von Ca^{2+} bzw. EGTA hilft somit möglicherweise bei der Charakterisierung dieser beiden Mechanismen. Dazu wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie bei der differenzierten Untersuchung des SOCE (vergleiche Abbildung 14) gewählt, der sich dadurch unterschied, dass diesmal die SOCE-Antwort länger gemessen wurde und diese am Ende durch Zugabe von EGTA gestoppt worden ist. Ferner erfolgte die Applikation der Ringer-Lösungen (1 μM Thapsigargin/ 1 mM Ca^{2+} /1 mM EGTA) elektronisch gesteuert in einer Durchflusskammer. So wurde zunächst in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Messlösung 1 μM Thapsigargin zu den Zellen gegeben, auf die eine 1 mM Ca^{2+} -enthaltende Ringer-Lösung nach 400 Sekunden folgte. Nach 1100 Sekunden erfolgte die Messung in

EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung. Dieser Versuch wurde ausschließlich mit Oleat-behandelten Zelllinien durchgeführt, da sich hier der Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über die Messzeit in der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und beiden Klonen $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie stärker von der der WT-Zelllinie unterschied als ohne Oleat-Behandlung.

Wie in Abbildung 15B dargestellt, waren im zeitlichen Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in ratiometrischen Messwerten der WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie zwei Maxima zu erkennen. Ein kleineres Maximum der ratiometrischen Messwerte war nach Thapsigargin-Gabe zu erkennen, wobei hier das Maximum der WT-Zelllinie etwa doppelt so hoch ausfiel wie bei der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und den beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie. Das zweite Maximum bei Wechsel in Ca^{2+} -enthaltende Messlösung fiel mit ratiometrischen Messwerten von bis zu 4,5 ebenfalls bei WT-Zellen höher aus als bei Zellen der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie mit Werten von etwa 3,5 bzw. Zellen des Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie mit einem Wert von 3. Im Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration war bei der WT-Zelllinie ein stärkerer Abfall der ratiometrischen Messwerte zu beobachten als bei der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und den Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie. Mit Vorhandensein von EGTA in der Messlösung sank die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration bei allen Zelllinien ab, wobei Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie den höchsten ratiometrischen Endwert aufwies. Es folgte das Einfügen zweier Trendkurven im Bereich um die 400 Sekunden und im Bereich um die 1100 Sekunden. An denen mit Ovalen markierten Positionen ließ sich so die Steigungen bzw. Senkungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration quantifizieren (Abbildung 15C). Details zum Einfügen der Trendkurven sowie der Berechnung der Steigungen bzw. des Abfalls sind dem Methodenteil zu entnehmen (siehe Kapitel 3.2.2.2). Die Steigung bei initialer Zugabe von Ca^{2+} wies keinen Unterschied zwischen der WT- und der $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie auf, wohingegen Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie eine Reduktion der Steigung um etwa 20% im Vergleich zur WT-Zelllinie aufwies (Abbildung 15D). Für den Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ließ sich eine um etwa 15% erhöhte Steigung im Vergleich mit der WT-Zelllinie berechnen (Abbildung 15D). Die Werte für die Senkungskinetik zeigte für die $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie für Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie etwa 20% niedrigere Werte an als für die WT-Zelllinie (Abbildung 15E). Den größten Unterschied zur WT-Zelllinie wies Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie auf, der Wert für die Senkung war hier um ca. 60% reduziert (Abbildung 15E).

Zusammenfassend ließen sich für die Steigung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei Ca^{2+} -Zugabe zwischen der WT- und $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie keine Unterschiede feststellen, wohingegen Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie eine leichte Reduktion und Kl. 19 der

PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine leichte Erhöhung des Steigungswertes im Vergleich zur WT-Zelllinie aufwiesen. Dies ließ bei der PEX19^{-/-}-Zelllinie eine unveränderte Aktivierung des SOCE vermuten, während das Ergebnis der beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie aufgrund ihrer Inkongruenz keinen eindeutigen Schluss zur Dynamik der SOCE-Antwort zuließ. Bei einer reduzierten ER-Ca²⁺-Konzentrationen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 hätte man eine kompensatorisch erhöhte Induktion des SOCE erwartet. Eine Erklärung könnte in der pharmakologisch induzierten Aktivierung des SOCE liegen [158], die unmittelbar in jeder Zelllinie zur maximalen Aktivierung des SOCE führt und damit einen unter physiologischen Bedingungen einen initial erhöhten SOCE-vermittelten Ca²⁺-Einstrom maskiert.

Bei Betrachtung der Werte für die Senkung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration bei Vorhandensein von EGTA in der Messlösung korrelierte der über die Zeit beobachtete steilste Abfall der WT-Zelllinie im Vergleich zu den Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 mit dem berechneten höchsten Senkungswert. Die berechneten Werte für die PEX19^{-/-}- und beide Klone der PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigten einen langsameren Abfall der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration bei EGTA-Zugabe im Vergleich zur WT-Zelllinie. Bei Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie war hier mit einem Senkungswert von etwa 0,06 die niedrigste Senkungsgeschwindigkeit zu verzeichnen (Abbildung 15E). Folglich ließ sich hier vermuten, dass der langsamere Abfall der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in der PEX19^{-/-}- sowie beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nach Wechsel in EGTA-enthaltende Messlösung durch eine reduzierte Ca²⁺-*Clearance* in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 verursacht wurde.

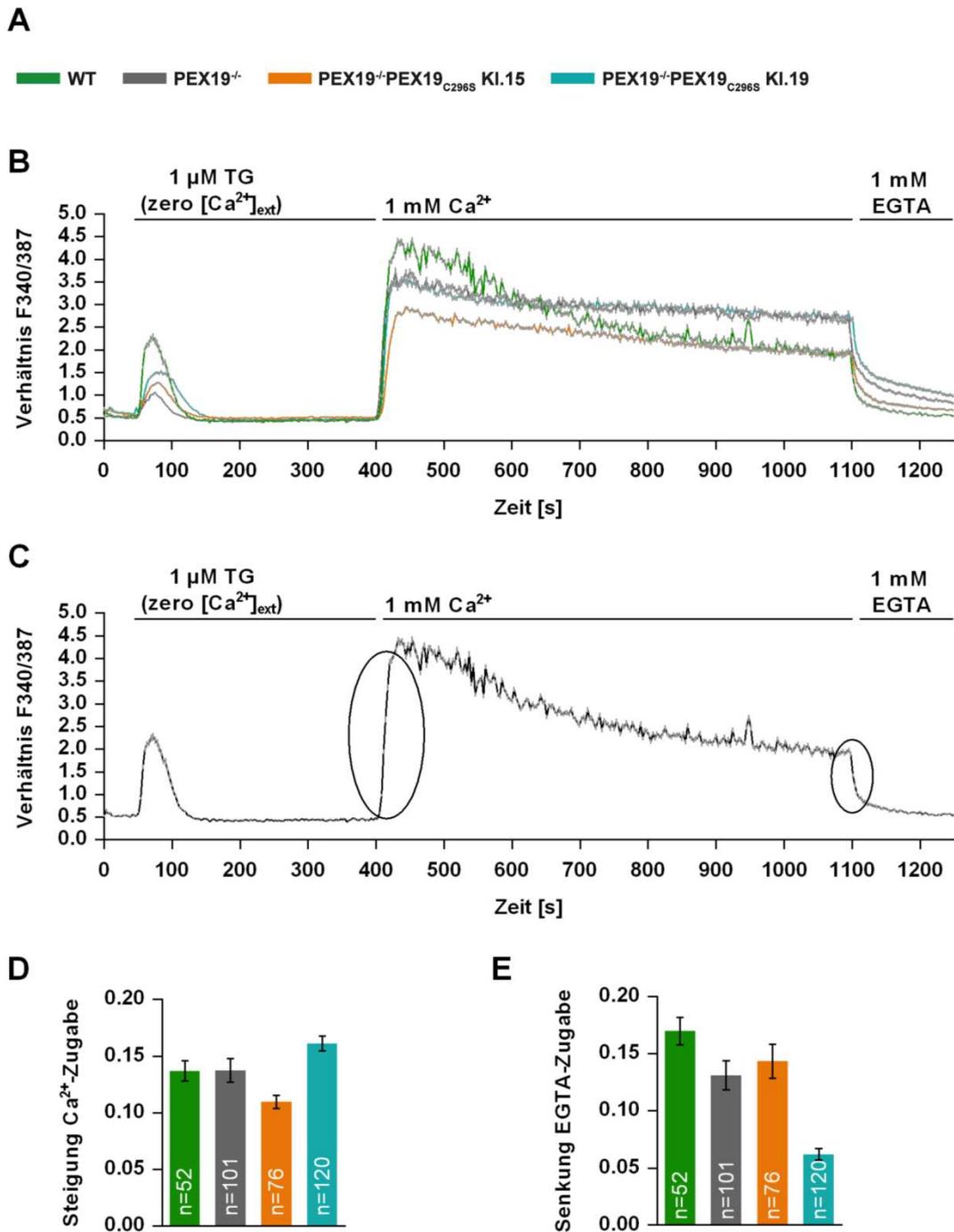


Abbildung 15: Fura-2-AM-basierte Ca²⁺-Messungen nach zeitlich getrennter Thapsigargin-, Ca²⁺-, und EGTA-Gabe in Oleat-behandelten Zellen der WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Messungen erfolgten in einer Durchflusskammer. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Die Depletion des ER-Ca²⁺ erfolgte durch Thapsigargin (TG)-Gabe [1 μ M] nach ca. 50 Sekunden in EGTA-enhaltender (Ca²⁺-freier) Ringer-Lösung. Nach ca. 400 Sekunden folgte der Messlösungs austausch mit 1 mM Ca²⁺ enthaltender Ringer-Lösung und nach etwa 1100 Sekunden wurde in 1 mM EGTA enthaltender Ringer-Lösung weiter gemessen. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration über einen Messzeitraum von 1275 Sekunden ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B). Nach Einfügen einer Trendlinie in die Kurven der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde, wie schematisch durch Ovale markiert, die Steigung nach Wechsel in Ca²⁺-enthaltende Messlösung und die Senkgeschwindigkeit nach Wechsel in EGTA-enhaltende Messlösung bestimmt (C). Die berechnete Steigung nach Ca²⁺-Zugabe (D) und die berechnete Senkgeschwindigkeit nach dem Messlösungswechsel in EGTA (E)

sind für jede Zelllinie gezeigt. Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen ($N = 1$) mit ihren SEM. N = Biologische Replikate; n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt.

4.1.5. Eine veränderte Ca^{2+} -Konzentration in Nicht-ER- Ca^{2+} -Speichern in HeLa-Zellen ohne wildtypisches PEX19

Neben dem ER tragen auch noch anderen Organellen der Zellen zur Speicherung von intrazellulärem Ca^{2+} bei, insbesondere für Mitochondrien ist dies schon lange bekannt [44]. Im Folgenden werden diese Organellen als Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher bezeichnet. Nachdem die indirekt gemessene ER- Ca^{2+} -Konzentration PEX19-abhängige Unterschiede zeigte und auch der SOCE PEX19-abhängig verändert erschien, sollte nun untersucht werden, ob ein deletiertes bzw. mutiertes PEX19 zu veränderten Ca^{2+} -Konzentrationen in Nicht-ER- Ca^{2+} -Speichern führte.

Zur Analyse der Ca^{2+} -Konzentrationen in diesen Nicht-ER- Ca^{2+} -Speichern wurde zunächst der SERCA-spezifische Inhibitor Thapsigargin hinzugegeben, was zu einer Depletion des ER- Ca^{2+} ins Zytosol führte [6]. Anschließend wurde Ionomycin auf die Zellen gegeben, welches alle zellulären Membranen permeabel für Ca^{2+} macht [96]. Da Thapsigargin zu einer vollständigen Entleerung des ER- Ca^{2+} geführt haben sollte, gelangt durch die Ionomycin-Gabe hauptsächlich das Ca^{2+} aus Nicht-ER- Ca^{2+} -Speichern ins Zytosol.

Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin und $10 \mu\text{M}$ Ionomycin weist in den unbehandelten Zelllinien zwei Maxima auf (Abbildung 16B). Das erste Maximum resultierend aus der Zugabe von Thapsigargin nach 3 Minuten zeigte in allen Zelllinien Anstiege der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen auf ca. 400 nM (Abbildung 16B). Das zweite Maximum resultierend aus der Hinzugabe von Ionomycin zeigte in allen Zelllinien niedrigere Anstiege der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen auf Werte zwischen 200 und 250 nM (Abbildung 16B). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ließ ähnliche Verläufe zwischen der WT-, PEX19^{-/-}- sowie Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie beobachten, lediglich Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte nach Ionomycin-Gabe höhere zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen über die gesamte verbleibende Messdauer (Abbildung 16B).

Die Berechnung der Delta der Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe nach 3 Minuten ergab eine signifikante Reduktion des gemessenen zytosolischen Ca^{2+} in der PEX19^{-/-}-Zelllinie um 12% und im Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-

Zelllinie um 22% im Vergleich zur WT-Zelllinie. Nur im Falle des Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie konnten keine signifikante Verminderung der Thapsigargin-Antwort im Vergleich zur WT-Zelllinie beobachtet werden (Abbildung 16C). Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Berechnung der AUC der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Thapsigargin-Gabe, so konnte hier in der PEX19^{-/-}- und diesmal in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine signifikante Reduzierung der AUC um etwa 6-12% beobachtet werden (Abbildung 16D). Die PEX19^{-/-}- und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigten bei der Auswertung der Delta der Maxima nach Ionomycin-Gabe signifikante Reduktionen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration um 14-20% an. Lediglich Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigte diesbezüglich keinen Unterschied zur WT-Zelllinie (Abbildung 16E). Bei der Berechnung der AUC nach Ionomycin-Gabe konnten für die PEX19^{-/-}- und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie um ca. 30% reduzierte Flächenwerte im Vergleich zur WT-Zelllinie ermittelt werden. Für Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ließ sich ein um etwa 5% signifikant erniedrigter Flächenwert berechnen (Abbildung 16F).

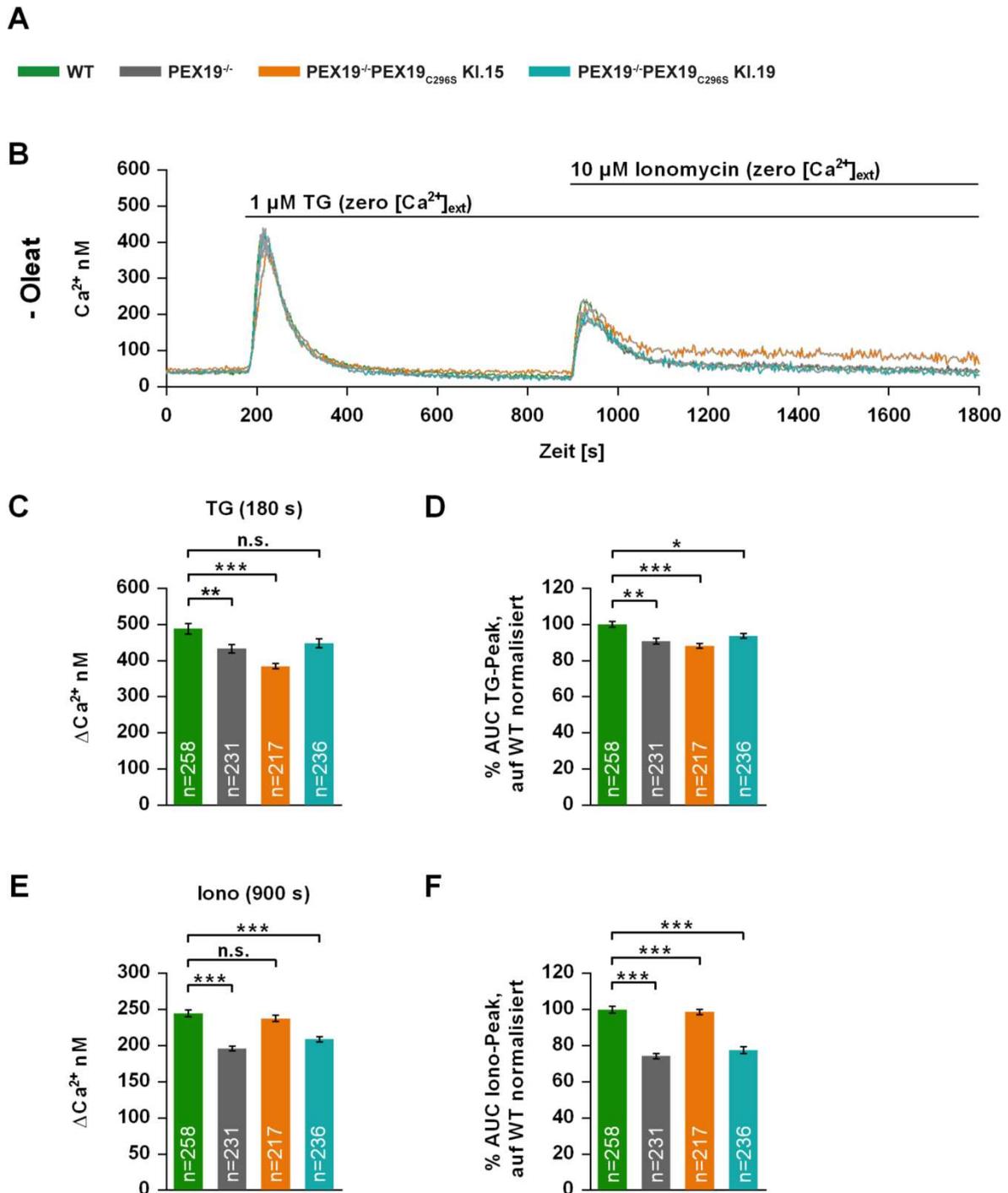


Abbildung 16: Fura-2-AM-basierte Ca²⁺-Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der unbehandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μ M] wurde das ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Ca²⁺ ins Zytosol depletiert. Die anschließende Hinzugabe von Ionomycin (Iono) [10 μ M] entleerte die ER-unabhängigen Ca²⁺-Speicher ins Zytosol. Die komplette Messung fand in EGTA-enthaltender (Ca²⁺-freier) Ringer-Lösung (B-F) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration über einen Messzeitraum von 30 min ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und im Balkendiagramm dargestellt (C). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ionomycin hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde

ebenfalls das Delta für jede Zelllinie bestimmt (E). Zusätzlich wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) des zeitlichen Verlaufes der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe (177-399 s) für jede Zelllinie quantifiziert und auf die entsprechenden WT-Zelllinie normiert (D). Analog dazu wurde auch die AUC der Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit nach Ionomycin-Zugabe (897-1200 s) für jede Zelllinie berechnet und auf die WT-Zelllinie normiert (F). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen ($N = 4$ (außer WT $N = 5$)) mit ihren SEM. $N =$ Biologische Replikate; $n =$ Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Vergleicht man die Messergebnisse der sequentiellen Gabe von Thapsigargin und Ionomycin nun mit den Messergebnissen bei gleichem experimentellem Aufbau, aber mit Oleat-behandelten Zelllinien, fällt zunächst auf, dass wieder zwei Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch die Zugabe von Thapsigargin bzw. Ionomycin entstanden (Abbildung 17B). Im Unterschied zu den unbehandelten Zelllinien (Abbildung 16B) lassen sich aber nach Oleat-Behandlung größere Differenzen der Maxima beobachten (Abbildung 17B). Die WT-Zelllinie hatte das Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe bei etwa 700 nM, während Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie mit ca. 600 nM und die $\text{PEX19}^{-/-}$ - bzw. Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie mit etwa 400 nM folgten (Abbildung 17B). Das zweite Maximum nach Ionomycin-Gabe fiel auch hier insgesamt deutlich geringer aus als das erste Maximum, wobei Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie hier mit einem Maximum nach Ionomycin-Gabe von etwa 350 nM den größten Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aufwies. Es folgten die WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und Kl. 19 der $\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie in absteigender Reihenfolge bezogen auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung 17B). Die Auswertung der Delta der Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen nach Thapsigargin-Gabe manifestierte die bereits im zeitlichen Verlauf beobachtete niedrigere zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe in Abwesenheit von wildtypischem PEX19, da die $\text{PEX19}^{-/-}$ - als auch beide Klone der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie signifikante Reduktionen der Delta zwischen 20-40% im Vergleich zur WT-Zelllinie zeigten (Abbildung 17C). Der längere zeitliche Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration von etwa 500 nM bis zum Wiederreichen basaler Ca^{2+} -Konzentrationen nach Thapsigargin-Gabe des Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie resultierte in der entsprechenden AUC-Berechnung jedoch darin, dass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der WT- und Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie bestand (Abbildung 17D). Im Gegensatz dazu zeigten die $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie Kl. 19 der $\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie analog zur Delta-Berechnung eine signifikante Reduzierung ihrer Flächenwerte der Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen nach Thapsigargin-Gabe im Vergleich zur WT-Zelllinie (Abbildung 17D). Die berechneten Delta der Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Ionomycin-Gabe waren bei der $\text{PEX19}^{-/-}$ - und Kl. 19 der $\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ - Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie signifikant um

etwa 20% vermindert, wohingegen bei Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine signifikante Erhöhung des Delta im Vergleich zum WT zu beobachten war (Abbildung 17E). Die gleichen Tendenzen zeigten auch die Berechnungen der AUC der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Ionomycin-Gabe. So wiesen die AUC der PEX19^{-/-}- und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie eine Reduktion von 16-20% auf, während die AUC des Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie um 16% statistisch signifikant erhöht war (Abbildung 17F).

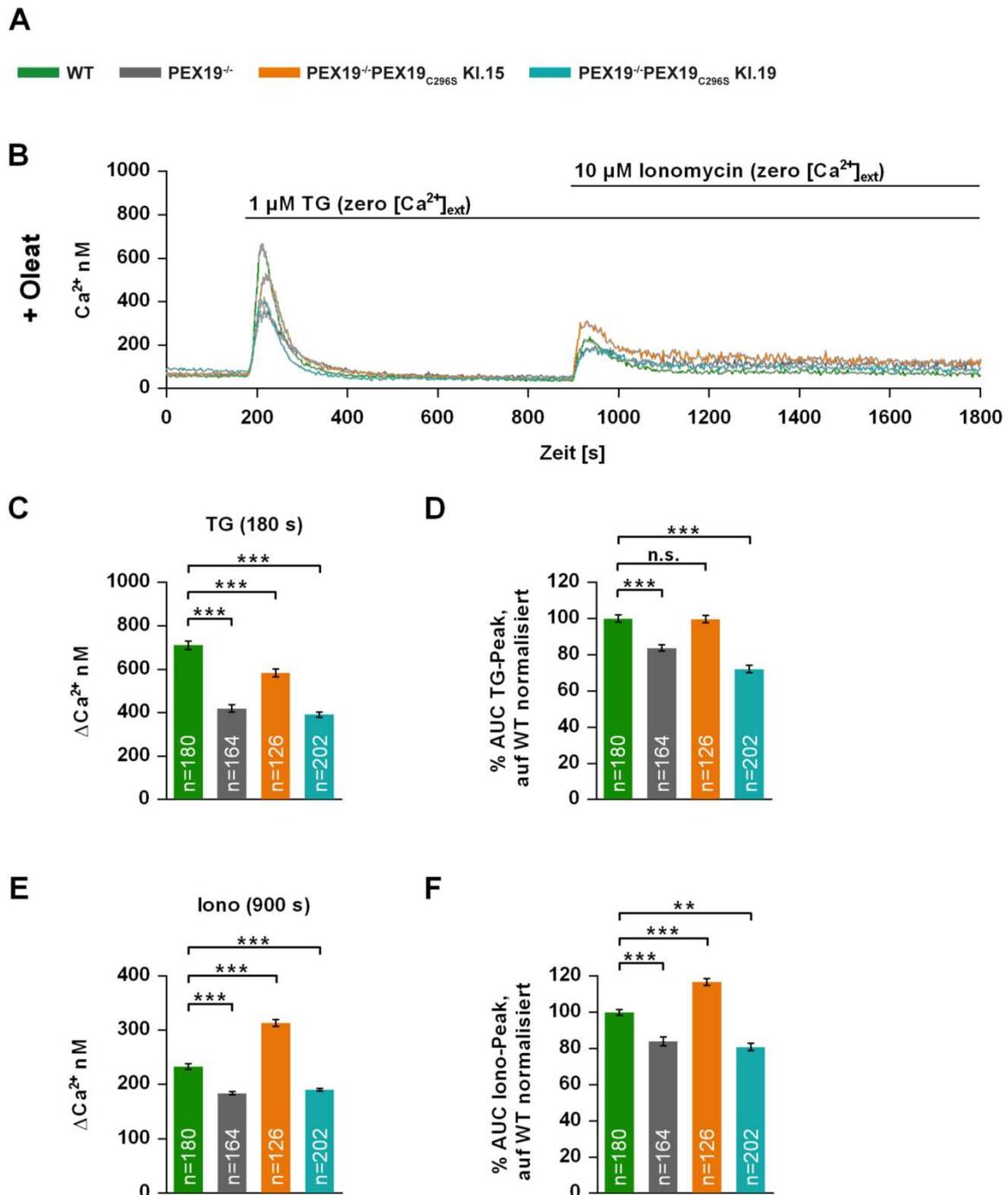


Abbildung 17: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] wurde das ER (Endoplasmatisches Retikulum)- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die anschließende Hinzugabe von Ionomycin (Iono) [10 μM] entleerte die ER-unabhängigen Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol. Die komplette Messung fand in EGTA-enhaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung (B-F) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 min ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und im Balkendiagramm dargestellt (C). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ionomycin hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (E). Zusätzlich wurde die Fläche unter der Kurve (AUC)

des zeitlichen Verlaufes der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe (177-399 s) für jede Zelllinie quantifiziert und auf die WT-Zelllinie normiert (D). Analog dazu wurde auch die AUC der Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit nach Ionomycin-Zugabe (897-1200 s) für jede Zelllinie berechnet und auf die WT-Zelllinie normiert (F). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen der entsprechenden Zelllinie aus allen Messungen ($N = 4$) mit ihren SEM. $N =$ Biologische Replikate; $n =$ Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie insgesamt. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der durch Ionomycin-Gabe induzierte Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowohl in den unbehandelten untersuchten Zelllinien als auch in den Oleat-behandelten untersuchten Zelllinien niedriger ausfiel als das durch Thapsigargin-Gabe induzierte Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dies war zu erwarten, da das ER den größten Ca^{2+} -Speicher der Zelle darstellt und durch die sequentielle Ionomycin-Gabe nur noch die Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol depletiert wurden [168]. Die niedrigeren zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen der PEX19^{-/-}- und der beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie nach Thapsigargin-Gabe wurden durch die Induktion der LT-Biogenese mit Ausnahme des Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie noch verstärkt. Die Ca^{2+} -Konzentrationen der Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher erschienen bei Zellen der PEX19^{-/-}- und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie reduziert zu sein, wobei dieser Effekt auch nach Oleat-Gabe zu beobachten war. Anders verhielt sich hier die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie, diese war nach Ionomycin-Gabe in unbehandelten Zellen gleich hoch bzw. minimal verändert, während sie nach Oleat-Gabe signifikant höher ausfiel als bei der WT-Zelllinie. Um nun zu untersuchen welcher Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher sich möglicherweise für die observierten Veränderungen in den zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen nach Ionomycin-Gabe verantwortlich zeichnet, sollte eine Organell-spezifische Ca^{2+} -Messung in den potentiell zweitgrößtem Ca^{2+} -Speicher der Zelle, den Mitochondrien, mithilfe genetisch codierter Ca^{2+} -Sensoren erfolgen [44].

Tabelle 23 fasst die Ergebnisse der Fura-2-AM basierten Ca^{2+} -Messungen zusammen.

Tabelle 23: Übersicht über die Fura-2-AM-basierten Ergebnisse der Ca^{2+} -Messungen in der WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne und mit Induktion der LT-Biogenese. Es wurde das gesamtzelluläre Ca^{2+} , das ER (Endoplasmatisches Retikulum)- Ca^{2+} -Leck, der SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) sowie die Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher untersucht. Die Pfeile symbolisieren eine Erhöhung bzw. Reduktion der gemessenen Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol bzw. der mitochondrialen Matrix der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie der beiden Klone der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie gegenüber der WT-Zelllinie.

Kompartiment	WT	$\text{PEX19}^{-/-}$	$\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$	Oleat
Gesamtzelluläres Ca^{2+}	=	↓	↑	- Oleat
	=	↓	↓	+ Oleat
ER- Ca^{2+} -Leck	=	↓	↓	-/+ Oleat
SOCE	=	=	=	- Oleat
	=	verändert	verändert	+ Oleat
Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher	=	↓	?	-/+ Oleat

4.2. Untersuchungen zum Einfluss von PEX19 auf die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration

Im ersten Teil der Arbeit konnten Fura-2-AM-basierte Messungen des zytosolischen Ca^{2+} auf veränderte Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 schließen lassen (vergleiche Abbildung 16 und Abbildung 17). Demzufolge sollte nun überprüft werden, ob PEX19-Funktionen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase im potentiell zweitgrößten Ca^{2+} -Speicher der Zelle, den Mitochondrien, haben [44]. Ein weiterer Grund die Mitochondrien näher zu untersuchen, stellt ihre Assoziation mit LT für die Lipolyse bzw. Lipogenese dar [124]. Zur Untersuchung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration kamen prinzipiell zwei verschiedene Messmethoden in Betracht. Auf der einen Seite die Bestimmung des mitochondrialen Ca^{2+} mit fluoreszenzbasierten, chemischen Ca^{2+} -Sensoren wie rhod-2 und auf der anderen Seite die Messung des mitochondrialen Ca^{2+} mit spezifisch in Mitochondrien lokalisierenden fluoreszierenden Proteinen wie Pericam MT [51]. In dieser Arbeit wurde sich gegen den Einsatz von rhod-2 entschieden, da für rhod-2 in HeLa-Zellen bereits gezeigt wurde, dass es sowohl die Morphologie als auch das Membranpotential der Mitochondrien verändern kann [51]. Gleichzeitig indiziert die Studienlage, dass die Ergebnisse spezifisch lokalisierender fluoreszierender Proteine wie Pericam MT konsistentere Daten zur mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration liefern [51].

Da unklar war, wie hoch die Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien der zu untersuchenden HeLa-Zellen war, wurde zur Bestimmung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mittels spezifisch lokalisierender fluoreszierender Proteine ein dualer Ansatz gewählt. Dieser bestand auf der einen Seite aus dem Ca^{2+} -Sensor Pericam MT und auf der anderen Seite aus dem Ca^{2+} -Sensor D3cpv. Der Ca^{2+} -Sensor Pericam MT ist ein chimäres Protein bestehend aus einem zirkulär permutierten YFP (*Yellow fluorescent protein*), dem Ca^{2+} -bindenden Calmodulin und dem M13-Peptid [3,123]. Der zweite Ca^{2+} -Sensor ist D3cpv und besteht aus den 2 Fluorophoren YFP und CFP (*Cyan fluorescent protein*), die über den Ca^{2+} -sensitiven Linker Calmodulin miteinander verknüpft sind. Zusätzlich enthält auch D3cpv das M13-Peptid [126]. Beide Ca^{2+} -Sensoren verfügen zudem über Signalsequenzen zur Lokalisierung in die mitochondriale Matrix [3,126]. Die Bindung von Ca^{2+} an das Calmodulin des Ca^{2+} -Sensors Pericam MT induziert eine Veränderung des Anregungsmaximums des YFP von 415 nm auf 494 nm und ermöglicht so ratiometrische Ca^{2+} -Messungen [123]. Auch im Falle von D3cpv sind ratiometrische Ca^{2+} -Messungen möglich, dabei wird jedoch die bei Ca^{2+} -Bindung induzierte FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)-Emission des Akzeptors YFP durch die Donoremision des CFP dividiert [3]. Der Grund für den Einsatz von zwei verschiedenen mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren, lag unter anderem in ihrer Eigenschaft

begründet mit unterschiedlich hoher Affinität an Ca^{2+} zu binden. So weist Pericam MT mit einem K_d -Wert $_{[\text{Ca}^{2+}]}$ von $\sim 1,7 \mu\text{M}$ [3] eine niedrigere Affinität zu Ca^{2+} auf als D3cpv mit einem K_d -Wert $_{[\text{Ca}^{2+}]}$ von $\sim 0,6 \mu\text{M}$ [126]. Durch Ca^{2+} -Messungen mit beiden Sensoren ließ sich so eine potentiell größere Bandbreite von mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentrationen abdecken als unter Verwendung nur einer der beiden Ca^{2+} -Sensoren.

4.2.1. Überprüfung der subzellulären Lokalisation der mitochondrialen Ca^{2+} -Sensoren

Zunächst wurde je ein Plasmid, welches entweder für den Ca^{2+} -Sensor Pericam MT oder D3cpv codiert, mithilfe einer transienten Transfektion in die HeLa WT-Zelllinie eingebracht. Nach 48 h Expressionszeit wurden die Zellkerne der WT-Zellen mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich in lebenden Zellen anhand der Fluoreszenzsignale im GFP- und DAPI-Kanal die Transfektionseffizienz bestimmen. Sowohl für Pericam MT als auch für D3cpv konnte eine Transfektionseffizienz von etwa 30% in der WT-Zelllinie beobachtet werden. Zur Überprüfung der subzellulären Lokalisation wurden die transient transfizierten WT-Zellen 48 h nach Transfektion mit dem mitochondrialen Marker MitoTracker sowie Hoechst-Farbstoff inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurde die Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dabei konnte, wie in Abbildung 18A dargestellt, für Pericam MT eine Anfärbung der Zellkerne im DAPI-Kanal beobachtet werden, sowie eine Markierung des mitochondrialen Netzwerkes durch den MitoTracker im Cy3-Kanal. Im GFP-Kanal zeigten die Signale der transfizierten Zellen eine mitochondriale Struktur. Im Falschfarbenbild mit Überlagerung des Cy3-Kanals (rot) und des GFP-Kanals (grün) ließ sich die Kolokalisation des Pericam MT mit Mitochondrien verifizieren (Abbildung 18A). In Abbildung 18B sind die mit D3cpv transfizierten WT-Zellen dargestellt, wobei die Signale des MitoTracker im Cy3-Kanal eine veränderte punktförmige mitochondriale Morphologie zeigten. Auch die Signale des D3cpv im GFP-Kanal wiesen eine ähnliche Morphologie auf. Bei Überlagerung der Signale des MitoTrackers mit den Signalen des D3cpv ließ sich eine Kolokalisation des D3cpv mit Mitochondrien beobachten (Abbildung 18B). Dieser Versuch verifiziert somit die korrekte subzelluläre Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in Mitochondrien.

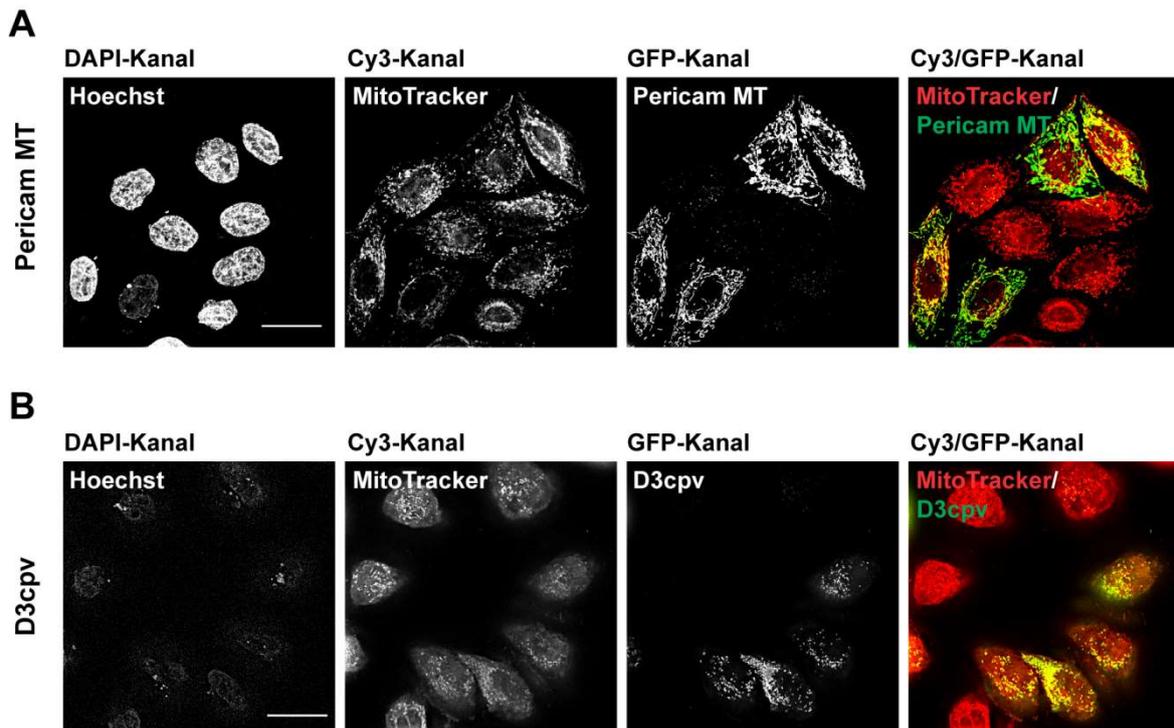


Abbildung 18: Subzelluläre Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in der HeLa WT-Zelllinie nach transients Transfektion und Fixierung. A: Zellen nach Transfektion mit dem Plasmid Pericam MT. B: Zellen nach Transfektion mit dem Plasmid D3cpv. In A und B ist von links nach rechts jeweils der gleiche Bildausschnitt von WT-Zellen im DAPI-, Cy3- und GFP-Kanal sowie als Falschfarbenbild in einer Überlagerung des Cy3- und GFP-Kanals gezeigt. Im DAPI-Kanal ist die Anfärbung der Zellkerne durch die Hoechst-Färbung erkennbar, im Cy3-Kanal die Signale des MitoTracker sowie im GFP-Kanal die Eigenfluoreszenz von Pericam MT bzw. D3cpv. Alle Aufnahmen wurden mit Huygen Essentials dekonvoluiert. Maßstab = 20 μm .

Als auffällig erwies sich hierbei allerdings die in etwa 80% der Zellen beobachtete, punktförmige Morphologie der Mitochondrien in den mit D3cpv transfizierten HeLa-Zellen, die auch als Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes bezeichnet werden könnte (Abbildung 18B). Eine Fragmentierung der Mitochondrien wurde nach Inkubation von Zellen mit proapoptotischen Substanzen beobachtet und markiert eine Initiierung der Apoptose [81]. Dementsprechend könnte die in dieser Arbeit beobachtete Fragmentierung der Mitochondrien auf eine Induktion der Apoptose hindeuten, so dass die mit dem Ca^{2+} -Sensor D3cpv erhobenen Messwerte mit Vorsicht zu interpretieren sind. Eine Ursache für die veränderte Morphologie der Mitochondrien ist hier vermutlich nicht auf den Ca^{2+} -Sensor D3cpv zurückzuführen, da dieser bereits in HeLa-Zellen erfolgreich und ohne eine beschriebene Veränderung der Morphologie der Mitochondrien zur Expression gebracht wurde [126].

4.2.2. Validierung der Ca^{2+} -Sensoren-Funktion durch pharmakologische Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase

Der nächste Schritt bestand in der Überprüfung der Ca^{2+} -Sensoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit veränderte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen anzuzeigen. Dazu wurden die HeLa WT-, PEX19^{-/-}- und beide Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie transient mit den Ca^{2+} -Sensoren transfiziert und nach 48 h Expressionszeit die lebenden Zellen fluorezenzmikroskopisch untersucht. Die mit D3cpv transfizierten Zellen wurden zusätzlich noch vor der Messung für ca. 16 h mit Oleat behandelt. Für die ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen wurden ausschließlich erfolgreich transfizierte Zellen, fluorezenzmikroskopisch sichtbar an Signalen im GFP-Kanal, in die Messung einbezogen. Dafür wurde der Bildausschnitt im Mikroskop so gewählt, dass möglichst viele transfizierte Zellen im Sichtfeld zu sehen waren. Zunächst sollte untersucht werden, ob steigende mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration mit einem Anstieg der ratiometrischen Messwerte einhergehen. Dazu wurde zu den Zellen, welche in einer Messlösung bestehend aus 1 mM Ca^{2+} -enthaltende Ringer-Lösung inkubiert wurden, das Ionophor Ionomycin zugegeben, welches in der Lage ist Ca^{2+} über Membranen entlang seines Konzentrationsgradienten zu transportieren [96]. Durch Zugabe von Ionomycin sollte so Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum in die Zelle und folglich in die Mitochondrien gelangen, wo sich die in vorangegangenen Versuchen verifizierte subzelluläre Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv befand. Das anschließende Hinzufügen von EGTA sollte zur Bindung des extrazellulären Ca^{2+} führen [116] und dadurch eine Ionomycin-vermittelte Depletion des intramitochondrialen Ca^{2+} bewirken. Hiermit sollte getestet werden, ob die Ca^{2+} -Sensoren auf sinkende mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen reagieren.

Abbildung 19A zeigt die ratiometrischen Messergebnisse des Ca^{2+} -Sensors Pericam MT in transfizierten WT-Zellen nach zeitlich getrennter Zugabe von Ionomycin und EGTA. Die basalen Werte der Ca^{2+} -Konzentration lagen bei einem ratiometrischen Verhältnis von 1,4. Nach Zugabe von Ionomycin kam es zunächst etwa 1 Minute lang zu einem Abfall der Ca^{2+} -Konzentration, die ab 3 Minuten in einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration überging und auf ratiometrische Werte von etwa 2,3 anstieg. Die Zugabe von EGTA resultierte in einem sofortigen, steilen Abfall der gemessenen Ca^{2+} -Konzentrationen auf Werte unterhalb der initial gemessenen Basalwerte auf ratiometrische Werte von 0,5. Die mit D3cpv transfizierten Zellen zeigten basale Ca^{2+} -Konzentrationen mit ratiometrischen Messwerten von 1,0 (Abbildung 19B). Nach Zugabe von Ionomycin kam es zu einem sofortigen Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration auf ratiometrische Messwerte um die 2,3. Die Zugabe von EGTA resultierte in einem kurzen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentrationen auf ratiometrische

Messwerte von ca. 2,7, der nach weniger als einer halben Minute in einen steilen Abfall der gemessenen Ca^{2+} -Konzentration überging und in ratiometrischen Messwerten von etwa 1,0 endete. Über den gesamten Messverlauf ließen sich kleinere Standardfehler des Mittelwertes der einzelnen Zellen beobachten als bei den Messungen mit Pericam MT (Abbildung 19A+B).

Zusammenfassend ließen sich mit Pericam MT und D3cpv vergleichbare ratiometrische Werte für die basale Ca^{2+} -Konzentrationen in Zellen der WT-Zelllinie ermitteln. Der Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration war aber bei Pericam MT im Gegensatz zu D3cpv nicht sofort nach Ionomycin-Gabe sichtbar, sondern es zeichnete sich zunächst sogar ein Abfall der gemessenen Ca^{2+} -Konzentrationen ab, der erst im Verlauf der Messung in einen Anstieg überging (Abbildung 19). Es ließen sich etwa vergleichbare ratiometrische Maximalwerte für die Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien mit beiden Ca^{2+} -Sensoren erfassen. Ein pharmakologisch induziertes Abfallen der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentrationen war bei beiden Sensoren durch einen steilen Abfall der ratiometrischen Messwerte gekennzeichnet, wobei Pericam MT im Gegensatz zu D3cpv minimale ratiometrische Messwerte unterhalb der initial gemessenen basalen ratiometrischen Messwerte zeigte. Damit erschienen beide Ca^{2+} -Sensoren prinzipiell zur Messung von veränderten Ca^{2+} -Konzentration in Mitochondrien lebender HeLa-Zellen geeignet, doch bei D3cpv stellten sich die Plateaus schneller und stabiler ein. Zudem fielen die Standardfehler bei der Messung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mit dem Ca^{2+} -Sensor D3cpv kleiner aus als mit dem Ca^{2+} -Sensor Pericam MT (Abbildung 19). Eine mögliche Ursache dafür könnte in den unterschiedlichen Ca^{2+} -Sensitivitäten der beiden Ca^{2+} -Sensoren begründet sein. Womöglich war die tatsächliche mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in den Messungen eher im geeigneten niedrigeren Ca^{2+} -Konzentrationsbereich von D3cpv als im für höhere Ca^{2+} -Konzentrationen geeigneten Bereich von Pericam MT. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Ca^{2+} -Sensor D3cpv erfolgte nicht nur in der WT-Zelllinie, sondern auch in der PEX19^{-/-}- und beide Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie, wo sich vergleichbare Ergebnisse wie in der WT-Zelllinie abzeichneten (siehe Anhang 6.2.).

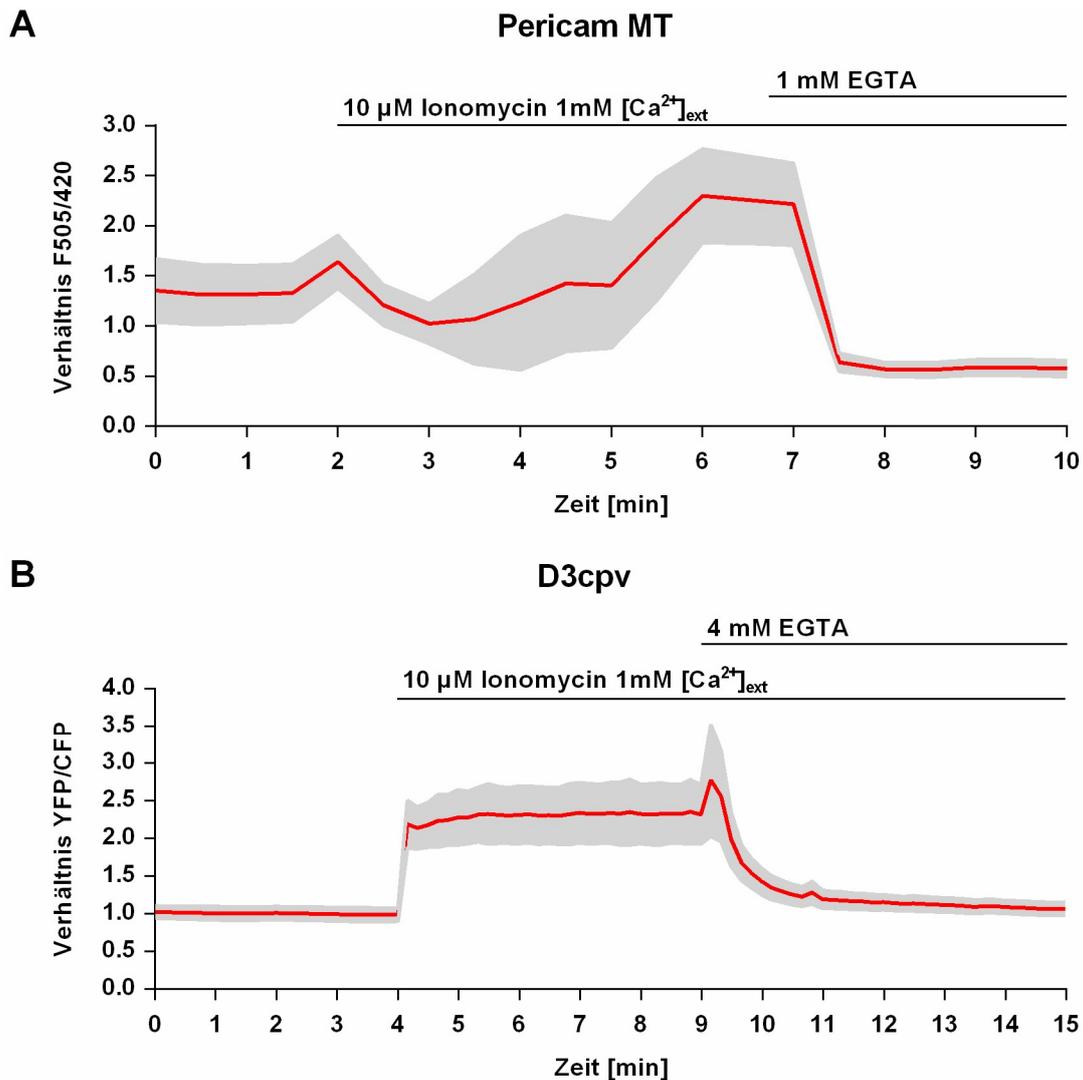


Abbildung 19: Überprüfung der Funktionsfähigkeit der transient exprimierten Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in lebenden HeLa WT-Zellen. Der arithmetische Mittelwert (rot) der ratiometrischen mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen mit entsprechenden Standardfehlern des Mittelwertes (grau) ist über die Messzeit aufgetragen (A+B). A: Im Falle von mit Pericam MT transfizierten Zellen wurden nach einer Messzeit von 2 Minuten Ionomycin [$10 \mu\text{M}$] mit Ca^{2+} [1 mM] und nach 7,5 Minuten EGTA [4 mM] zu den Zellen gegeben. Die ratiometrische Messung ergab sich aus der Division der Fluoreszenzemission des YFP (*Yellow fluorescent protein*) bei einer Anregung mit 505 nm (Ca^{2+} -gebunden) durch die Fluoreszenzemission des YFP bei 420 nm (Ca^{2+} -frei). B: Bei den mit D3cpv transfizierten Zellen erfolgten die Zugabe von Ionomycin [$10 \mu\text{M}$] mit Ca^{2+} [1 mM] nach 4 Minuten und die von EGTA [4 mM] nach 9 Minuten. Die ratiometrischen Messergebnisse ergaben sich aus der Division der Fluoreszenzemission des Akzeptors YFP durch die Fluoreszenzemission des Donors CFP (*Cyan fluorescent protein*). Anzahl der gemessenen transfizierten Zellen: Pericam MT = 13; D3cpv = 13 Zellen. Für die Kontrolle des Ca^{2+} -Sensors Pericam MT sind die Messergebnisse der unbehandelten WT-Zelllinie gezeigt, während für die Kontrolle des Ca^{2+} -Sensors D3cpv die Messergebnisse der WT-Zelllinie nach Oleat-Behandlung gezeigt sind. Im Fall von D3cpv sind die Messergebnisse in der WT-Zelllinie repräsentativ für alle transfizierten Zelllinien (WT, PEX19^{-/-}, PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19), unabhängig von der Induktion der LT-Biogenese (siehe Anhang 6.2). Die Überprüfung des Ca^{2+} -Sensors Pericam MT auf induzierte Ca^{2+} -Veränderungen erfolgte ausschließlich in unbehandelten Zellen der WT-Zelllinie.

4.2.3. Die Induktion der LT-Biogenese führt in Abhängigkeit von PEX19 zu einer Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration

Nach Verifizierung der korrekten subzellulären Lokalisation der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv und deren Fähigkeit auf veränderte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen zu reagieren, sollte die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von PEX19 untersucht werden. Dazu wurden die WT-, PEX19^{-/-}- und beide Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie jeweils mit dem für Pericam MT oder D3cpv codierenden Plasmid analog zu den Vorversuchen transient transfiziert. Da bei Überprüfung des D3cpv-Sensors niedrigere Standardfehler zu beobachten waren (Abbildung 19B), wurden die zusätzlichen Messungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen unter Induktion der LT-Biogenese nur mit D3cpv transfizierten Zelllinien durchgeführt. Die Oleat-Behandlung der Zellen führte zur Triacylglycerol-Akkumulation einhergehend mit der Bildung von LT [95], dadurch sollten Effekte eines veränderten LT-Proteoms in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 stärker zum Tragen kommen.

Wie in Abbildung 20A dargestellt, ließen sich in der mit dem Plasmid Pericam MT transfizierten und unbehandelten WT-Zelllinie ratiometrische Messwerte der basalen mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mit einem Mittelwert von 0,8 ermitteln. In der unbehandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie ließ sich mit einem Mittelwert der ratiometrischen Messwerte von 1,0 eine signifikant höhere mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration als in der unbehandelten WT-Zelllinie ermitteln. Für den unbehandelten Kl.15 und Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ergaben sich Mittelwerte der ratiometrischen Messwerte von 0,81 bzw. 0,91, die damit beide im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie keine signifikanten Veränderungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentrationen indizierten. Die unbehandelten, aber mit dem Ca^{2+} -Sensor D3cpv codierenden Plasmid transfizierten Zellen der WT-Zelllinie (Abbildung 20B), zeigten mit einem Mittelwert der ratiometrischen Messwerte von 1,2 etwas höhere ratiometrische Messwerte als die mit Pericam MT transfizierte WT-Zelllinie. Ferner ließ sich zwischen den mit D3cpv transfizierten und nicht mit Oleat-behandelten PEX19^{-/-}- bzw. beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit Mittelwerten der ratiometrischen Messwerte zwischen 1,2-1,3 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur ebenfalls mit D3cpv transfizierten und unbehandelten WT-Zelllinie ermitteln (Abbildung 20B).

Aufgrund des geringeren Standardfehlers und des schneller und stabiler einstellenden Plateaus (vergleiche Abbildung 19) wurden die Messungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration nach Induktion der LT-Biogenese nur in Zellen, welche mit dem für D3cpv

codierenden Plasmid transfiziert waren, durchgeführt. In Oleat-behandelten und mit dem für den mitochondrialen Ca^{2+} -Sensor D3cpv codierenden Plasmid transfizierten Zellen der $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie konnte kein signifikanter Unterschied der ratiometrischen Messwerte der Ca^{2+} -Konzentrationen in den Mitochondrien im Vergleich zur ebenfalls Oleat-behandelten WT-Zelllinie beobachtet werden (Abbildung 20C). Im Gegensatz dazu zeichnete sich im Oleat-behandelten Kl.15 bzw. Kl.19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie eine im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie signifikante Erhöhung der ratiometrischen Messwerte der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentrationen mit um 7% im Falle von Kl. 15 und um 10% im Falle von Kl. 19 erhöhten Mittelwerten der ratiometrischen Messwerte ab (Abbildung 20C).

Die ratiometrische Messung der mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen ergab in beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne Oleat-Behandlung sowohl mit Pericam MT als auch mit D3cpv vergleichbare mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen wie in der WT-Zelllinie ohne Oleat-Behandlung. Nach Induktion der LT-Biogenese durch Oleat-Behandlung konnten in beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie signifikant erhöhte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zur ebenfalls Oleat-behandelten WT-Zelllinie gemessen werden. In Bezug auf die $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie ist zumindest das ratiometrische Messergebnis ohne Oleat-Behandlung kontrovers, da Pericam MT hier eine signifikante Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration anzeigte, während unter gleichen Bedingungen der D3cpv-Sensor keine signifikante Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur WT-Zelllinie ergab. Möglicherweise stellt die deutlich niedrigere Stichprobenanzahl der mit dem D3cpv-Sensor gemessenen Zellen, welcher einer schlechten Transfektionseffizienz geschuldet war, eine Erklärung für das Ergebnis einer nicht signifikanten Veränderung der $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie dar. Ob die beobachteten Veränderungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase nach Induktion der LT-Biogenese mit veränderter Abundanz Calcium-regulierender Proteine der Mitochondrien einhergehen, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit herausgefunden werden.

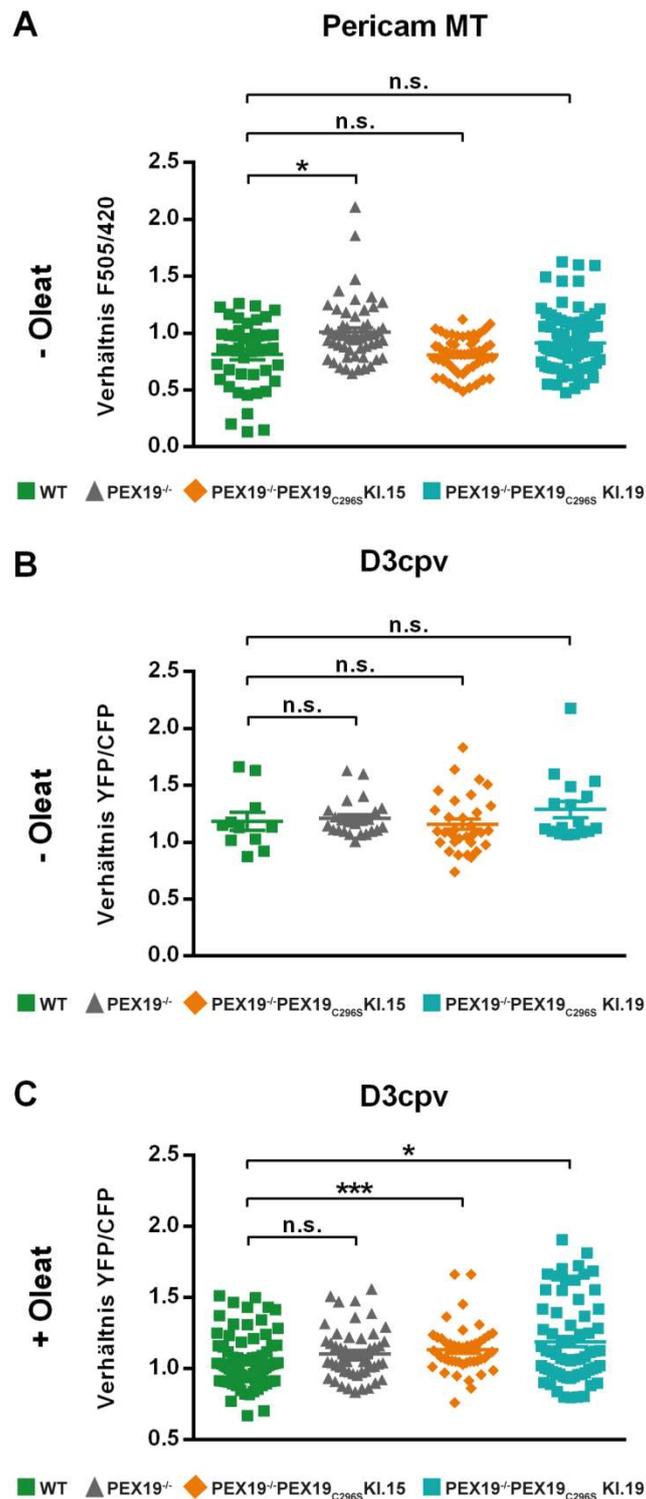


Abbildung 20: Ratiometrische Messungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration mithilfe der Ca^{2+} -Sensoren Pericam MT und D3cpv in lebenden Zellen mit wildtypischem oder deletiertem bzw. mutiertem PEX19. Jeder Messpunkt markiert den arithmetischen Mittelwert der basalen mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration in einer Zelle (A-C). Ferner sind der arithmetische Mittelwert aller in einer Zelllinie gemessenen Messwerte sowie der dazugehörige Standardfehler des Mittelwertes mit horizontalen Strichen eingezeichnet (A-C). Während in A und C die Messergebnisse der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration ohne Oleat-Behandlung der mit dem Plasmid Pericam MT (A) bzw. mit dem Plasmid D3cpv (B) transfizierten Zelllinien gezeigt sind, sind in C die Ergebnisse der mitochondrialen Ca^{2+} -Messung der mit dem Plasmid D3cpv transfizierten Zellen nach Oleat-Behandlung aufgetragen. Anzahl der gemessenen Zellen: A = 232 Zellen; B = 84 Zellen; C = 241 Zellen.

Alle Messungen stellen biologische Replikate mit $N = 2$ dar. Statistische Analyse mittels Kolmogorov-Smirnov-Test durch Vergleich aller Zellen einer Zelllinie. $***p \leq 0,001$, $*p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant. YFP, *Yellow fluorescent protein*; CFP, *Cyan fluorescent protein*.

4.3. Bestimmung der Abundanz Ca^{2+} -kontrollierender Proteine

In den Fura-2-AM-basierten Experimenten zur Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase ließen sich PEX19-abhängige Unterschiede in der Ca^{2+} -Homöostase zwischen der WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie identifizieren. Zudem führten auch die Organellspezifischen mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen zur Feststellung von Unterschieden in der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration zwischen der WT- und den beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nach Oleat-Behandlung. Insbesondere zur Adressierung der Frage, ob die beobachteten Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase mit einer veränderten Abundanz Ca^{2+} -regulierender Proteine in den Zelllinien korrelieren, sollte im letzten Teil der Arbeit die Abundanz der wichtigsten in die Ca^{2+} -Homöostase involvierten Transporter und Kanäle auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden Zellen der WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit und ohne Oleat-Behandlung geerntet und mit 1% Triton X-100 Lysepuffer lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den hergestellten Lysaten mittels BCA-Analyse wurden gleiche Proteinmengen von jedem Zelllysate auf ein SDS-Gel geladen. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert und anschließend mit entsprechenden Primärantikörpern inkubiert. Es folgte die Inkubation mit fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern, deren Fluoreszenzsignale quantifiziert wurden. Infolgedessen ließen sich vergleichende Aussagen über die Abundanz des jeweiligen Ca^{2+} -kontrollierenden Transporters bzw. Kanals in der jeweiligen Zelllinie, WT, PEX19^{-/-} oder Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}, treffen.

4.3.1. Eine verminderte Abundanz von SERCA in Abwesenheit von wildtypischem PEX19

Das ER als größter Ca^{2+} -Speicher der Zelle verfügt über die ATP-abhängige SERCA (*Sarco/Endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase) zur Aufrechterhaltung der höheren Ca^{2+} -Konzentration im ER-Lumen im Vergleich zum Zytosol [168]. Der Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3)-Rezeptor stellt einen der wichtigsten Ca^{2+} -Efflux-Kanäle des ERs dar [84]. Essentiell für die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase sind außerdem STIM (*Stromal interaction molecule*)-Proteine, deren luminal gelegene Domänen als Ca^{2+} -Sensoren des ERs fungieren [134]. In den Fura-2-AM basierten Messungen zeichneten sich insbesondere nach Oleat-Behandlung der Zellen niedrigere Ca^{2+} -Konzentrationen im ER bei Abwesenheit von wildtypischem PEX19 ab, so dass hier getestet werden sollte, ob diese Veränderungen mit einer veränderten Abundanz der erwähnten Transporter und Kanäle des ERs korrelieren.

Abbildung 21 zeigt repräsentative Immunoblots gegen Ca^{2+} -regulierende Transporter und Kanäle des ERs der Lysate der WT-, PEX19^{-/-}- und beider Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung mit dazugehöriger Quantifizierung. Alle Antikörper konnten spezifische Banden mit einem apparenten Molekulargewicht, das dem errechneten Molekulargewicht entspricht, detektieren (Abbildung 21A). So wies IP3R3 ein apparentes Molekulargewicht von über 250 kDa auf, SERCA war bei etwa 90 kDa zu detektieren und für STIM1 ließen sich Banden zwischen 80-90 kDa beobachten. Die Ladekontrolle Tubulin zeigte ein apparentes Molekulargewicht von 50 kDa. Damit entsprachen die apparenten Molekulargewichte der detektierten Proteine in etwa den in der Literatur bzw. vom Hersteller beschriebenen Molekulargewichten (vergleiche Tabelle 21). Auf den gezeigten Immunoblots waren, außer im Falle von SERCA, bei der eine Reduktion der Signalstärke im Falle der unbehandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie auffiel, kaum Unterschiede in den Signalstärken zu erkennen (Abbildung 21A). Zur unvoreingenommenen quantitativen Analyse wurden die Immunoblots mittels Densitometrie quantifiziert (Abbildung 21B-D).

Zur Quantifizierung der Immunoblots wurden die Signale der Banden der Ca^{2+} -regulierenden Transporter und Kanäle des ERs durch den Wert des Signals der entsprechenden Tubulin-Ladekontrolle dividiert und anschließend zur Normalisierung ins Verhältnis zur Signalstärke der unbehandelten WT-Zelllinie gesetzt (Abbildung 21B-D). Daher wurde, wie in Abbildung 21B erkennbar, für die unbehandelte WT-Zelllinie ein Wert von 1,0 für die Abundanz von IP3R3 ermittelt. Gemittelt über alle Replikate ließen sich zwischen allen untersuchten Zelllinien keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Abundanz von IP3R3, sowohl ohne als auch nach Oleat-Behandlung, detektieren (Abbildung 21B). Damit lässt die Datenlage aufgrund der geringen beobachteten und statistisch nicht signifikanten Veränderungen der Abundanz von IP3R3 und der in Bezug dazu recht großen Standardabweichungen, insbesondere nach Oleat-Behandlung, die Aussage einer geringen Varianz der Abundanz von IP3R3 in den untersuchten Zelllinien vor und nach Oleat-Behandlung zu.

Die densitometrische Auswertung der mit Antikörpern gegen SERCA behandelten Membranen (Abbildung 21C) ergab aufgrund der Normalisierung auf die unbehandelte WT-Zelllinie ein Wert von 1,0 für die Abundanz von SERCA in der unbehandelten WT-Zelllinie (Abbildung 21C). Die Proben der unbehandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie ließen eine Abundanz von SERCA mit einem Wert von 0,6 errechnen. Im unbehandeltem Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie lag der Wert für die Abundanz von SERCA bei 0,75, während er in unbehandelten Zellen des Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie bei 0,57 lag.

Die berechneten Reduktionen der Abundanz von SERCA im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie erwiesen sich alle als statistisch signifikant. Nach Oleat-Behandlung ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz von SERCA zwischen den untersuchten Zelllinien feststellen (Abbildung 21C). Allerdings zeigte sich hier auch eine höhere experimentelle Streuung als in den Experimenten mit unbehandelten Zellen. Somit ergab sich, dass in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 ohne Oleat-Behandlung statistisch signifikante verringerte endogene Proteinlevel von SERCA im Vergleich zur WT-Zelllinie mit wildtypischem PEX19 nachweisbar waren, wohingegen nach Oleat-Behandlung lediglich nicht signifikante und deutlich weniger ausgeprägte Reduktionen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 erkennbar waren.

Die Quantifizierung der Immunoblots gegen STIM1 ergab, wie in Abbildung 21D gezeigt, für die unbehandelte WT-Zelllinie aufgrund der Normalisierung auf selbige einen Wert von 1,0 für die Abundanz von STIM1. Die Proben der unbehandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie ergaben im Mittel einen Wert von 1,08 für die Abundanz von STIM1. Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie wies mit 1,00 die gleiche Abundanz von STIM1 im Vergleich zu den Proben der unbehandelten WT-Zelllinie auf. Die Abundanz des STIM1 im unbehandelten Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie war mit 1,28 signifikant erhöht. Nach Oleat-Behandlung ergab sich für die WT-Zelllinie eine statistisch signifikante um 49% erhöhte Abundanz des STIM1 im Vergleich zur WT-Zelllinie unter basalen Bedingungen (Abbildung 21D). Die Oleat-behandelte PEX19^{-/-}-Zelllinie wies mit einem Wert von 1,66 die höchste Abundanz des STIM1 im Vergleich zu der WT- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie auf. Im Oleat-behandelten Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ließ sich ein Wert von 1,35 für die Abundanz von STIM1 berechnen, während dieser beim Oleat-behandelten Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie bei 1,58 lag.

Abschließend konnten so ohne Oleat-Behandlung in der PEX19^{-/-}- und Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie erhöhte endogene Proteinlevel von STIM1 nachgewiesen werden, wobei die Erhöhungen hier zwischen 8% und 28% im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie lagen. Nach Oleat-Behandlung konnte in der WT-, PEX19^{-/-}- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine höhere Abundanz von STIM1 im Vergleich zur WT-Zelllinie unter basalen Bedingungen nachgewiesen werden. Der Vergleich der Oleat-behandelten Zelllinien untereinander ergab nur für die PEX19^{-/-}- und Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie, jedoch nicht für Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie höhere Werte für die Abundanz des STIM1 im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie.

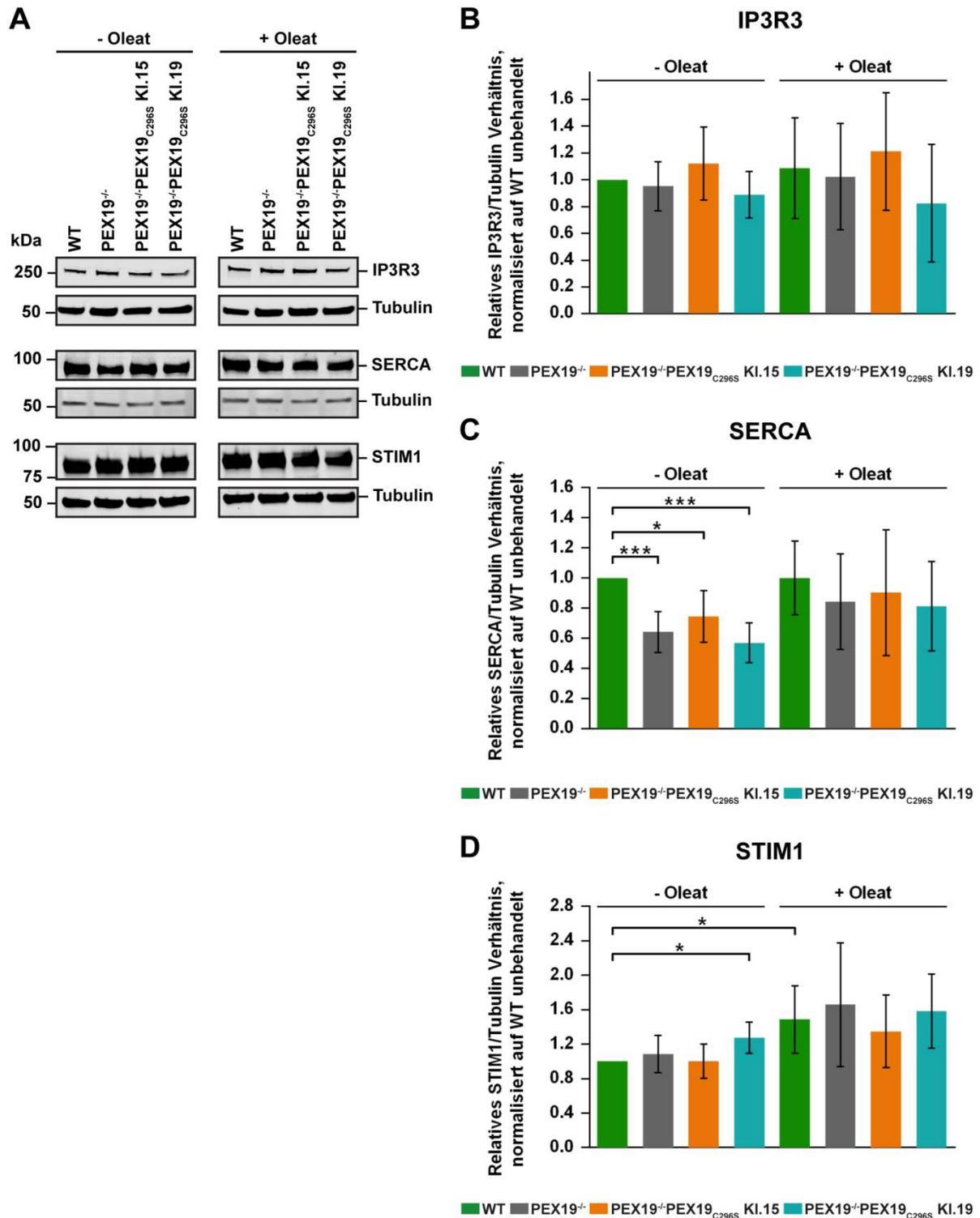


Abbildung 21: Immunoblot gegen Ca²⁺-regulierende Transporter und Kanäle des ERs in 1% Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19^{-/-}- und KI. 15 bzw. KI. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung. Gleiche Proteinmengen von 1% Triton X-100 Lysaten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation mit Primärantikörpern gegen den Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP₃)-Rezeptor Typ 3, SERCA, STIM1 und die Ladekontrolle Tubulin erfolgte die Detektion mittels fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper bei 700 bzw. 800 nm. In A sind die resultierenden Signale repräsentativer Immunoblots gezeigt. Die detektierten Signale der Immunoblots wurden quantifiziert und durch den entsprechenden Signalwert der Ladekontrolle Tubulin geteilt (B-D). Anschließend erfolgte die Normalisierung auf das Signal in der unbehandelten WT-Zelllinie. Gezeigt

sind die normalisierten Quantifizierungswerte für IP3R3 (B), SERCA (C) und STIM1 (D) getrennt nach Zelllinie WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 ohne und nach Oleat-Behandlung. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl der ausgewerteten Immunoblots (IP3R3, n = 6; SERCA, n = 7; STIM1, n = 6). Statistische Analyse mittels Welch-Test. Es sind nur statistische Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ eingetragen. *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$. IP3R3, Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP₃)-Rezeptor Typ 3; SERCA, *Sarco/Endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*; STIM1, *Stromal interaction molecule 1*.

4.3.2. Die Abundanz der Ca²⁺-regulierenden PMCA der Plasmamembran ist bei Fehlen von wildtypischem PEX19 reduziert

In der Ca²⁺-Homöostase des Zytoplasmas spielt die in der Plasmamembran lokalisierte PMCA (*Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) eine wichtige Rolle [193]. Sie pumpt Ca²⁺ aus dem Zytoplasma über die Membran in den Extrazellularraum und wirkt mit dieser sogenannten Ca²⁺-*Clearance* einer potentiell toxischen Überladung des Zytoplasmas mit Ca²⁺ entgegen [78]. In vorangegangenen Fura-2-AM-basierten Ca²⁺-Messungen zeichnete sich eine veränderte SOCE-Dynamik in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 ab, die unter anderem eine veränderte Aktivität der Ca²⁺-Clearance bzw. der PMCA vermuten ließ (vergleiche Abbildung 15). Daher sollte in diesem Experiment untersucht werden, ob die beobachteten Veränderungen der SOCE-Dynamik mit einer veränderten Abundanz der PMCA einhergehen und so einen entscheidenden Beitrag zur Ursachenforschung der veränderten SOCE-Dynamik liefern könnten.

Abbildung 22A zeigt einen repräsentativen Immunoblot gegen PMCA in der WT-, PEX19^{-/-}- sowie beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. In allen Proben konnte für die Detektion der PMCA eine spezifische Bande bei etwa 150 kDa nachgewiesen werden, was nah an dem errechneten Molekulargewicht von 140 kDa liegt. Mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 kDa liefen die distinkten Banden von Tubulin auf Höhe des erwarteten Molekulargewichtes. Bei Betrachtung der Bandenintensitäten ließ sich eine Abnahme der Bandenintensitäten in Kl. 15 und Kl. 19 der unbehandelten PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie beobachten. Nach Oleat-Behandlung ließen sich in der PEX19^{-/-}- sowie in Kl. 15 und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie schwächere Banden als in der Oleat-behandelten WT-Zelllinie erkennen (Abbildung 22A).

Nach densitometrischer Quantifizierung der PMCA-Signale und Normalisierung auf die Signale der Ladekontrolle Tubulin ergab sich für die Proben der unbehandelten WT-Zelllinie im Mittel ein Wert von 1,0 für die Abundanz von PMCA (Abbildung 22B). Bei der

unbehandelten PEX19^{-/-}- und Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ergaben sich Werte von 0,68 bzw. 0,77 für die Abundanz von PMCA. Mit einem Wert von 0,62 für die Abundanz von PMCA zeichnete sich im unbehandelten Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie die größte Reduktion im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie ab. Nach Oleat-Behandlung lag der Wert der Abundanz von PMCA in der WT-Zelllinie bei 1,52 (Abbildung 22B). In der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie lag der Wert für die Abundanz von PMCA bei 0,96. Im Oleat-behandelten Kl. 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie war mit 1,03 eine vergleichbare Abundanz von PMCA wie in der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie erkennbar. Eine noch deutlichere Reduktion der Abundanz von PMCA im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie war im Oleat-behandelten Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mit einem Wert von 0,67 für die Abundanz von PMCA ermittelbar.

Zusammenfassend konnte unter basalen Bedingungen ohne Oleat-Behandlung eine Reduktion der endogenen Proteinlevel von PMCA im Vergleich zur WT-Zelllinie in der PEX19^{-/-}- sowie in Kl. 15 und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zwischen 23-38% beobachtet werden. Nach Induktion der LT-Biogenese waren größere Standardabweichungen der Abundanz von PMCA im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennbar, weshalb hier auf stark schwankende Proteinlevel der PMCA unter LT-Biogenese induzierenden Bedingungen geschlossen werden konnte. Dennoch zeichneten sich auch nach Induktion der LT-Biogenese in der PEX19^{-/-}- sowie in Kl. 15 und Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie eine deutliche Reduktion von PMCA zwischen 49-85% ab.

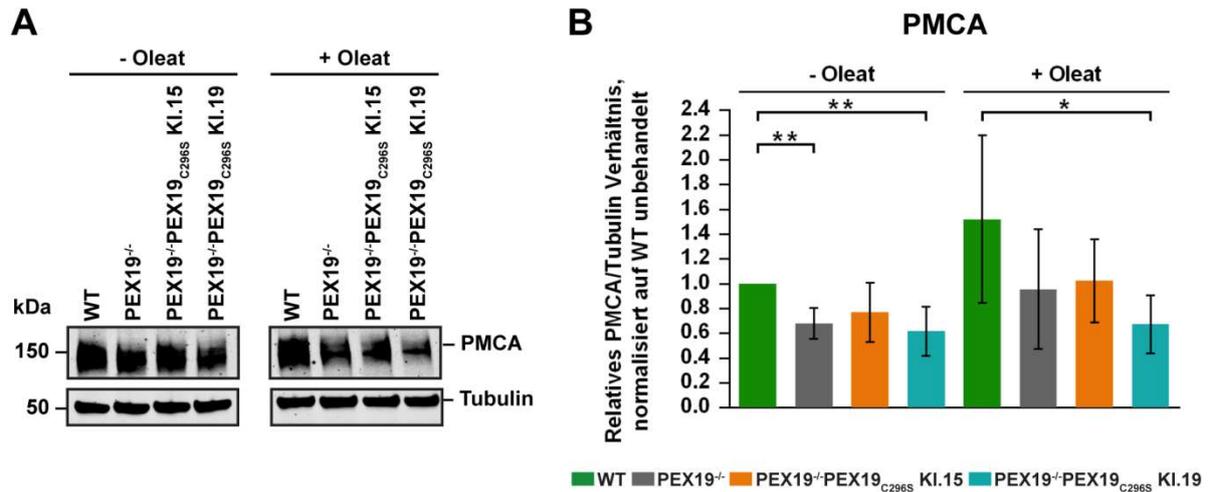


Abbildung 22: Immunoblot gegen die in die Ca^{2+} -Clearance involvierte PMCA in 1% Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19^{-/-}- und KI. 15 bzw. KI. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung. Gleiche Proteinmengen von 1% Triton X-100 Lysaten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation mit Primärantikörpern gegen PMCA und die Ladekontrolle Tubulin erfolgte die Detektion mittels fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper bei 700 bzw. 800 nm. In A sind die resultierenden Signale eines repräsentativen Immunoblots gezeigt. Die detektierten Signale der Immunoblots wurden quantifiziert und durch den entsprechenden Signalwert der Ladekontrolle Tubulin geteilt. Anschließend erfolgte die Normalisierung auf das Signal der unbehandelten WT-Zelllinie (B). Gezeigt sind die normalisierten Quantifizierungswerte für PMCA getrennt nach Zelllinie WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 ohne und nach Oleat-Behandlung (B). Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. n = Anzahl der ausgewerteten Immunoblots (n = 6). Statistische Analyse mittels Welch-Test. Es sind nur statistische Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ eingetragen. ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$. PMCA, Plasma membrane Ca^{2+} ATPase.

4.3.3. Reduzierte Abundanz von mitochondrialen Ca^{2+} -regulierenden Transportern und Kanälen in Zellen ohne wildtypisches PEX19

In vorherigen Experimenten wurden PEX19-abhängige Unterschiede in den Nicht-ER- Ca^{2+} -Speichern beobachtet. Da Mitochondrien als potentiell zweitgrößte Ca^{2+} -Speicher der Zellen [44] zur Entstehung dieses Phänotyps beigetragen haben könnten, wurden Organell-spezifische Ca^{2+} -Messungen mit mitochondrial lokalierenden Ca^{2+} -Sensoren durchgeführt. Hierbei konnten unter Induktion der LT-Biogenese erhöhte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie aufgezeigt werden (vergleiche Abbildung 20). Daher sollte im folgenden Versuch untersucht werden, ob sich unter diesen Bedingungen auch Unterschiede in Ca^{2+} -regulierenden Transportern und Kanälen der Mitochondrien auf Proteinabundanzebene manifestierten.

Repräsentative Immunoblots gegen die in die mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase involvierten Transporter bzw. Kanäle MCU und VDAC aller untersuchten Zelllinien ohne und nach Oleat-Behandlung sind in Abbildung 23A dargestellt. Es waren für MCU und VDAC wie erwartet distinkte Banden bei etwa 30 kDa detektierbar. Im Falle von MCU ließen sich unabhängig von der Induktion der LT-Biogenese bereits optisch schwächer erscheinende Signale in den Proben der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie bei beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie erkennen. Die Banden für VDAC zeigten in etwa gleiche Bandenintensitäten in den untersuchten 1% Triton X-100 Lysaten. Für Tubulin wurde in allen Proben eine Bande bei 50 kDa sichtbar. Die Quantifizierung ergab im Falle von MCU ein konsistentes Bild zu den bereits beobachteten verringerten Bandenintensitäten von MCU in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 (Abbildung 23B). So ließen sich in der unbehandelten $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie in beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie signifikante Reduktionen der Abundanz von MCU um etwa 32-39% quantifizieren. Nach Induktion der LT-Biogenese zeichnete sich in der WT-Zelllinie ein Wert von 1,13 für die Abundanz von MCU ab (Abbildung 23B). In der Oleat-behandelten $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie ergab sich ein Wert von 0,80 für die Abundanz von MCU. Der Oleat-behandelte Kl. 19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie wies mit einem Wert von 0,79 für die Abundanz von MCU einen ähnlichen Wert wie die Oleat-behandelte $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie auf. In Kl. 15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie konnte unter Induktion der LT-Biogenese mit einem Wert von 0,88 die geringste Reduktion der Abundanz von MCU im Vergleich zur WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und Kl.19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie unter LT-Biogenese induzierenden Bedingungen beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ließ die Datenlage in unbehandelten Zellen den Schluss einer verminderten Abundanz von MCU in der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie in beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie zu. Nach Oleat-Behandlung waren ebenfalls verminderte endogene Proteinlevel von MCU nachweisbar, obgleich hier, wie auch in den vorherigen Quantifizierungen, größere Standardabweichungen zwischen Replikaten derselben Zelllinie als ohne Induktion der LT-Biogenese auftraten (Abbildung 23B).

Die Abundanz von VDAC war, wie in Abbildung 23C gezeigt, in der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie in beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne Oleat-Behandlung im Vergleich zur ebenfalls unbehandelten WT-Zelllinie um etwa 33-47% vermindert. Die Reduktionen der Abundanz von VDAC in diesen Proben stellten sich alle als signifikant heraus. Nach Induktion der LT-Biogenese war die Abundanz von VDAC in der WT-Zelllinie mit einem Wert von 0,96 im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie kaum verändert. Bei der Oleat-behandelten $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie ließ sich ein Wert für die Abundanz von VDAC von 0,69 bestimmen. Der Oleat-behandelte Kl.15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie zeigte mit einem Wert für die

Abundanz von VDAC von 0,78 ebenfalls eine Reduktion der Abundanz von VDAC im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie. Nach Induktion der LT-Biogenese konnte in den Proben des Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie eine Reduktion der Abundanz von VDAC um 28% ermittelt werden (Abbildung 23C). Damit konnte ohne Induktion der LT-Biogenese eine signifikante Reduktion der endogenen Proteinlevel von VDAC um 33-47% in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 nachgewiesen werden, wohingegen sich nach Oleat-Behandlung zwar ebenfalls Reduktionen der Abundanz von VDAC um 18-28% in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 ergaben, diese jedoch nicht signifikant waren.

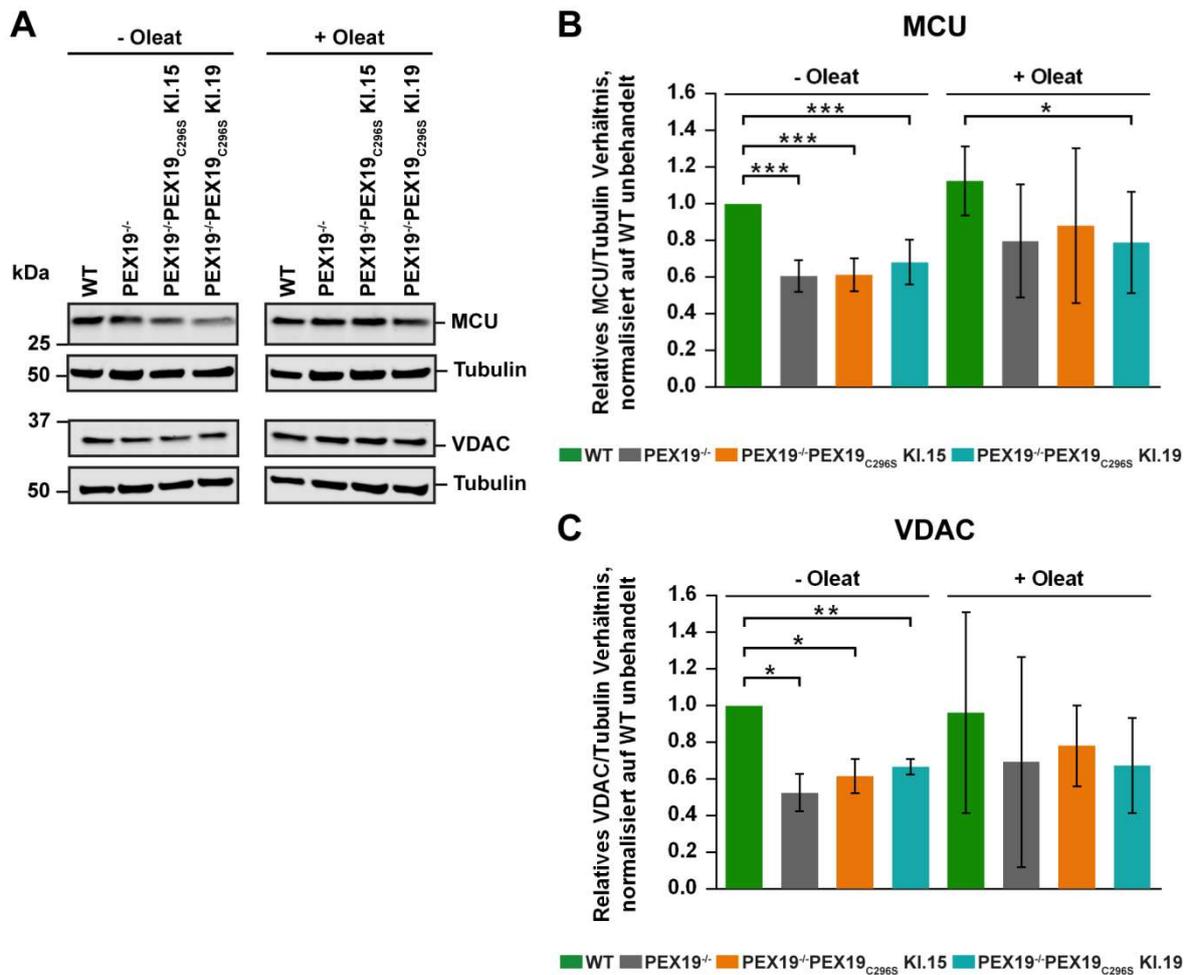


Abbildung 23: Immunoblot gegen den mitochondrialen Ca^{2+} -Kanal VDAC bzw. den Ca^{2+} -Transporter MCU in Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19^{-/-} und KI. 15 bzw. KI. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung. Gleiche Proteinmengen von 1% Triton X-100 Lysaten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation mit Primärantikörpern gegen MCU, VDAC und die Ladekontrolle Tubulin erfolgte die Detektion mittels fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper bei 700 bzw. 800 nm. In A sind die resultierenden Signale repräsentativer Immunoblots gezeigt. Die detektierten Signale der Immunoblots wurden quantifiziert und durch den entsprechenden Signalwert der Ladekontrolle Tubulin geteilt. Anschließend erfolgte die Normalisierung auf das Signal der unbehandelten WT-Zelllinie (B+C). Gezeigt sind die normalisierten Quantifizierungswerte für VDAC und MCU getrennt nach Zelllinie WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 ohne und nach Oleat-Behandlung (B+C). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl der ausgewerteten Immunoblots (MCU, n = 7; VDAC, n = 3). Statistische Analyse mittels Welch-Test. Es sind nur statistische Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ eingetragen. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$. MCU, Mitochondrial Ca^{2+} uniporter; VDAC, Voltage dependent anion channel.

Die beobachtete Reduktion von mitochondrialen Proteinen könnte auf der einen Seite durch eine verminderte Abundanz des entsprechenden Proteins oder auf der anderen Seite durch eine veränderte Mitochondrienabundanz verursacht worden sein. Atmungskettenproteine zählen zu den abundantesten Proteinen in Mitochondrien [119], so dass eine Immunoblotanalyse dieser Proteine einen ersten Hinweis darüber geben sollte, ob die Mitochondrienabundanz in den Triton X-100 Lysaten der verschiedenen Zellen verändert war.

Abbildung 24A zeigt das Ergebnis des Immunoblots gegen die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe I (NDUFB88), II (SDHB), III (UQCRC2), IV (MTCO1) und V (ATP5A) in der WT-, PEX19^{-/-}- sowie beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung. Für alle Komplexe ließen sich distinkte Banden beobachten, was mit den erwarteten Molekulargewichten von 55 kDa (Komplex V), 48 kDa (Komplex III), 30 kDa (Komplex II) und 20 kDa (Komplex I) übereinstimmte (Abbildung 24A). Die beobachtete Abweichung in der Laufweite des Komplex IV im Gel mit einem erwarteten Molekulargewicht von 57 kDa ist auf die hohe Hydrophobizität von MTCO1 zurückzuführen [185,186]. Die Tubulinsignale waren auf einer Höhe von etwa 50 kDa erkennbar.

In der unbehandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie stellten sich bei der nachfolgenden Quantifizierung die Komplexe I, III und IV mit im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie um 57-65% reduzierter Abundanz dar (Abbildung 24B). Die Abundanz der Komplexe II und V war mit Werten von 0,64 bzw. 0,77 weniger deutlich vermindert. Im unbehandelten Klon 15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ergab sich ebenfalls die deutlichste Reduzierung der Abundanz für die Komplexe I, III und IV mit Werten von 0,50, 0,49 bzw. 0,37. Komplex II und V wiesen Werte für die Abundanz von 0,74 bzw. 0,93 auf. Die Abundanz der Atmungskettenkomplexe im unbehandelten Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie war insgesamt betrachtet weniger stark reduziert als in der unbehandelten PEX19^{-/-}- und in Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. So war für die Komplexe I, II, III und IV eine reduzierte Abundanz im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie um 31-55% erkennbar, wohingegen Komplex V einen Abundanzwert von 0,90 aufwies.

Wie in Abbildung 24B dargestellt, ließen sich nach Induktion der LT-Biogenese für die Komplexe I, III, IV und V mit Werten für die Abundanz von 1,05, 0,92, 1,07 bzw. 1,08 ähnliche endogene Proteinlevel dieser Komplexe wie in der unbehandelten WT-Zelllinie nachweisen. Lediglich Komplex II wies in der Oleat-behandelten WT-Zelllinie eine um 38% erhöhte Abundanz im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie auf. Bei Betrachtung aller nach Oleat-Behandlung untersuchten Proben fallen die deutlich höheren Werte der

Standardabweichung im Vergleich zu den unbehandelten Proben auf (Abbildung 24B). Die Oleat-behandelte PEX19^{-/-}-Zelllinie zeigte mit Werten von 0,41 bzw. 0,33 für die Abundanz von Komplex III bzw. Komplex IV die deutlichsten Reduktionen im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie. Die Abundanzwerte der Komplex I und V in der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie wiesen ähnliche Werte von 0,79 bzw. 0,82 auf. Die Abundanz von Komplex II in der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}-Zelllinie lag bei 0,93 und war damit um 45% niedriger als in der Oleat-behandelten WT-Zelllinie. Im Oleat-behandelten Kl. 15 der PEX19^{-/-}-Zelllinie ließen sich für die Komplexe II und IV mit um 54% bzw. 73% reduzierten endogenen Proteinleveln im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie die deutlichsten Reduktionen der Abundanz nachweisen. Die Abundanz von Komplex III im Kl. 15 der Oleat-behandelten PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie lag bei 0,48. Mit Werten für die Abundanz von 0,82 bzw. 0,81 ließen sich sehr ähnliche Werte für die Komplexe I und V im Oleat-behandelten Kl.15 der PEX19^{-/-}-Zelllinie bestimmen. Im Oleat-behandelten Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie konnten die deutlichsten Reduktionen der Atmungskettenkomplexe mit einer Reduzierung um 82% bei Komplex II und 68% bei Komplex IV im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie beobachtet werden. Die Abundanz von Komplex I lag im Oleat-behandelten Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie bei 0,64. Für die Abundanz von Komplex III und V ließen sich im Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie Werte von 0,52 bzw. 0,75 bestimmen.

Abschließend ließen sich sowohl ohne Induktion als auch nach der Induktion der LT-Biogenese verminderte endogene Proteinlevel der Atmungskettenkomplexe in allen Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 nachweisen. Ohne Induktion der LT-Biogenese wurde hier eine stärkere Reduktion der Abundanz der Komplexe I, III und IV beobachtet als bei der Abundanz der Komplexe II und V. Diese Tendenz ließ sich nach Induktion der LT-Biogenese nur noch für Komplex IV in allen Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 reproduzieren, was auch durch die deutlich höhere Abundanz von Komplex II in der Oleat-behandelten WT-Zelllinie bedingt war.

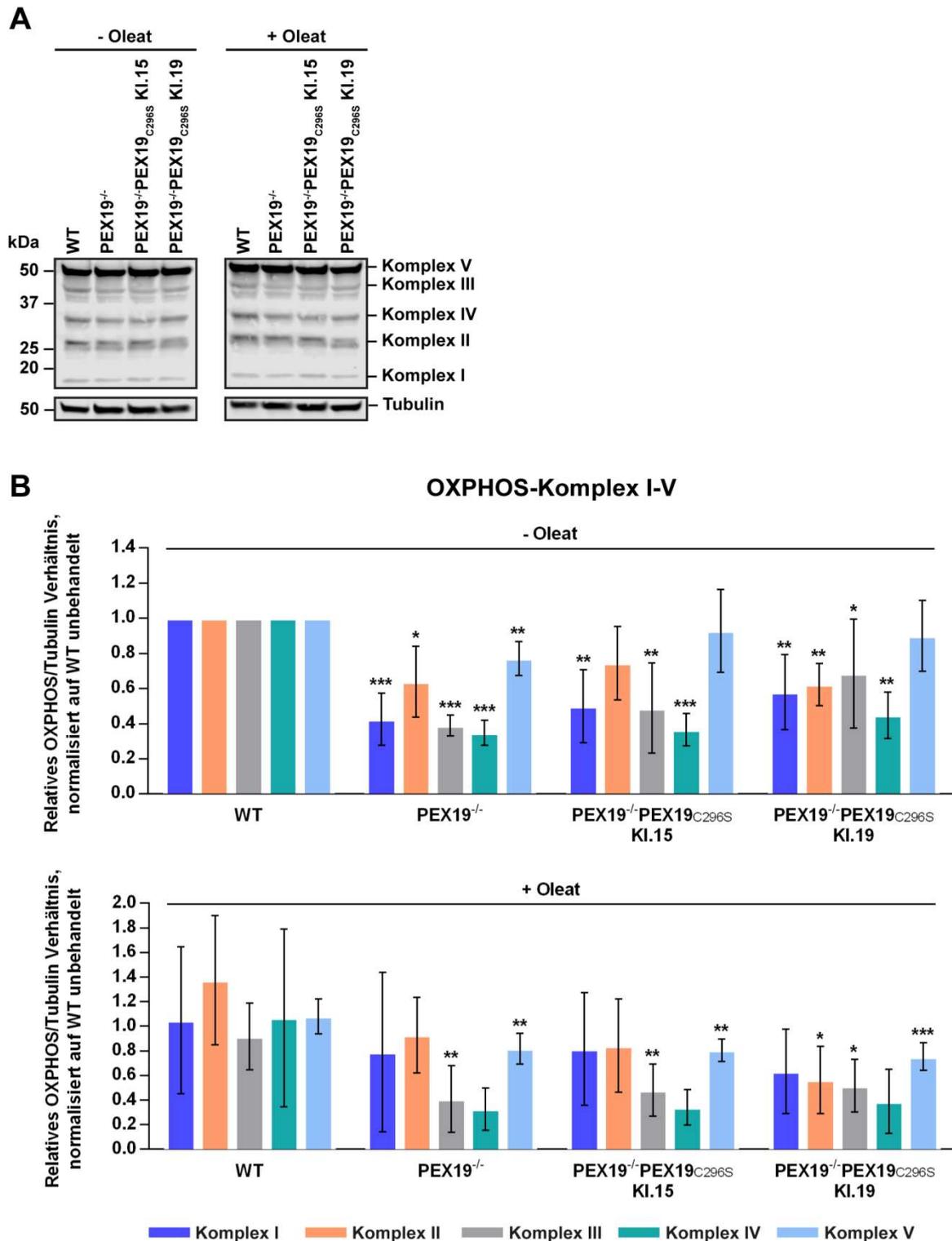


Abbildung 24: Immunoblot gegen Proteine der Atmungskette in Triton X-100 Lysaten der WT-, PEX19^{-/-}- und KI. 15 bzw. KI. 19 der PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zelllinie ohne und nach Oleat-Behandlung der Zellen mit dazugehöriger Quantifizierung. Gleiche Proteinmengen von 1% Triton X-100 Lysaten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation mit Primärantikörpern gegen die OXPHOS (Oxidative Phosphorylierung)-Komplexe I-V und die Ladekontrolle Tubulin erfolgte die Detektion mittels fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper bei 700 bzw. 800 nm. In A sind die resultierenden Signale eines repräsentativen Immunoblots gezeigt. Die detektierten Signale der Immunoblots wurden quantifiziert und durch den entsprechenden Signalwert der Ladekontrolle Tubulin geteilt. Anschließend erfolgte die

Normalisierung auf das Signal der unbehandelten WT-Zelllinie (B). Gezeigt sind die normalisierten Quantifizierungswerte für die Komplexe I-V getrennt nach den Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 ohne und nach Oleat-Behandlung (B). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl der ausgewerteten Immunoblots (Komplex I, n = 6; Komplex II, n = 5; Komplex III, n = 7; Komplex IV, n = 5; Komplex V, n = 7). Statistische Analyse mittels Welch-Test. Die Signifikanztestung der unbehandelten Zelllinien bezieht sich immer auf den Vergleich mit der unbehandelten WT-Zelllinie wohingegen sich die Signifikanztestung der Oleat-behandelten Zelllinien immer auf den Vergleich mit der Oleat-behandelten WT-Zelllinie bezieht. Es sind nur statistische Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ eingetragen. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

Es waren nicht alle Atmungskettenkomplexe bei Abwesenheit von wildtypischem PEX19 gleichmäßig in ihrer Abundanz vermindert, sondern vor allem die Komplexe I, III und IV. Dahingegen zeigte sich die Abundanz der Komplexe II und V weniger stark reduziert, weshalb die Ergebnisse hier eher dafür sprechen würden, dass nicht Mitochondrien generell vermindert in den Zellen vorliegen, sondern nur eine isolierte Reduktion der Komplexe I, III und IV vorliegt.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Frage, ob PEX19-vermittelte Funktionen Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homöostase haben. Dazu wurde neben einer WT (Wildtyp)-HeLa-Zelllinie auch eine bereits etablierte PEX19^{-/-} Zelllinie untersucht, in denen Peroxisomen vollständig fehlen [151]. Zur Differenzierung etwaiger Veränderungen auf die Ca^{2+} -Homöostase wurde zusätzliche eine PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie mitgeführt, welche ausschließlich farnesylierungsdefizientes PEX19 exprimiert und zur Rettung des peroxisomalen Phänotyps führt [151]. Eine Farnesylierung von PEX19 ist dabei essentiell für die Zielsteuerung von UBXD8 (*Ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein 8*) [151] und vermutlich auch weiteren Proteinen auf Lipidtröpfchen (LT) (AG Schrul, unveröffentlicht). In dieser Arbeit konnten erstmals PEX19-abhängige Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase nachgewiesen werden, die unter anderem den gesamtzellulären Ca^{2+} -Gehalt, die ER (Endoplasmatisches Retikulum)- Ca^{2+} -Homöostase sowie den SOCE (*Store-operated Ca^{2+} entry*) betrafen. Durch eine parallele Untersuchung der WT-, der PEX19^{-/-} und der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinien bestand die Möglichkeit, die beobachteten Effekte auf einen peroxisomalen Phänotyp oder einen LT-Proteom Phänotyp zurückzuführen.

5.1. Peroxisomaler Phänotyp vs. LT-Proteom Phänotyp

Ausgangspunkt für die Annahme eines peroxisomalen bzw. LT-Proteom-Phänotyps stellen unter anderem die Untersuchungen von Schrul und Kopito zur Insertion von Haarnadelproteinen, wie UBXD8, in LT dar [151]. So hängt die Lokalisierung von UBXD8 auf LT von der Farnesylierung von PEX19 ab. Ein vollständiges Fehlen von PEX19, aber auch das Fehlen der Farnesylierung von PEX19 führt zu einer Fehllokalisierung von UBXD8 in Mitochondrien. Folglich kommt es in der PEX19^{-/-}- sowie der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zu einem veränderten LT-Proteom durch Fehlen von UBXD8 auf LT. Da PEX19 für die Biogenese von Peroxisomen essentiell ist [112] sind in der PEX19^{-/-}-Zelllinie keine Peroxisomen nachweisbar [151]. Aufgrund der Tatsache, dass die Farnesylierung von PEX19 jedoch nicht essentiell für die Biogenese von Peroxisomen ist [171], sind in der farnesylierungsdefizienten PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Gegensatz zur PEX19^{-/-}-Zelllinie wieder Peroxisomen nachweisbar [151] (vergleiche Tabelle 1). Diesbezüglich konnte auf funktioneller Ebene im Gegensatz zur PEX19^{-/-}-Zelllinie die Synthese von Etherlipiden in der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nachgewiesen werden (AG Schrul, unveröffentlicht). Um zu differenzieren, ob sich etwaige Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase eher durch ein Fehlen von Peroxisomen, also einen peroxisomalen Phänotyp, oder durch ein verändertes LT-

Proteom und somit einem LT-Proteom Phänotyp erklären lassen, müssen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Ca^{2+} -Homöostase in Bezug zueinander gesetzt werden. Zeigt die $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie einen abweichenden Phänotyp von der WT-Zelllinie und lässt sich der wildtypische Phänotyp auch in der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ Zelllinie nicht wiederherstellen, kann angenommen werden, dass der Phänotyp der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie durch ein verändertes LT-Proteom verursacht wird. Andererseits legt ein veränderter Phänotyp im Vergleich zur WT-Zelllinie, der sich ausschließlich in der $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie, nicht aber in der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ Zelllinie zeigt, den Schluss eines peroxisomalen Phänotyps nahe. Eine absolute Schlussfolgerung auf einen peroxisomalen Phänotyp bzw. LT-Proteom Phänotyp ist unzulässig, da es noch weitere PEX19 -Effekte geben könnte. Dabei ist insbesondere ungeklärt, ob die Farnesylierung von PEX19 möglicherweise noch weitere Effekte außer einer Beeinflussung der Lokalisation von LT-Proteinen hat.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Fura-2-AM-basierten sowie mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen in der WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne und mit Induktion der LT-Biogenese gezeigt. Die Phänotypen der $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie unterschieden sich in Bezug auf das gesamtzelluläre Ca^{2+} , das ER- Ca^{2+} -Leck und den SOCE vom Phänotyp der WT-Zelllinie. Damit sind die beobachteten Effekte nicht allein durch das Fehlen von Peroxisomen zu erklären, sondern legen die Annahme nahe, dass ein verändertes LT-Proteom mitverantwortlich sein könnte. Im Gegensatz dazu ließ sich in unbehandelten Zellen zumindest mit dem mitochondrialen Ca^{2+} -Sensor Pericam MT nur in der $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie, aber nicht in der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie eine höhere mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration messen. Diese Beobachtung würde für einen peroxisomalen Phänotyp sprechen. Nicht einzuordnende Phänotypen ergaben sich bei der Untersuchung der Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher, denn hier zeigten Kl. 15 und Kl.19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie gegensätzliche Messergebnisse. Darüber hinaus konnten auch die mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen mit Oleat-behandelten Zelllinien weder einem peroxisomalen noch einem LT-Proteom Phänotyp zugeordnet werden. Denn hier ließ sich nur in der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ein abweichender Phänotyp zur WT-Zelllinie beobachten.

Tabelle 24: Übersicht über die Fura-2-AM-basierten sowie mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen in der WT-, PEX19^{-/-}- sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und mit Induktion der LT-Biogenese. Es wurde das gesamtzelluläre Ca^{2+} , das ER- Ca^{2+} -Leck, der SOCE, die Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher sowie die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Die Pfeile symbolisieren eine Erhöhung bzw. Reduktion der gemessenen Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol bzw. der mitochondrialen Matrix der PEX19^{-/-}- sowie der beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie gegenüber der WT-Zelllinie. Zudem ist angezeigt, ob die abweichenden Phänotypen von der WT-Zelllinie eher einem LT-Proteom oder einem peroxisomalen Phänotyp zuzuschreiben sind. ER, Endoplasmatisches Retikulum; LT, Lipidtröpfchen; SOCE, *Store-operated Ca²⁺ entry*.

Kompartiment	WT	PEX19 ^{-/-}	PEX19 ^{-/-} PEX19 _{C296S}	Oleat	Effekt
Gesamtzelluläres Ca^{2+}	=	↓	↑	- Oleat	LT-Proteom Phänotyp
	=	↓	↓	+ Oleat	
ER- Ca^{2+} -Leck	=	↓	↓	-/+ Oleat	
SOCE	=	=	=	- Oleat	
	=	verändert	verändert	+ Oleat	
Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher	=	↓	?	-/+ Oleat	Unklarer Phänotyp
Mitochondriales Ca^{2+}	=	↑/=	=	- Oleat	Peroxisomaler Phänotyp
	=	=	↑	+ Oleat	Unklarer Phänotyp

5.2. Die Veränderung der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von PEX19

In den ersten Fura-2-AM basierten Messungen zur Untersuchung der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration zeichneten sich ohne Induktion der LT-Biogenese im Mittel vergleichbare gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen ab. Doch zwischen den einzelnen Messtagen der unbehandelten Zelllinien zeigten sich große Schwankungen bei der Messung der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration (vergleiche Anhang 6.1.). Angesichts der Tatsache, dass schlussendlich nur in Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie eine signifikante Veränderung des Maximums der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgemacht werden konnte und auch die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration über die Zeit in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 nur Reduktionen von 10% ergaben, war in unbehandelten Zellen die Ausgangsfragestellung einer veränderten gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration eher zu

verneinen. Im Gegensatz dazu führte die Oleat-Behandlung in der WT-Zelllinie zu einer erhöhten gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration, wobei sich in der Oleat-behandelten $\text{PEX19}^{-/}$ -Zelllinie eine deutliche und reproduzierbare Reduktion der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie abzeichnete. Trotz experimenteller Schwankungen der beiden Oleat-behandelten Klone der $\text{PEX19}^{-/}$ - $\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie deutete das Ergebnis im Mittel in der Tendenz auf eine Reduktion der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie hin (vergleiche Anhang 6.1.). Zur weiteren Beantwortung der Frage einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase sollten nun gezielt bestimmte Kompartimente der Zelle hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Konzentration untersucht werden. Allerdings implizierten bereits die ersten Messungen, dass sowohl die Induktion der LT-Biogenese als auch die Abwesenheit eines wildtypischen PEX19 einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle haben könnten.

5.3. In Abhängigkeit von PEX19 zeigt sich eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase des ER

Nachdem die Messungen des gesamtzellulären Ca^{2+} in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 nach Induktion der LT-Biogenese auf eine verminderte gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration hinwiesen, stellte die naheliegendste Ursache eine Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration im Hauptspeicher der Zelle für Ca^{2+} , dem ER, dar [168]. Tatsächlich ließen sich in allen Fura-2-AM-basierten Messungen mit Thapsigargin, welche das ER- Ca^{2+} -Leck demaskierten [5] und somit indirekt Rückschlüsse auf die Ca^{2+} -Konzentration im ER ermöglichten, verminderte Ca^{2+} -Konzentrationen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 messen. Damit ließ sich zumindest ein Teil der beobachteten Veränderungen in der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration erklären. Dabei entsprachen die absolut gemessenen Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von etwa 550-700 nM nach Thapsigargin-Gabe in etwa denen in der Literatur beschriebenen Werten. So wurden nach Thapsigargin-Gabe in HeLa-Zellen Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von etwa 500 nM beobachtet [46]. Bei direkter Messung der ER- Ca^{2+} -Konzentration in HeLa-Zellen mit genetisch codierten Ca^{2+} -Sensoren wurden Werte von 500-600 μM [12] bzw. 620-860 μM [162] gemessen. Damit ließen die Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zwar indirekte Schlüsse auf die Ca^{2+} -Konzentration im ER zu, eine direkte Messung der ER- Ca^{2+} -Konzentration ist aber nur mit genetisch codierten Ca^{2+} -Sensoren möglich [147].

Das Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Thapsigargin wird zum einen direkt durch die ER- Ca^{2+} -Konzentration, aber zum anderen auch von der Größe des ER- Ca^{2+} -Lecks beeinflusst. Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Faktoren in weiterführenden Studien wäre beispielsweise mit einer direkten Messung der intralumenalen Ca^{2+} -Konzentration des ERs mittels spezifisch lokalisierender Ca^{2+} -Sensoren möglich [142]. Spezifisch lokalisierende Ca^{2+} -Sensoren zur Messung der ER- Ca^{2+} -Konzentration basieren auf Aequorin oder GFP in Verbindung mit einem Ca^{2+} -bindenden Protein und einer ER-lokalisierenden Signalsequenz [147]. So könnte untersucht werden, inwieweit direkt gemessene Ca^{2+} -Konzentrationen im ER mit dem durch Fura-2 gemessenen Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe korrelieren. Alternative methodische Ansätze zur Messung der ER- Ca^{2+} -Konzentration umfassen den Einsatz von Ca^{2+} -Indikatoren mit einer niedrigen Affinität für Ca^{2+} wie beispielsweise Mag-Fura2-AM [147]. Mag-Fura2-AM weist mit einem $K_d\text{-Wert}_{[\text{Ca}^{2+}]}$ von 14-65 μM [108] im Vergleich zu Fura-2 mit einem $K_d\text{-Wert}_{[\text{Ca}^{2+}]}$ von 0,23 μM [129] eine deutlich erniedrigte Ca^{2+} -Affinität auf. Dies führt dazu, dass eventuell im Zytosol verbliebenes Mag-Fura2 aufgrund der niedrigen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kaum im Ca^{2+} -gebundenen Zustand vorliegt [147]. Als kritisch ist bei diesem Ansatz zur Bestimmung der ER- Ca^{2+} -Konzentration allerdings der Anteil des Mag-Fura2, der im ER lokalisiert, anzusehen. Dieser ist von der Aktivität der unspezifischen Esterasen im Zytosol und im ER abhängig [147]. So ist anzunehmen, dass eine hohe Aktivität unspezifischer Esterasen im Zytosol zu einer fast vollständigen, in diesem Fall als Fehllokalisierung zu bezeichnenden, Lokalisierung von Mag-Fura-2 ins Zytosol führen kann. Damit stellt sich die Messung mithilfe spezifisch ins ER lokalisierender Ca^{2+} -Sensoren als einzige sinnvolle Alternative zur direkten Messung der ER- Ca^{2+} -Konzentration dar.

Die direkte Messung des ER- Ca^{2+} -Lecks ist schwierig. Eine Möglichkeit zur indirekten Untersuchung stellt die Untersuchung der für das ER- Ca^{2+} -Leck verantwortlichen Kanäle wie zum Beispiel Sec61 dar [91]. So ließe sich die Abundanz dieser Kanäle in Abhängigkeit von PEX19 mittels geeigneter Antikörper und Immunoblots feststellen und so ein möglicherweise verändertes ER- Ca^{2+} -Leck vermuten. Konsequenterweise wäre hier zusätzlich die Untersuchung der Abundanz von ER- Ca^{2+} -speichernden Proteinen, allen voran Calreticulin, essentiell, da diese direkten Einfluss auf die Konzentrationen von freiem Ca^{2+} im ER haben [135]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein weiteres Ca^{2+} -speicherndes Protein, nämlich BiP (Immunglobulin-bindendes Protein), durch Interaktion mit Sec61 direkten Einfluss auf das ER- Ca^{2+} -Leck hat [149].

Grundsätzlich ließen die in der vorliegenden Arbeit durch die reproduzierbar gemessenen verminderten Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen nach Thapsigargin-Gabe aber

eher den Rückschluss einer veränderten ER- Ca^{2+} -Konzentration zu. Denn gegen ein verändertes ER- Ca^{2+} -Leck sprach die Tatsache, dass auch über die Zeit in der zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen über dem basalen Niveau gemessen wurden, insgesamt in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 bei der Mehrzahl der Experimente weniger Ca^{2+} ins Zytosol gelangte. Wäre die ER- Ca^{2+} -Konzentration bei allen untersuchten Ziellinien gleich und nur das ER- Ca^{2+} -Leck vermindert, hätte man lediglich eine veränderte Kinetik der Ca^{2+} -Freisetzung über die Zeit erwartet, bei der sich die Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol über die Zeit wieder angeglichen hätte. Somit stellte sich die Frage, wodurch eine verminderte Ca^{2+} -Konzentration im ER verursacht worden sein könnte.

Einer der wichtigsten Transporter, der maßgeblich für die Ca^{2+} -Homöostase im ER verantwortlich ist, ist SERCA (*Sarco/Endoplasmic reticulum* Ca^{2+} ATPase) [84]. Unterschiede in der Abundanz von SERCA könnten somit Unterschiede in der Ca^{2+} -Konzentration des ER bei Abwesenheit von wildtypischem PEX19 erklären. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Reduktionen der Abundanz von SERCA um durchschnittlich 36% in unbehandelten Zellen und 15% in Oleat-behandelten Zellen der PEX19^{-/-}- und KI.15 bzw. KI.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie beobachtet werden. Die damit gezeigte verringerte Abundanz von SERCA könnte somit eine Ursache für die verringert gemessenen ER- Ca^{2+} -Konzentration sein. Denn mit einer Reduktion der Abundanz von SERCA im ER ist eine verringerte Ca^{2+} -Konzentration im ER anzunehmen [130], welche in einem verminderten ER- Ca^{2+} -Leck resultiert. Eine reduzierte Ca^{2+} -Konzentration im ER hat sich in der vorliegenden Arbeit in den gemessenen niedrigeren Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Thapsigargin-Gabe bei Abwesenheit von wildtypischem PEX19 widerspiegelt. So konnte in unbehandelten Zellen ohne wildtypisches PEX19 im Mittel auf um 108 nM bzw. um 16,9% reduzierte ER- Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie geschlossen werden. Auf der anderen Seite ließ sich in Oleat-behandelten Zellen ohne wildtypisches PEX19 im Mittel auf um 173 nM bzw. um 21,4% reduzierte ER- Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie schließen. Infolgedessen ergaben die Ergebnisse dieser Arbeit eine positive Korrelation zwischen der verminderten Abundanz von SERCA und einer reduzierten ER- Ca^{2+} -Konzentration. Zugleich indizieren die Ergebnisse der Messungen der ER- Ca^{2+} -Konzentration nach Induktion der LT-Biogenese, dass die Erhöhung der gesamtzellulären Ca^{2+} -Konzentration in der WT-Zelllinie im Mittel um 722 nM im Vergleich zur PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nicht allein durch eine vermehrte Speicherung von Ca^{2+} im ER erklärbar ist. Denn hier zeigten sich im Mittel in der WT-Zelllinie nur um 173 nM erhöhte ER- Ca^{2+} -Konzentrationen. Folglich müssen für den Phänotyp der erhöhten

Speicherung von Ca^{2+} in der WT-Zelllinie nach Oleat-Behandlung auch Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher der Zelle mitverantwortlich sein.

Die verminderte ER- Ca^{2+} -Konzentration kann weitreichende Folgen haben, so kann es zu einer verminderten Chaperonaktivität kommen, die schließlich in einer pathologischen ER-Homöostase mit Aktivierung der UPR (*Unfolded Protein Response*) resultiert [130,150]. In übergewichtigen Mäusen ließ sich eine Verminderung von SERCA nachweisen, was den Schluss nahe legt, dass eine pathologische ER-Homöostase mit einer gestörten LT-Homöostase einhergeht [130]. In der Studie von Park *et al.* konnte eine Reduktion der endogenen SERCA2b-Level in übergewichtigen Mäusen von über 90% nachgewiesen werden [130]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Oleat-Behandlung über Nacht könnte so zu einer, ähnlich wie in übergewichtigen Mäusen, gestörten LT-Homöostase führen. Dabei fiel der Zeitraum der gestörten LT-Homöostase, durch exzessive Oleat-Zugabe über Nacht, in den Zellen dieser Arbeit jedoch deutlich geringer aus als in den Zellen der übergewichtigen Mäuse [130]. Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit zwar auch eine Reduktion der SERCA-Level beobachtet werden konnte, diese aber mit um 16,9% bzw. 21,4% reduzierter Abundanz von SERCA deutlich geringer ausfiel. Damit stellt die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Abundanz von SERCA einhergehend mit einer reduzierten ER- Ca^{2+} -Konzentration bereits einen ersten Erklärungsansatz für die in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 beobachtete gestörte LT-Homöostase mit verlangsamter Lipolyse der LT dar (AG Schrul, unveröffentlicht).

Darüber hinaus könnte in der PEX19^{-/-}- und Kl.15 bzw. Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie neben der verringerten Abundanz von SERCA auch eine reduzierte Aktivität von SERCA für die beobachteten Veränderungen in der ER- Ca^{2+} -Homöostase verantwortlich sein. In übergewichtigen Mäusen konnte ein direkte Korrelation zwischen einer pathologischen Lipid-Homöostase und einer inhibierten SERCA-Aktivität, einhergehend mit ER-Stress, aufgezeigt werden [52]. Dabei konnte ein erhöhtes Phosphatidylcholin/Phosphatidylethanolamin Verhältnis als Ursache für die Inhibierung von SERCA identifiziert werden [52]. Phosphatidylcholin stellt eines der am häufigsten vorkommenden Phospholipide auf der Phospholipid-Einzelschicht von LT dar [13], womit ein Zusammenhang zwischen der in übergewichtigen Mäusen veränderten Lipid-Homöostase und LT besteht. Da PEX19 für die korrekte Lokalisierung von UBXD8 und möglicherweise auch weiteren Proteinen auf LT essentiell ist [151], erscheint es möglich, dass eine veränderte Proteinzusammensetzung auf LT auch Auswirkungen auf die Lipid-Homöostase der Zelle hat. Folglich wäre in Zellen ohne wildtypisches PEX19 auch eine Veränderung der Lipidkomposition im ER denkbar, welche ihrerseits zum Phänotyp der indirekt gemessenen reduzierten ER- Ca^{2+} -Konzentration durch

Inhibierung der SERCA beitragen würde. Unveröffentlichte Daten der AG Schrul deuten darauf hin, dass die Phospholipidzusammensetzung in Zellen ohne wildtypisches PEX19 verändert ist. Ob dies der ER-Membran zuzuschreiben ist bleibt offen, da bisher nur Gesamtzell-Lipidome analysiert wurden.

Nicht nur die durch ein verändertes LT-Proteom bedingte Veränderung der Lipidkomposition könnte zu einer verminderten Aktivität der SERCA führen, sondern auch in die LT-Biogenese involvierte Proteine. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei das Protein Seipin ein, welches in mutierter Form erstmals in BSCL2 (Berardinelli-Seip kongenitale Lipodystrophie 2)-Patienten entdeckt wurde und sich klinisch als schwere Lipodystrophie manifestiert [103]. Seipin ist ein hoch konserviertes integrales Membranprotein des ER [102], dessen Struktur erst kürzlich aufgeklärt werden konnte [161,187]. Seipin ist in die Biogenese von LT involviert, weshalb ein *knockdown* von Seipin zur einer veränderten LT-Morphologie mit vielen kleinen und einzelnen sehr großen LT (>2 µm) führt. Die Formierung von sehr großen LT korrelierte dabei mit einer veränderten Anzahl von Lipid-synthetisierenden Enzymen in sich bildenden LT [178]. Eine Mutation in der Schleifenregion des Seipins, welche mit der in BSCL2-Patienten gefundenen Mutation vergleichbar war, resultierte in einer Aufhebung der Bindung zwischen Seipin und SERCA mit einer verminderten ER-Ca²⁺-Konzentration [21]. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivität von SERCA grundsätzlich auch durch andere Bindungspartner moduliert werden kann und zeigen eine direkte Verbindung zwischen der LT-Homöostase und der ER-Ca²⁺-Homöostase auf. Ein verändertes LT-Proteom könnte so über Seipin indirekt Einfluss auf die Aktivität von SERCA haben. Erst jüngst konnte das Protein LDAF1 (*lipid droplet assembly protein 1*) mittels Biotinylierung als LT-Protein verifiziert werden [20]. LDAF1 kolokalisiert mit Seipin und determiniert so den Ort der Entstehung der LT in der ER-Membran [38,41]. Während der Reifung der LT relokalisiert LDAF1, welches wie UBXD8 eine Haarnadel-Form der hydrophoben Domänen aufweist, vom ER in die LT-Membran [41]. Dabei hängt die ER-LT-Verteilung des LDAF1 von der Seipin-Abundanz ab [38]. Folglich scheint Seipin so einerseits direkten Einfluss auf das LT-Proteom zu haben und andererseits kooperative Effekte bei der LT-Biogenese mit LT-Proteinen aufzuweisen. Infolgedessen scheint eine indirekte Modulierung der SERCA-Aktivität durch mit Seipin interagierende LT-Proteine möglich zu sein. In den Zelllinien, die kein PEX19 oder ein farnesylierungsdefizientes PEX19 aufweisen wäre es somit denkbar, dass das Fehlen bestimmter LT-Proteine die Seipin-vermittelte LT-Biogenese sowie indirekt die Aktivität von SERCA beeinflussen. Eine direkte Interaktion zwischen einem LT-Protein und SERCA ist allerdings auch denkbar, da PEX19 LT-Proteine, wie UBXD8, nicht direkt in die LT-Membran integriert, sondern zunächst eine Integration in die ER-Membran erfolgt [151]. Bei Fehlen von wildtypischem PEX19 fehllokalisiert UBXD8 in Mitochondrien und fehlt

damit nicht nur auf der LT-Membran, sondern auch auf der ER-Membran [151]. Da UBXD8 im ER in die Aktivierung des ERAD (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) involviert ist [94], könnte somit bereits das Fehlen von UBXD8 in der ER-Membran zu einer veränderten Aktivität von SERCA führen. In diesem Zusammenhang wäre es daher am sinnvollsten eine mögliche Interaktion zwischen SERCA und UBXD8 zu testen, denn UBXD8 wurde bereits als ein von PEX19-abhängig auf LT lokalisierendes Protein verifiziert [151].

Die SERCA-Aktivität wird zudem durch SOCE beeinflusst, der zum Einstrom von Ca^{2+} ins Zytosol führt, das im darauffolgenden Schritt von SERCA ins ER-Lumen transportiert werden kann [134]. Induziert wird SOCE vor allem durch STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*) [159]. Im Falle von STIM1 konnten in unbehandelten Zellen Erhöhungen der Abundanz von 8-28 % in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 beobachtet werden. Diese absolut betrachtet niedrigen Veränderungen der Abundanz waren zu erwarten, da bei einer reduzierten ER- Ca^{2+} -Konzentration eher eine erhöhte Oligomerisierungsrate der STIM1-Proteine [101], die in dieser Arbeit nicht untersucht worden ist, zu erwarten gewesen wäre. Zwar konnten nach Induktion der LT-Biogenese in der PEX19^{-/-}- sowie beiden Klonen der PEX19_{C296S}-Zelllinie um bis zu 66% erhöhte endogene Proteinlevel von STIM1 festgestellt werden, doch nach Oleat-Behandlung wies auch die WT-Zelllinie eine um 49% höhere Abundanz von STIM1 im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie auf. Folglich relativiert sich der vom wildtypischen PEX19-abhängige Effekt auf eine Erhöhung der Abundanz von STIM1 um 17%. Neben Proteinen, die in den Einstrom von Ca^{2+} in das ER involviert sind, können auch Proteine der Hauptefflux-Wege von Ca^{2+} aus dem ER, wie der Inositol-1,4,5-Trisphosphat(IP₃)-Rezeptor (IP3R) [115], eine veränderte ER- Ca^{2+} -Homöostase bewirken. Die Messungen der Proteinlevel des IP3R3 im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch, dass sich keine signifikanten Differenzen zwischen der WT-, der PEX19^{-/-}- und Kl.15 bzw. Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ohne und mit Oleat-Behandlung nachweisen ließen. Nachdem sich auf Proteinebene Unterschiede in der Abundanz von SERCA, aber nur geringe Unterschiede in der Abundanz von STIM1 und praktisch keine in der Abundanz von IP3R3 zwischen den untersuchten Zelllinien ergaben, war der nächste logische Schritt die Untersuchung des SOCE.

Trotz des Einsatzes von an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpern, digitaler Detektion und Software-gestützter Quantifizierung der Abundanz Ca^{2+} -kontrollierender Proteine ließen sich Standardabweichungen von bis zu 72% beim Vergleich von Replikaten untereinander feststellen. Diese hohen Standardabweichungen wurden jedoch nur bei Oleat-behandelten Zellen ermittelt. In Zellen ohne Oleat-Behandlung wurden durchschnittlich Standardabweichungen von 15-20% ermittelt. Der Grund der im

Durchschnitt deutlich höheren Standardabweichungen in Proben von Zellen nach Oleat-Behandlung ist allerdings eher biologischer Varianz als technischer Varianz zuzuschreiben. So führt die Oleat-Behandlung zur Synthese von Triacylglycerolen und damit zur gesteigerten LT-Biogenese [95], was eine deutliche Veränderung des Metabolismus einer Zelle bewirkt. Da bereits gezeigt wurde, dass die LT-Biogenese in HeLa-Zellen von der Zelldichte abhängig ist [65], erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten großen Standardabweichungen der Zellen nach Oleat-Behandlung durch Unterschiede in ihrem Metabolismus verursacht worden sein könnten. Denn die Zelldichte war trotz Aussäen der Zellen in definierten Zellzahlen nicht immer gleich dicht einzustellen, sondern zeigte im Durchschnitt Differenzen von etwa 10-15% zwischen den zu untersuchenden Zelllinien.

5.4. Eine veränderte Ca^{2+} -Clearance als Folge des veränderten LT-Metabolismus in Zellen ohne wildtypisches PEX19

Nachdem sich in der PEX19^{-/-}- und Kl.15 bzw. Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie auf verminderte ER- Ca^{2+} -Konzentrationen rückschließen ließ, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob der SOCE in den Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 ebenfalls verändert ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein verminderter SOCE zu einer Akkumulation von LT führt [113]. Zur Messung des SOCE wurde Thapsigargin zu den Zellen gegeben, welches zu einer Depletion des ER- Ca^{2+} und infolgedessen zu einer Aktivierung des SOCE führt [158]. Die Messungen des SOCE wurden sowohl in Ca^{2+} -enthaltender Ringer-Lösung als auch in nominal Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung und späterer Zugabe von Ca^{2+} durchgeführt. Hierbei zeichnete sich unter beiden Messbedingungen ein stärkerer Abfall der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol nach Induktion des SOCE über die Zeit in der WT-Zelllinie im Vergleich zur PEX19^{-/-}- und Kl. 15 bzw. Kl. 19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ab. Dieser Effekt wurde unter Induktion der LT-Biogenese deutlich verstärkt. Die Analyse der Maxima der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Ca^{2+} ist insbesondere zwischen der WT- und der PEX19^{-/-}-Zelllinie nicht abschließend zu beurteilen, da hier große Schwankungen zwischen den gemittelten Messergebnissen der einzelnen Messtage zwischen der WT- und PEX19^{-/-}-Zelllinie zu verzeichnen waren (siehe Anhang 6.1.). Die beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie zeigten unter Oleat-Behandlung kontroverse Ergebnisse, die sich im Kl.15 in einem höheren zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Ca^{2+} -Zugabe und im Kl.19 in einer niedrigeren zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur WT-Zelllinie nach Ca^{2+} -Zugabe widerspiegelten. Eine mögliche Erklärung für die besonders hohen Schwankungen unter diesen Messbedingungen stellt die pharmakologisch mittels Thapsigargin-Zugabe induzierte

Aktivierung des SOCE [158] und damit eine extrem unphysiologisch hohe Aktivität des SOCE dar.

Die unterschiedlichen Phänotypen der beiden Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie entsprechen nicht den Erwartungen. Etwaige Unterschiede in den Phänotypen resultieren möglicherweise aus dem unterschiedlichen Insertionsort des für PEX19_{C296S} codierenden Gens im Genom. Ein unterschiedlicher Insertionsort des für PEX19_{C296S} codierenden Gens ist anzunehmen, da bei der Generierung der Zelllinien keine ortsspezifische Insertionsmethode verwendet wurde. Daher könnte das für PEX19_{C296S} codierende Gen unter Beeinflussung unterschiedlicher DNA-Abschnitte bzw. Kopienzahlen eine unterschiedliche Transkriptionsstärke zeigen [45]. Die Unterschiede in den Expressionsleveln der farnesylierungsdefizienten PEX19-Variante in den beiden Klonen sind zu vernachlässigen (AG Schrul, unveröffentlicht). Allerdings könnte die Insertion auch zur Unterbrechung unterschiedlich endogen codierter Gene geführt haben [15], was nicht absehbare Effekte auf die Ca²⁺-Homöostase hat.

Zur genaueren Analyse einer möglicherweise veränderten Ca²⁺-*Clearance* nach Induktion des SOCE wurden in Oleat-behandelten Zellen kinetische Messungen des Abfalls der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Unterbrechung des SOCE durch Entzug des extrazellulären Ca²⁺ vorgenommen. Hierbei zeigten Zellen ohne wildtypisches PEX19 eine verlangsamte Abfallrate des zytosolischen Ca²⁺ im Vergleich zur WT-Zelllinie. Gleichzeitig ließ sich in den Experimenten zur Untersuchung des SOCE reproduzierbar eine höhere zytosolische Ca²⁺-Konzentration über die Zeit nach Induktion des SOCE in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 beobachten, welche nach Induktion der LT-Biogenese deutlich stärker ausgeprägt war. Dies lässt auf eine verminderte Ca²⁺-*Clearance* in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 schließen. Auffällig war auch die zweistufige Kinetik des Abfalls der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Hinzufügen von Ca²⁺ in allen Zelllinien. Diese könnte durch die unterschiedlich hohe Affinität der in die Ca²⁺-*Clearance* involvierten Transporter bzw. Pumpen erklärbar sein. So ist der anfangs steilere Abfall der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration vermutlich auf die zusätzlich nur bei hohen zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen aktiven Transporter NCKX (Natrium-Ca²⁺-Kalium *exchanger*) und NCX (Natrium-Ca²⁺ *exchanger*) zurückzuführen [128]. Die im Verlauf der Kurve abflachende zytosolische Ca²⁺-Konzentration spiegelt höchstwahrscheinlich alleine die auch bei niedrigeren Ca²⁺-Konzentrationen aktive PMCA (*Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) wider [128]. Somit könnte die Abundanz oder Aktivität von PMCA in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 verändert sein. Unter basalen Bedingungen ohne Induktion der LT-Biogenese ließ sich eine um 23-38% reduzierte Abundanz der PMCA in der PEX19^{-/-}- und in

beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie feststellen. Diese Beobachtung könnte den Phänotyp der langsameren Abnahme der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 nach Induktion des SOCE erklären. Die großen Schwankungen der Abundanz von PMCA in den Oleat-behandelten Zellen lässt eine reduzierte Transportleistung aufgrund einer tendenziell verminderten Abundanz in der PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie lediglich vermuten. Daher wäre an dieser Stelle zunächst eine qPCR (Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) zur Ermittlung der Expressionslevel der PMCA sinnvoll.

Andererseits könnte aufgrund der ATP-Abhängigkeit der PMCA [193] auch eine möglicherweise verringerte ATP-Generierung in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 für eine verminderte Aktivität der PMCA in Frage kommen. Eine veränderte ATP-Generierung in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 erscheint aus mehreren Gründen wahrscheinlich. So konnte in der PEX19^{-/-}- und in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ein verzögerter Abbau der LT beobachtet werden (AG Schrul, unveröffentlicht), was wiederum die Verfügbarkeit von Fettsäuren für die β -Oxidation in den Mitochondrien einschränken könnte [124]. Eine ebenfalls für den Austausch von Fettsäuren zwischen LT und Mitochondrien wichtiges Protein stellt Perilipin 5 dar [18,177]. Unveröffentlichte Daten weisen darauf hin, dass die korrekte Lokalisierung von Perilipin 5 auf LT auch PEX19-abhängig ist und entsprechend weniger Perilipin 5 auf LT in den PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinien vorliegt (AG Schrul, unveröffentlicht). Perilipin 5 ist dabei zum einen für den physischen Kontakt von LT mit Mitochondrien verantwortlich, wobei hier die C-terminale Region als essentiell für die Bindung an Mitochondrien identifiziert werden konnte [177]. Auf der anderen Seite erfüllt Perilipin 5 kontroverse Funktionen, so steigert Perilipin 5 unter basalen Konditionen die Bildung von LT während gleichzeitig die Hydrolyse von Triacylglycerolen gehemmt wird. Andererseits führt Perilipin 5 bei Induktion des Proteinkinase A-vermittelten Signalweges zu einer gesteigerten Lipolyse mit Freisetzung von Fettsäuren für die mitochondriale β -Oxidation [177]. Damit fehlt Zellen ohne wildtypisches PEX19 wahrscheinlich ein zentrales Protein für den Lipidmetabolismus auf der LT-Oberfläche. Eine daraus resultierende beeinträchtigte Lipolyse könnte folglich auch zu einer reduzierten Verfügbarkeit von Fettsäuren und damit einhergehend zu einer geringeren ATP-Generierung führen. In Zusammenhang mit Perilipin 5 sei angemerkt, dass es zumindest in Zellen des braunen Fettgewebes unterschiedliche Subpopulationen von Mitochondrien gibt [18], welche unterschiedlich stark von einem veränderten LT-Proteom beeinflusst werden könnten. Diesbezüglich konnten in Adipozyten des braunen Fettgewebes jüngst Unterschiede bei der Charakterisierung von LT-assoziierten Mitochondrien im Vergleich zu zytosolischen

Mitochondrien identifiziert werden, so führten LT-assoziierte Mitochondrien insbesondere zur Expansion von LT [18]. Die Assoziation von Mitochondrien mit LT wird dabei insbesondere durch Perilipin 5 vermittelt [18]. Folglich könnte auch in HeLa-Zellen, die ein verändertes LT-Proteom aufweisen, die LT-Homöostase gestört sein, da eine verminderte Anzahl LT-assoziiierter Mitochondrien vorliegen könnte.

Daneben können Mitochondrien Kontakte zu Ca^{2+} -Efflux Kanälen des ER ausbilden und so ein Ca^{2+} -Austausch stattfinden [9]. Dieser Prozess scheint auch für die Modulierung der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER wichtig zu sein [40]. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte in den Citratzyklus und damit in die ATP-Generierung involvierte mitochondriale Enzyme durch Ca^{2+} in ihrer Aktivität erhöht werden [9,40]. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte verminderte ER- Ca^{2+} -Konzentration in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 könnte somit Einfluss auf die mitochondriale Ca^{2+} -Konzentration und damit auf die ATP-Generierung in Mitochondrien haben. Im nächsten Schritt wurden daher zunächst die Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher untersucht.

5.5. Die Rolle von Peroxisomen als Nicht-ER- Ca^{2+} -Speicher und im Energiestoffwechsel

In der PEX19^{-/-}-Zelllinie ließen sich sowohl ohne Induktion als auch nach Induktion der LT-Biogenese verminderte Nicht-ER- Ca^{2+} -Konzentrationen im Vergleich zur WT-Zelllinie messen. Insofern bestätigten die Ergebnisse der PEX19^{-/-}-Zelllinie, dass die vermindert gemessene gesamtzelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich zur WT-Zelllinie nicht nur an einer reduzierten ER- Ca^{2+} -Konzentration liegen kann. In den beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie waren allerdings kontroverse Veränderungen der Nicht-ER- Ca^{2+} -Konzentration messbar. Daher ließ der Phänotyp nicht klar zwischen einem peroxisomalen und einem LT-Proteom Phänotyp differenzieren. Nichtsdestotrotz spricht mehr für den Effekt eines peroxisomalen Phänotyps, denn es konnte bereits gezeigt werden, dass die Ca^{2+} -Konzentration in Peroxisomen unter basalen Bedingungen bis zu 20x höher als im Zytosol ist und nach IP_3 -vermittelten Efflux von Ca^{2+} aus dem ER Ca^{2+} -Konzentrationen in Peroxisomen von bis zu 100 μM gemessen werden konnten [92]. Infolgedessen könnte es sein, dass die gemessene Reduktion des Nicht-ER- Ca^{2+} durch das komplette Fehlen der Peroxisomen in der PEX19^{-/-}-Zelllinie verursacht wird. Die Datenlage zu der peroxisomalen Ca^{2+} -Konzentration ist allerdings nicht konsistent [48,92]. Daher kann die Reduktion des Nicht-ER- Ca^{2+} in der PEX19^{-/-}-Zelllinie auch durch andere Effekte bei fehlenden Peroxisomen induziert worden sein.

So führt ein komplettes Fehlen der Peroxisomen, klinisch als Zellweger-Syndrom beschrieben, zu einer Akkumulation von langkettigen Fettsäuren sowie einer verminderten Synthese von Etherlipiden und Gallensäuren [97]. Außerdem lassen sich sowohl im Mausmodell für das Zellweger-Syndrom [16] als auch in Patienten mit Zellweger-Syndrom [146] strukturelle Unterschiede in Mitochondrien nachweisen. Es wird angenommen, dass die veränderten Mitochondrien auch zum klinischen Phänotyp von Zellweger-Patienten beitragen [146]. Dies lässt die Annahme zu, dass eine veränderte Morphologie der Mitochondrien auch mit einer veränderten mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase vergesellschaftet sein könnte. Eine Veränderung der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase könnte durch die fehlende Interorganellenkommunikation zwischen Peroxisomen und Mitochondrien erklärbar sein [154]. Auch wenn die Mechanismen der Kommunikation noch nicht ganz verstanden sind, sprechen die kooperativen Funktionen im Fettsäureabbau sowie dem Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies für ein koordiniertes Zusammenwirken von Peroxisomen und Mitochondrien [154]. In diesem Zusammenhang konnten nicht nur Kontaktstellen von Peroxisomen zu Mitochondrien, sondern auch zum ER nachgewiesen werden [154]. Die Kontaktstellen dienen dabei insbesondere dem Austausch von Lipiden und Ca^{2+} [68]. Folglich ließe sich annehmen, dass ein veränderter Austausch von Ca^{2+} zwischen ER und Mitochondrien durch Ausbleiben des ER-Peroxisomen Kontaktes eine veränderte mitochondriale Ca^{2+} -Homöostase bewirken könnte.

Einen wichtigen Signalweg in der Kontrolle des Energiemetabolismus stellt der PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*)-Signalweg dar [25]. Dabei kann angenommen werden, dass der PPAR-Signalweg in der PEX19^{-/-}-Zelllinie gestört ist, was im Folgenden näher erläutert werden soll. In Säugerzellen sind drei verschiedene Subtypen von PPAR bekannt, die als PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ bezeichnet werden [136]. Alle PPAR-Subtypen stellen nukleäre Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren dar, deren Zielgene vor allem den metabolischen Stoffwechsel wie die Adipogenese, Lipolyse sowie die Proliferation von Peroxisomen betreffen [25,43]. Ein im Rahmen der Proliferation von Peroxisomen durch PPAR-aktiviertes Zielgen ist dabei unter anderem PEX19 [43]. PEX19 ist dabei essentiell für die Biogenese der Peroxisomen [112]. Eine Aktivierung der PPAR wird vor allem durch Fettsäuren und Eikosanoide induziert [25]. In der PEX19^{-/-}-Zelllinie ist aufgrund des Fehlens der Peroxisomen von einer Akkumulation langkettiger Fettsäuren auszugehen [97]. Diese langkettigen Fettsäuren konnten als potente Agonisten von PPAR α identifiziert werden [71]. Aufgrund des ausbleibenden negativen Feedbacks durch Depletion der Peroxisomen und einer damit einhergehenden Akkumulation von potentiell als Agonisten der PPAR wirkenden Fettsäuren erscheint eine Hochregulation des PPAR-Signalweges möglich. Eine Hochregulation des PPAR-Signalweges, genauer des PPAR γ 1-Signalweges, induziert die

Expression von Promethin/LDAF1 [189], einem LT-Protein [20]. LDAF1 kolokalisiert mit Seipin und ist in die LT-Biogenese involviert [38,41]. In Mäusen führte die Hochregulation des PPAR γ 1-Signalweges zu hepatischer Steatose [189], was eine verminderte Lipolyse nahe liegt. Somit könnte die beobachtete verminderte Lipolyse in der PEX19^{-/-}-Zelllinie auch durch Veränderungen im PPAR-Signalweg hervorgerufen werden.

Die Ursache für die unterschiedlichen Messergebnisse zwischen den beiden Klonen der PEX19^{-/-}-PEX19_{C296S}-Zelllinie lässt sich nur mutmaßen und ist möglicherweise auf die nicht ortsspezifische Insertion des für PEX19_{C296S} codierenden Gens ins Genom der beiden Klone der PEX19^{-/-}-PEX19_{C296S}-Zelllinie zurückzuführen (siehe Kapitel 5.4.). An dieser Stelle könnte eine höhere Stichprobenanzahl zu einem eindeutigeren Ergebnis bezüglich der Nicht-ER-Ca²⁺-Speicher in den beiden Klonen der PEX19^{-/-}-PEX19_{C296S}-Zelllinie führen. Ob der Grund für die verminderte Ca²⁺-Konzentration in Nicht-ER-Ca²⁺-Speichern in der PEX19^{-/-}-Zelllinie eventuell auch durch eine verminderte Ca²⁺-Konzentration in Mitochondrien bedingt sein könnte und ob sich Veränderungen in der mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase nachweisen lassen, sollte im letzten Teil dieser Arbeit untersucht werden.

5.6. Eine veränderte mitochondriale Ca²⁺-Homöostase in Abwesenheit von Peroxisomen?

Die Untersuchung der mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase sollte etwaige PEX19-abhängige Veränderungen in diesem mit LT interagierenden Organell aufdecken [110]. Einerseits sollten Erkenntnisse aus den Messungen der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentrationen mögliche Erklärungen für die reduzierte Nicht-ER-Ca²⁺-Konzentration in der PEX19^{-/-}-Zelllinie liefern und andererseits mögliche Veränderungen der mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase, welche potentiell Einfluss auf die ATP-Generierung in Mitochondrien haben [40,80], identifizieren. Da Mitochondrien und das ER direkte Ca²⁺-austauschende Mikrodomänen zueinander aufbauen können [44], ist es zudem vorstellbar, dass eine veränderte ER-Ca²⁺-Konzentration, welche in dieser Arbeit als reduzierte ER-Ca²⁺-Konzentration in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 beobachtet werden konnte, zu einer veränderten Expression von mitochondrialen Genen beiträgt [9,40].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration wiesen in unbehandelten Zellen der PEX19^{-/-}-Zelllinie im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie auf erhöhte mitochondriale Ca²⁺-Konzentrationen hin. Damit erscheint in unbehandelten Zellen ein peroxisomaler Phänotyp bei vollständigem Fehlen von

Peroxisomen in der PEX19^{-/-}-Zelllinie zu dominieren, der in einer erhöhten mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration resultiert. Eventuell kam es in der PEX19^{-/-}-Zelllinie zu einem verlängerten Efflux von Ca²⁺ aus dem ER, was eine Überladung der Mitochondrien mit Ca²⁺ zur Folge haben kann [40]. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass in allen Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 reduzierte ER-Ca²⁺-Konzentrationen festgestellt wurden und sich somit wahrscheinlich in all diesen Zelllinien eine erhöhte mitochondriale Ca²⁺-Konzentration abgezeichnet hätte, was nicht der Fall war. Eine weitere Ursache für eine veränderte mitochondriale Ca²⁺-Homöostase könnte durch die Fehllokalisierung von UBXD8 in der PEX19^{-/-}-Zelllinie begründet sein, bei der UBXD8 in Mitochondrien lokalisiert [151]. So stellen Wechselwirkungen zwischen mitochondrialen Ca²⁺-Transportern und UBXD8 potentiell eine Möglichkeit für den beobachteten Phänotyp einer erhöhten mitochondrialen Ca²⁺-Konzentration in der PEX19^{-/-}-Zelllinie dar.

Nach Induktion der LT-Biogenese konnten mit dem D3cpv-Sensor in beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie erhöhte mitochondriale Ca²⁺-Konzentrationen im Vergleich zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie ausgemacht werden, während in der PEX19^{-/-}-Zelllinie keine signifikante Veränderung zur Oleat-behandelten WT-Zelllinie beobachtbar war. Dies widerspricht der zuvor in dieser Arbeit aufgestellten These einer veränderten mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase durch das in Mitochondrien fehllokalisierte UBXD8 [151]. Zugleich lässt sich dieser Phänotyp weder einem LT-Proteom Phänotyp noch einem peroxisomalen Phänotyp zuordnen. Möglicherweise führt unter LT-induzierenden Bedingungen ein verändertes LT-Proteom nur in Anwesenheit von Peroxisomen zu einer Veränderung der mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase. Bei funktionsfähigen Peroxisomen, aber LT mit verändertem LT-Proteom könnte sich so unter Induktion der LT-Biogenese ein unbalancierter Metabolismus ausbilden. Denn für die Oxidation von Fettsäuren zeichnen sich sowohl Peroxisomen [176] als auch Mitochondrien [191] verantwortlich. Damit unterscheidet sich die PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie hinsichtlich des Lipidmetabolismus maßgeblich von der PEX19^{-/-}-Zelllinie. Dies könnte erklären, warum eine veränderte mitochondriale Ca²⁺-Homöostase in der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ausschließlich unter LT-induzierenden Bedingungen beobachtbar war.

Um mögliche Erklärungen für die Veränderungen in der mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase zu finden, die mit veränderten Proteinleveln mitochondrialer Ca²⁺-Kanäle und Transporter einhergehen, wurden MCU (*Mitochondrial Ca²⁺ uniporter*) und VDAC (*Voltage dependent anion channel*) untersucht. Sowohl MCU als auch VDAC stellten sich in Zellen ohne wildtypisches PEX19 in ihrer Abundanz im Falle von MCU um etwa 33% und im Falle von VDAC um 32% vermindert im Vergleich zur unbehandelten WT-Zelllinie dar. Eine

Reduzierung dieser beiden für den Ca^{2+} -Einstrom in die mitochondriale Matrix verantwortlichen Kanäle [70] in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 würde jedoch eher zu einer reduzierten mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration führen. Reduzierte mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 wurden in den Experimenten dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt. Bei der Untersuchung der endogenen Proteinlevel der Atmungskettenkomplexe zeichneten sich sowohl ohne Induktion als auch nach der Induktion der LT-Biogenese verminderte endogene Proteinlevel der Atmungskettenkomplexe in allen Zelllinien ohne wildtypisches PEX19 ab. Die Reduktionen der Atmungskettenkomplexe fielen dabei jedoch unterschiedlich stark aus. Dass die Ergebnisse des Immunoblots gegen die Komplexe I, III und IV auf deutlich stärkere Reduktionen der Mitochondrienabundanz in Abwesenheit von PEX19 hinweisen als die Ergebnisse des Immunoblots gegen die Komplexe II und V, kann an der unterschiedlichen Komplexbildung liegen. So formt Komplex III mit Komplex I und IV Superkomplexe, wohingegen Komplex II in der Regel nicht in einem Superkomplex vorliegt. Auch Komplex V ist unabhängig von einem Superkomplex und bildet stattdessen Dimere aus [170]. Dies könnte die beobachteten Diskrepanzen zwischen den Reduktionen der Abundanz der Atmungskettenkomplexe erklären.

Die reduzierte Abundanz mitochondrialer Atmungskettenkomplexe könnte einen ersten Hinweis auf eine verminderte Mitochondrienabundanz in Zellen ohne wildtypisches PEX19 liefern, die möglicherweise auch für die verminderte Abundanz von MCU und VDAC verantwortlich ist. Eine andere Möglichkeit, die sich nicht ausschließen lässt, stellt jedoch auch die isolierte Verminderung der Abundanz der Atmungskettenkomplexe I, III und IV ohne Reduktion der Anzahl der Mitochondrien pro Zelle dar. Inwiefern ein verändertes LT-Proteom zu einer möglichen erniedrigten Mitochondrienabundanz bzw. einer verminderten mitochondrialen Respiration führen kann, bleibt unklar. Eines der LT-Proteine, bei denen die Daten auf eine PEX19-abhängige Zielsteuerung auf LT hinweisen, stellt Perilipin 5 dar (AG Schrul, unveröffentlicht). Perilipin 5 kann jedoch für den beobachteten Phänotyp einer veränderten Abundanz mitochondrialer Atmungskettenkomplexe mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, da ein isolierter *knockout* von Perilipin 5 nicht zu einer Veränderung der Mitochondrienabundanz bzw. der mitochondrialen Funktion führte [109]. Damit rücken andere PEX19-abhängige Proteine, wie das bereits als PEX19-abhängig verifizierte UBXD8 in den Fokus [151]. Bisher ist allerdings kein Einfluss auf die Abundanz von Mitochondrien beschrieben worden. Abschließend kommt so für eine mögliche Veränderung des ATP-Levels einerseits eine Dysfunktion des LT-Mitochondrien-Kontaktes, verursacht durch ein verändertes LT-Proteom, in Betracht. Andererseits scheint auch eine verminderte Mitochondrienabundanz oder eine verminderte mitochondriale Respiration für eine mögliche

Veränderung des ATP-Levels in Zellen ohne wildtypisches PEX19 in Frage zu kommen. Eine verminderte Mitochondrienabundanz bzw. eine verminderte mitochondriale Respiration stellt einen starken Anhaltspunkt für einen Mangel an ATP und eine damit verbundene vermutlich reduzierte Aktivität von SERCA und PMCA dar. Eine reduzierte Aktivität von SERCA würde hier den beobachteten Phänotyp der reduzierten ER- Ca^{2+} -Konzentration in Zellen ohne wildtypisches PEX19 erklären, während eine reduzierte Aktivität von PMCA in diesen Zellen den Phänotyp der verlangsamten Ca^{2+} -Clearance erklären würde.

Ein verlangsamter Abbau der LT in der PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zur WT-Zelllinie, wie er in mikroskopischen Untersuchungen mit einem Neutrallipidfarbstoff beobachtet werden konnte (AG Schrul, unveröffentlicht), könnte damit zum einen durch die Möglichkeit einer niedrigeren Abundanz von Mitochondrien bzw. einer verminderten mitochondriale Respiration und zum anderen auch durch das veränderte LT-Proteom erklärbar sein. So ist PLIN5 für die Freisetzung von Fettsäuren aus LT zur mitochondrialen Fettsäureoxidation wichtig [177] und ein Fehlen von UBXD8 auf LT führt zumindest in Hepatozyten eher zu einer Akkumulation von LT [163]. Inwieweit die beobachtete veränderte Ca^{2+} -Homöostase in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 dabei Ursache oder Folge der eingeschränkten Lipolyse ist, lässt sich nicht abschließend klären. Zwar ist die unter anderem durch SOCE regulierte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration ein direkter Regulator der Lipolyse [113], doch bei der in dieser Arbeit vermuteten verminderten Ca^{2+} -Clearance in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 wäre mit erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Leveln und infolgedessen mit einer erhöhten Lipolyse zu rechnen [21]. Dass in dieser Arbeit keine höheren basalen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 ermittelt wurden, korreliert besser mit dem Phänotyp einer verlangsamten Lipolyse. Vielmehr verdichten die Ergebnisse dieser Arbeit die Hinweise auf eine veränderte ATP-Homöostase und damit auf einen veränderten Energiehaushalt der Zellen ohne wildtypisches PEX19, der ursächlich für die gestörte Ca^{2+} -Homöostase und die daraus möglicherweise resultierende eingeschränkte Lipolyse sein könnte.

5.7. Offene Fragen und Ausblick

Zur Verifizierung der indirekt durch Fura-2-AM ermittelten Reduktion der ER- Ca^{2+} -Konzentration in der PEX19^{-/-}- und der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie böte sich eine direkte Messung der ER- Ca^{2+} -Konzentration mit Organell-spezifischen ER- Ca^{2+} -Sensoren auf Basis von Aequorin oder GFP an [147]. Weiterhin bleibt die Frage offen, warum die beobachteten Verminderungen der Ca^{2+} -Clearance in der PEX19^{-/-}- und der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nach Induktion der LT-Biogenese verstärkt wurden. Zunächst wäre es im Rahmen dieser Fragestellung jedoch wichtig die beobachtete Verminderung der Ca^{2+} -Clearance auf molekularer Ebene zu identifizieren. Hierzu wäre der Einsatz eines PMCA-Inhibitors, wie zum Beispiel Carboxyeosin [58], oder des spezifischeren Caloxin [128] möglich. Kommt es unter Zugabe eines PMCA-Inhibitors zu einer Angleichung des Verlaufes der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der WT-Zelllinie zu den Verläufen der PEX19^{-/-}- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie bei Messung der SOCE-Antwort, würde dies für PMCA als Ursache für den beobachteten Phänotyp in Abwesenheit von wildtypischem PEX19 sprechen.

Zur genaueren Determinierung der Abundanzlevel von MCU, VDAC und den untersuchten Atmungskettenkomplexen ließe sich eine Isolierung der Mitochondrien aus den Zellen durchführen, die auf einer manuellen Homogenisierung und differentieller Zentrifugation beruht [14]. Ein anschließender Immunoblot mit Normalisierung auf ein mitochondriales Haushaltsprotein, wie z.B. COX-IV [141], würde hier durch Ausgleich einer unterschiedlichen Zahl von Mitochondrien in den Lysaten eine genauere Bestimmung der Abundanzlevel bieten. Zusätzlich wäre eine mikroskopische Analyse, basierend auf der Anfärbung von Mitochondrien, Zytosol und Zellkernen mit fluoreszierenden Farbstoffen und anschließender Quantifizierung der Fluoreszenzsignale zur definitiven Bestimmung einer verminderten Mitochondrienabundanz sinnvoll [75]. Hierbei ließen sich auch zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Anfärbung der Mitochondrien einsetzen, um eine Differenzierung zwischen inaktiven und aktiven Mitochondrien zu ermöglichen [2]. Eine alternative Methode zur Untersuchung der Genexpression auf Ebene der mRNA stellt die qPCR dar [67]. Mithilfe der qPCR ließe sich überprüfen, inwieweit die im quantitativen Immunoblot ermittelten Unterschiede in der Proteinabundanz Ca^{2+} -kontrollierender Proteine mit den mRNA-Leveln dieser Ca^{2+} -kontrollierenden Proteine korrelieren.

Ob die beobachtete verlangsamte Lipolyse (AG Schrul, unveröffentlicht) und die in dieser Arbeit veränderte Ca^{2+} -Homöostase gegebenenfalls auch mit einem veränderten ATP-Level korrelieren, ließe sich durch Bestimmung der ATP-Generierung in Form der Respirationsrate

(OCR) mittels Oxygraphie bestimmen [47]. Eine direkte Messung der ATP-Generierung wäre mit dem Luciferase-Luciferin-System möglich, welches auf der von der ATP-abhängigen Luciferase katalysierten Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin beruht [105].

PEX19 ist nicht nur für die Lokalisierung von UBXD8, sondern auch für weitere auf LT lokalisierende Proteine essentiell, wie massenspektrometrische Daten vermuten lassen (AG Schrul, unveröffentlicht). Daher wäre es zur Eingrenzung PEX19-abhängiger Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase sinnvoll, einen UBXD8 *knockdown* oder *knockout* zu generieren. Mit diesem gilt es zu überprüfen, ob die gleichen Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase beobachtet werden können, wie in den Klonen der PEX19-farnesylierungsdefizienten Zelllinie, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. So ließe sich herausfinden, ob allein die fehlende Lokalisierung von UBXD8 auf LT durch ein farnesylierungsdefizientes PEX19 die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die Ca^{2+} -Homöostase hat oder ob andere, möglicherweise noch unentdeckte PEX19-Funktionen, dafür in Frage kommen.

6. Anhang

6.1. Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

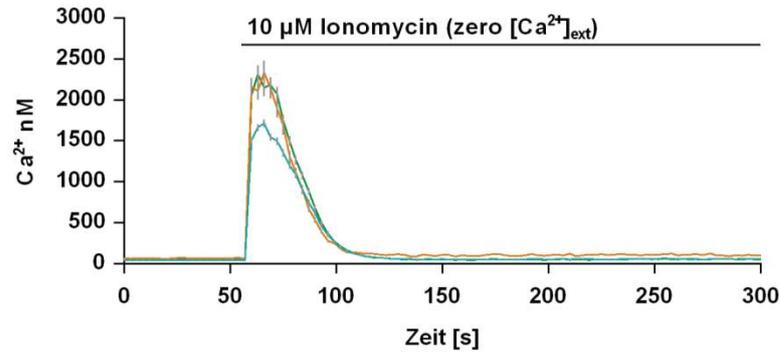
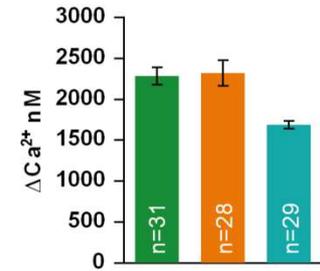
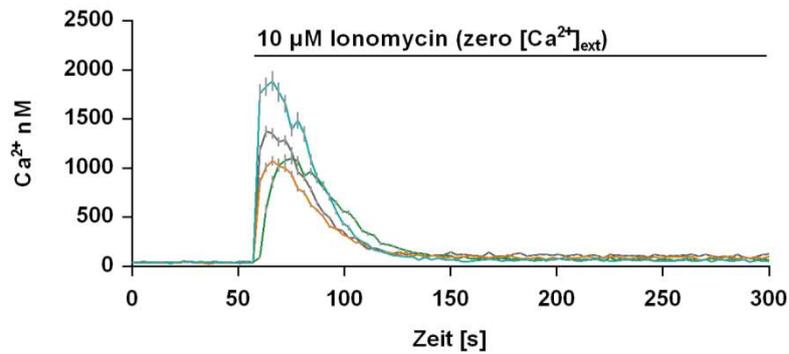
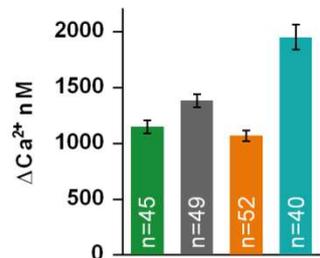
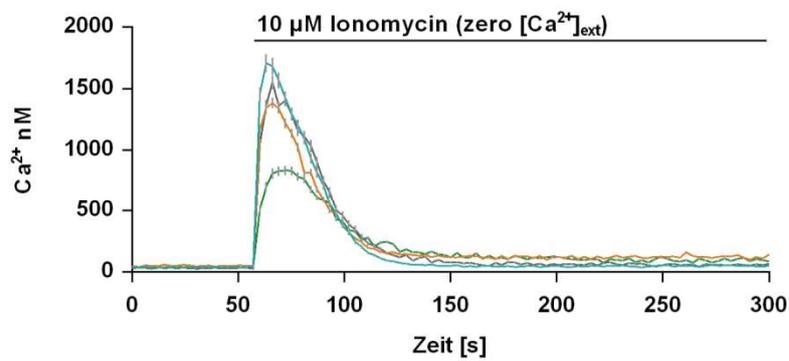
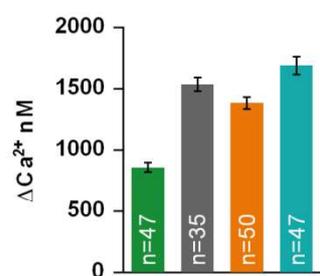
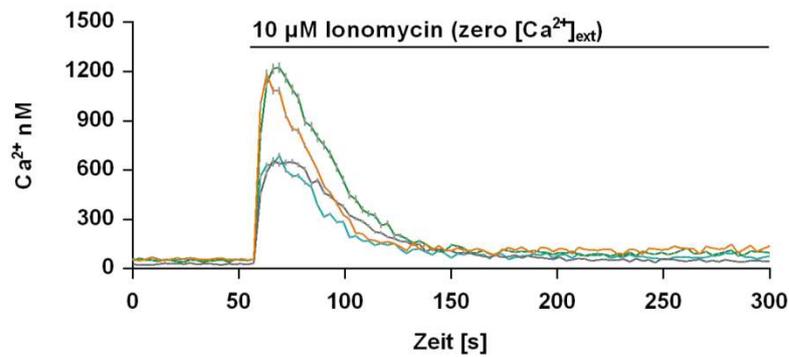
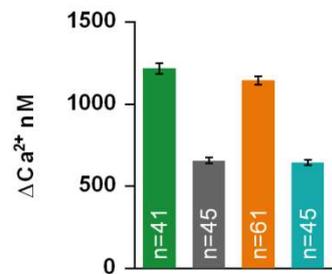
B**C****D****E****F****G****H****I**

Abbildung 25: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Ionomycin-Zugabe zur unbehandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}- Zelllinie. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Bestimmung erfolgte Fura-2-AM-basiert durch Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin [10 μM] in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung zu unbehandelten Zellen (B-I). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D+F+H). Die Ionomycin-Gabe erfolgte nach einer Messzeit von 1 Minute, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E+G+I). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

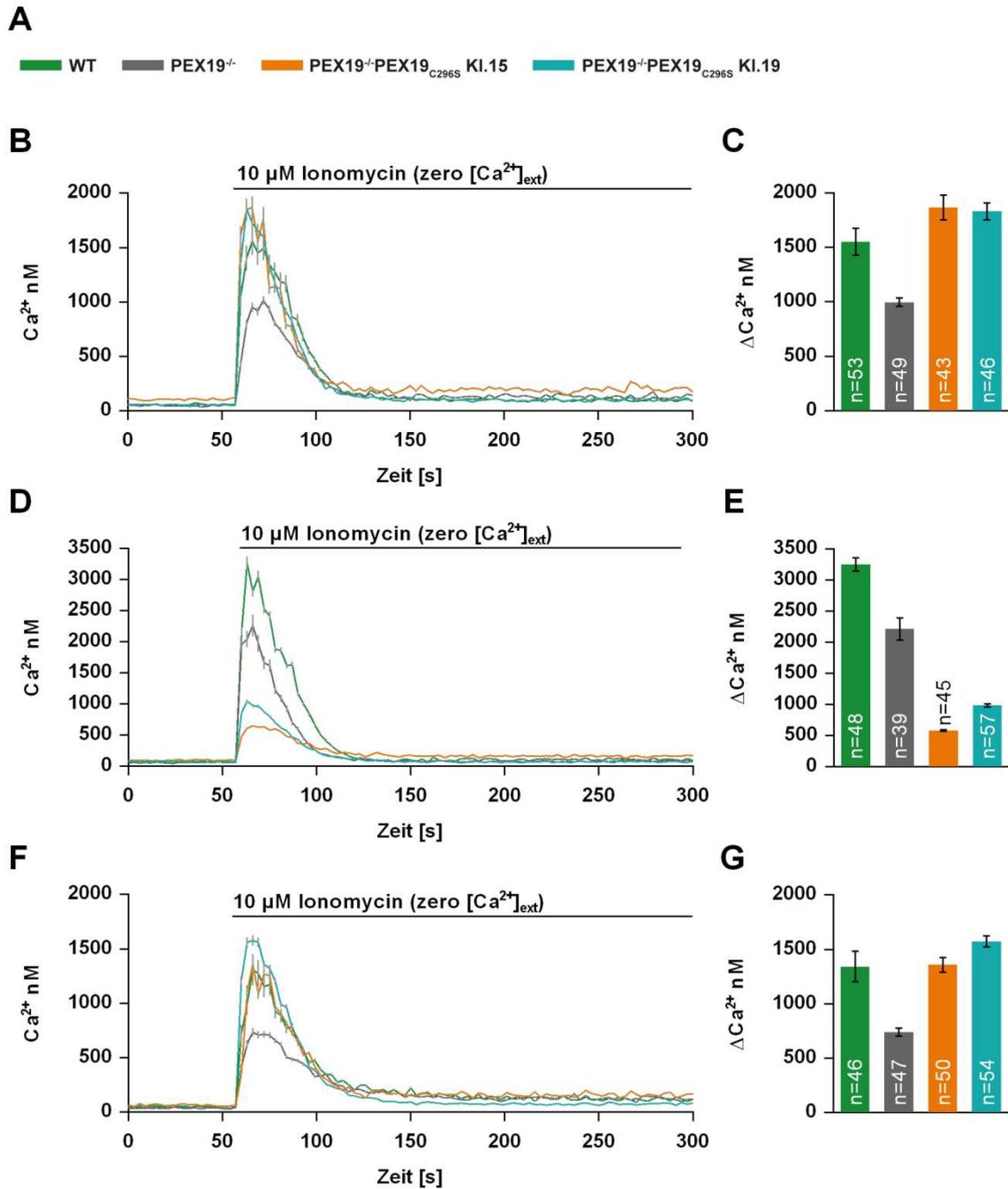


Abbildung 26: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Ionomycin-Zugabe zur Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 (A). Die gesamtzelluläre Ca^{2+} -Bestimmung erfolgte Fura-2-AM-basiert durch Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors Ionomycin [10 μM] in EGTA-enhaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung zu unbehandelten Zellen (B-F). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D+F). Die Ionomycin-Gabe erfolgte nach einer Messzeit von 1 Minute, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

█ WT
 █ PEX19^{-/-}
 █ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 █ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

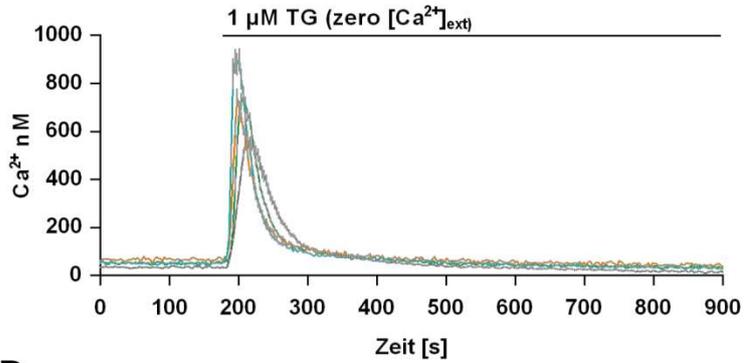
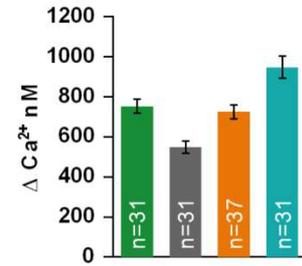
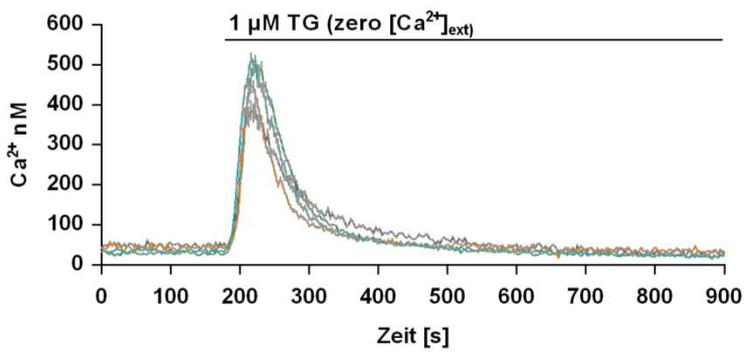
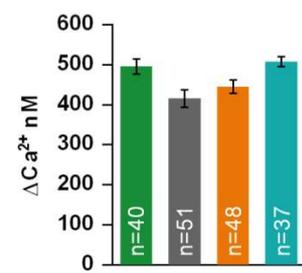
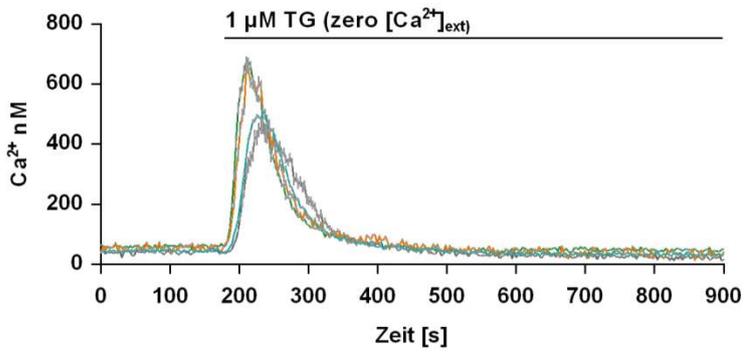
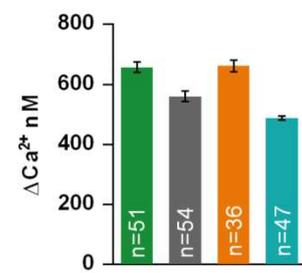
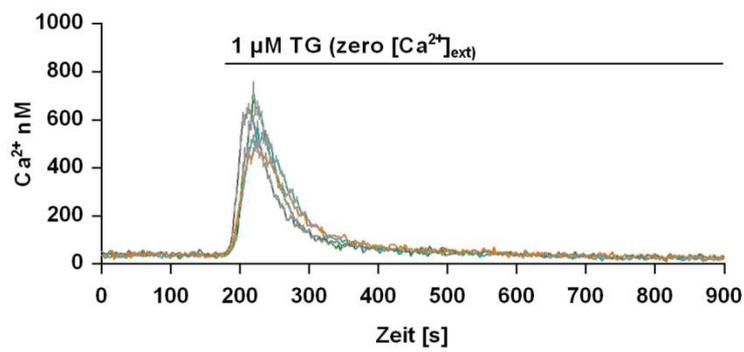
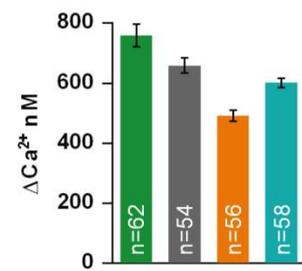
B**C****D****E****F****G****H****I**

Abbildung 27: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin zur unbehandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Die Quantifizierung des ER- Ca^{2+} -Lecks erfolgte Fura-2-AM-basiert durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung in unbehandelten Zellen (B-I). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D+F+H). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E+G+I). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

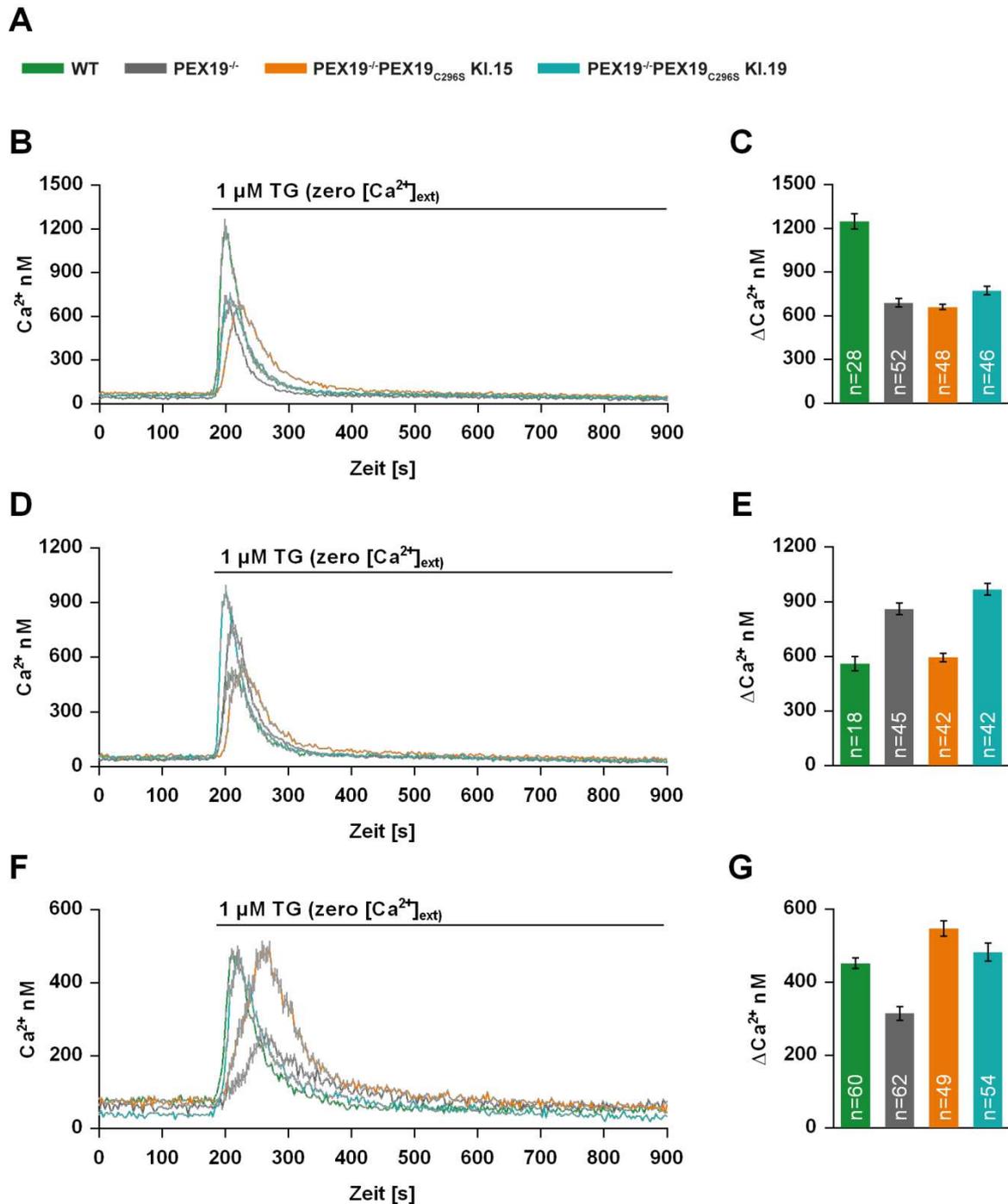


Abbildung 28: Fura-2-AM-basierte Ca²⁺-Messungen nach Zugabe von Thapsigargin zur Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 (A). Die Quantifizierung des ER-Ca²⁺-Lecks erfolgte Fura-2-AM-basiert durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] in EGTA-enthaltender (Ca²⁺-freier) Ringer-Lösung in unbehandelten Zellen (B-G). Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D+F). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

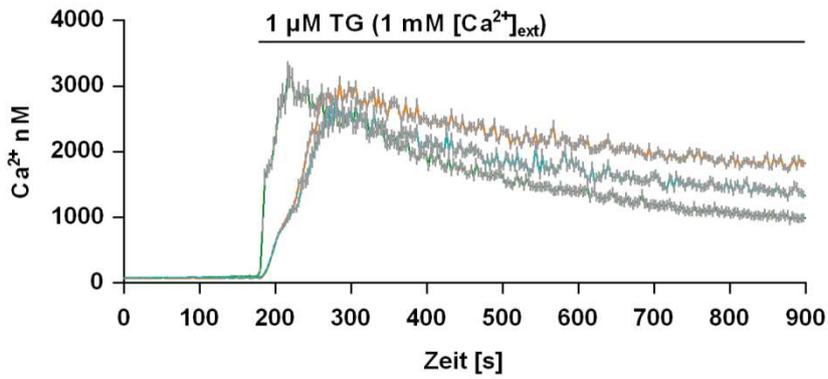
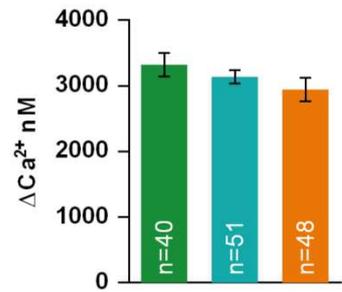
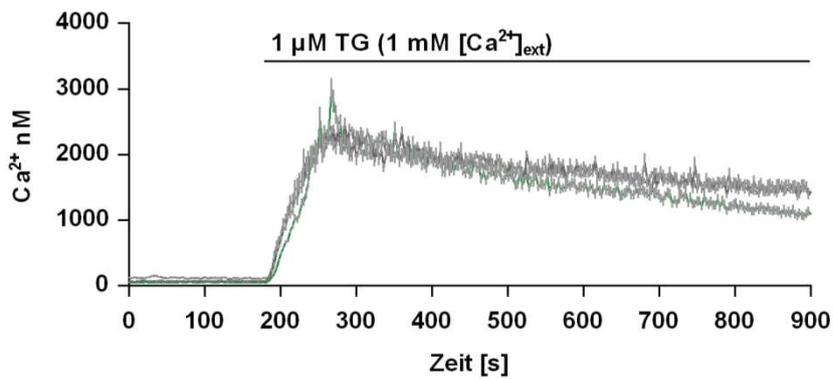
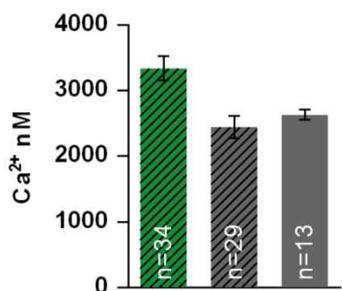
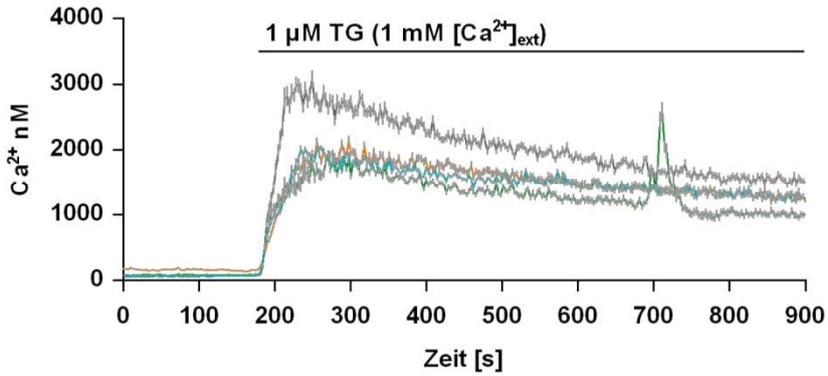
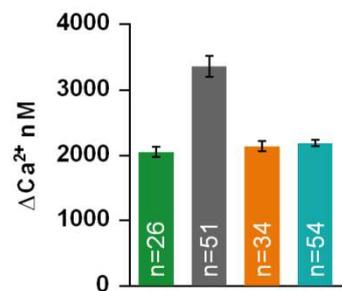
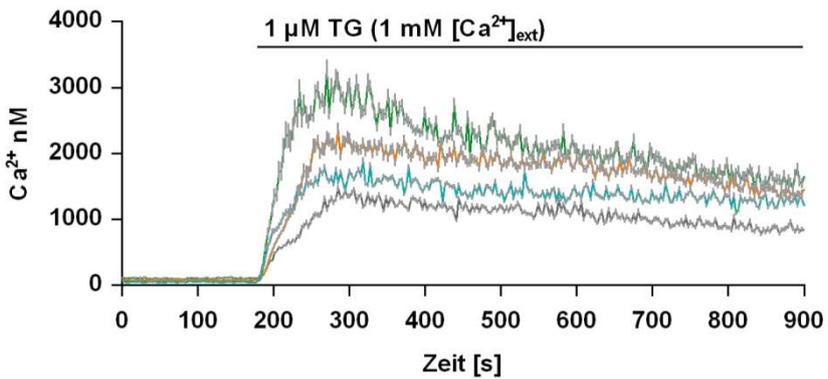
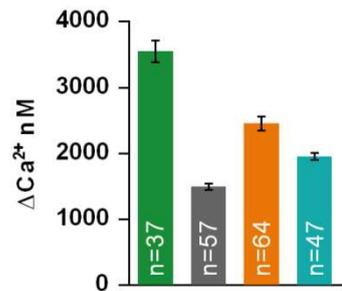
B**C****D****E****F****G****H****I**

Abbildung 29: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin zur unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, $\text{PEX19}^{-/-}$ sowie $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Durch Hinzugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] in 1 mM Ca^{2+} enthaltender Ringer-Lösung bei unbehandelten Zellen (B-I) wurde der SOCE aktiviert. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D+F+H). Die Zugabe des Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E+G+I). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie. In E markiert die Schraffur, dass Messlösungen von Tillman Pick verwendet wurden. Für die Deltaberechnung wurde in G die Bestimmung des Maximums für die WT-Zelllinie auf $t < 300$ s eingestellt, da ein technischer Fehler während Messung beobachtet wurde.

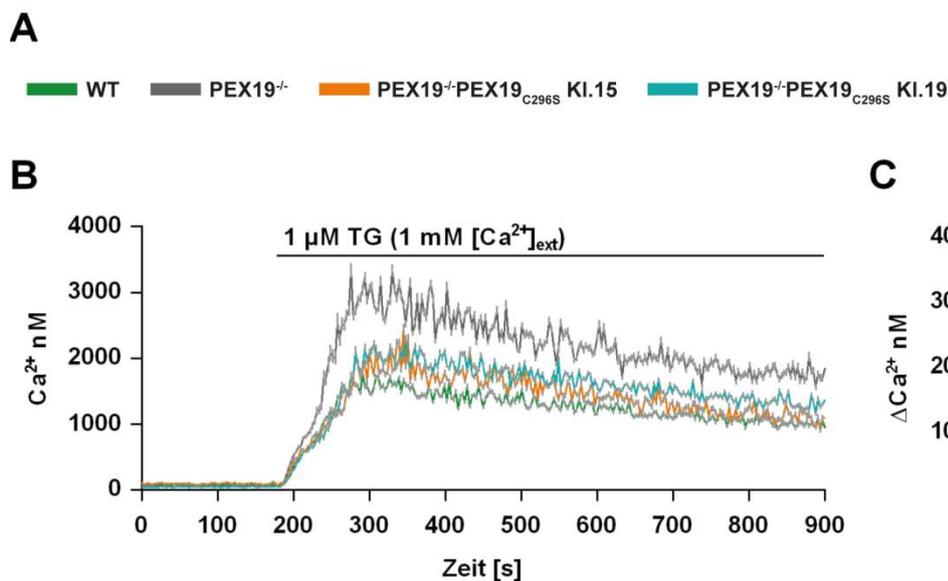


Abbildung 30: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca^{2+} -Messung nach Zugabe von Thapsigargin in unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinien. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, $\text{PEX19}^{-/-}$ sowie $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ Kl. 15 bzw. Kl. 19 (A). Durch Hinzugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] in 1 mM Ca^{2+} enthaltender Ringer-Lösung bei unbehandelten Zellen (B) wurde der SOCE aktiviert. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und im Balkendiagramm dargestellt (C). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

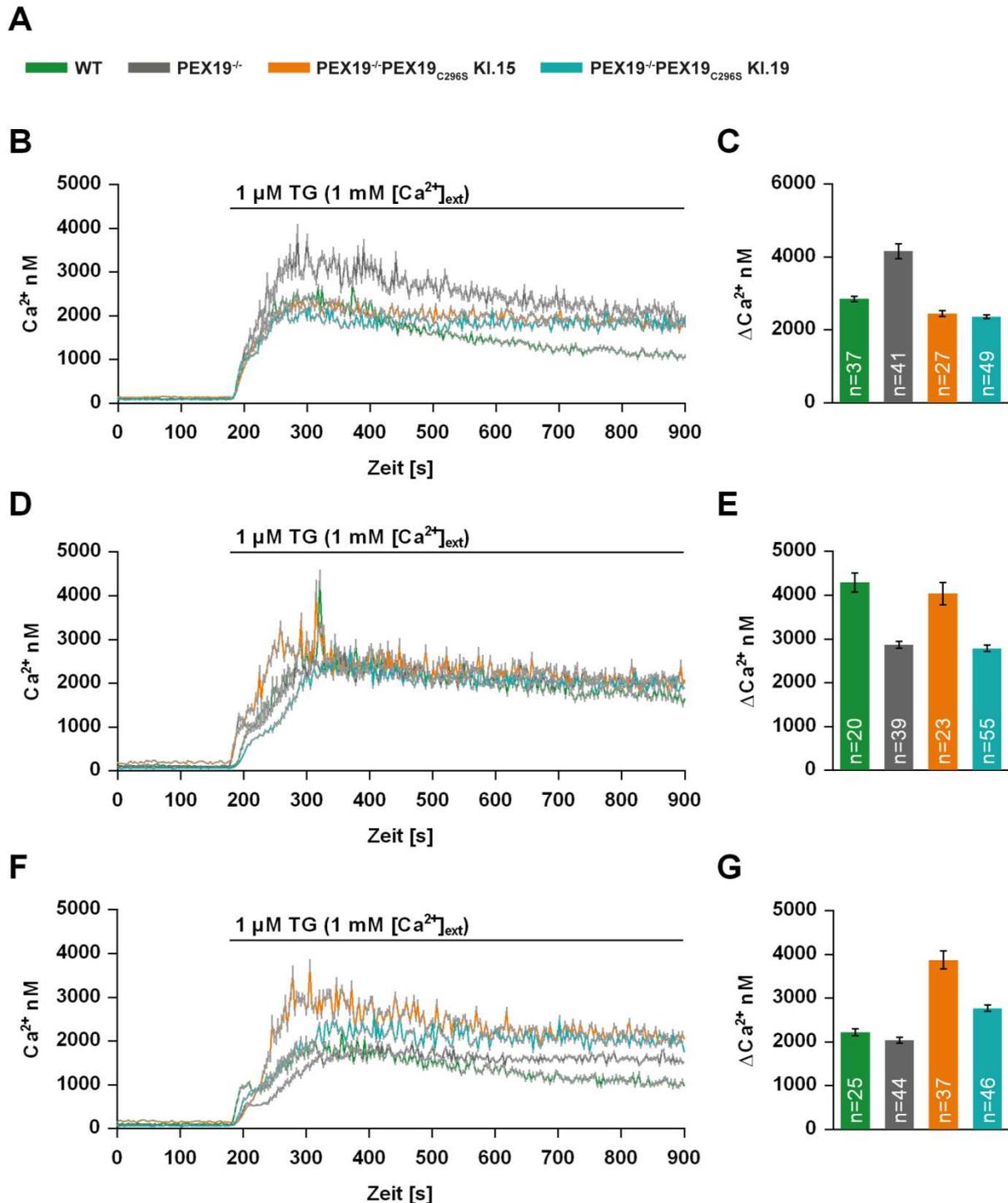


Abbildung 31: Untersuchung des SOCE mithilfe einer Fura-2-AM-basierten Ca²⁺-Messung nach Zugabe von Thapsigargin in Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinien. Jede Farbe markiert eine der Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 (A). Durch Hinzugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] in 1 mM Ca²⁺ enthaltender Ringer-Lösung bei unbehandelten Zellen (B-F) wurde der SOCE aktiviert. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration über einen Messzeitraum von 15 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+D+F). Die Zugabe des Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+E+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

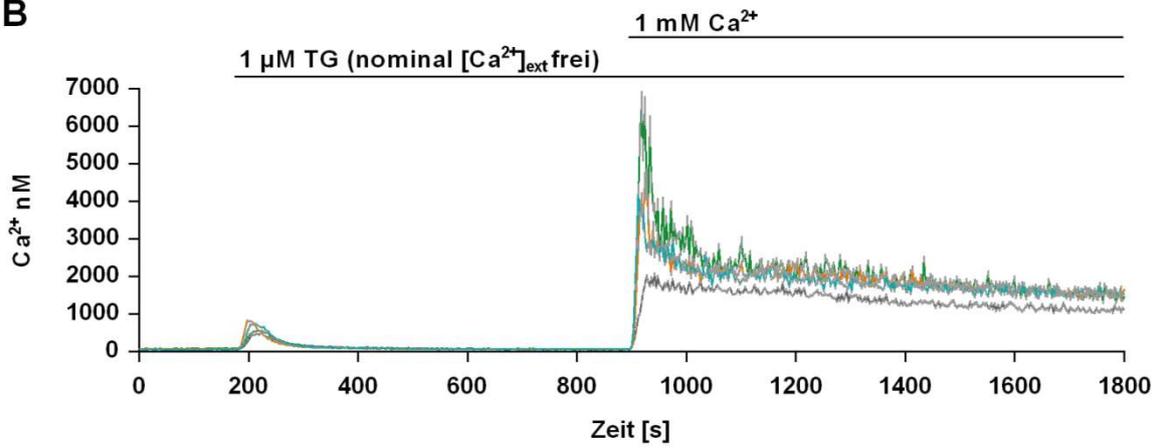
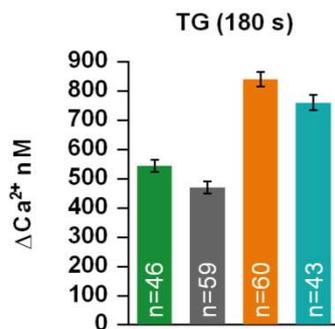
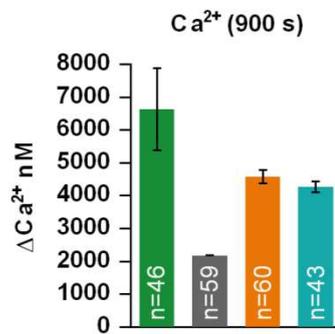
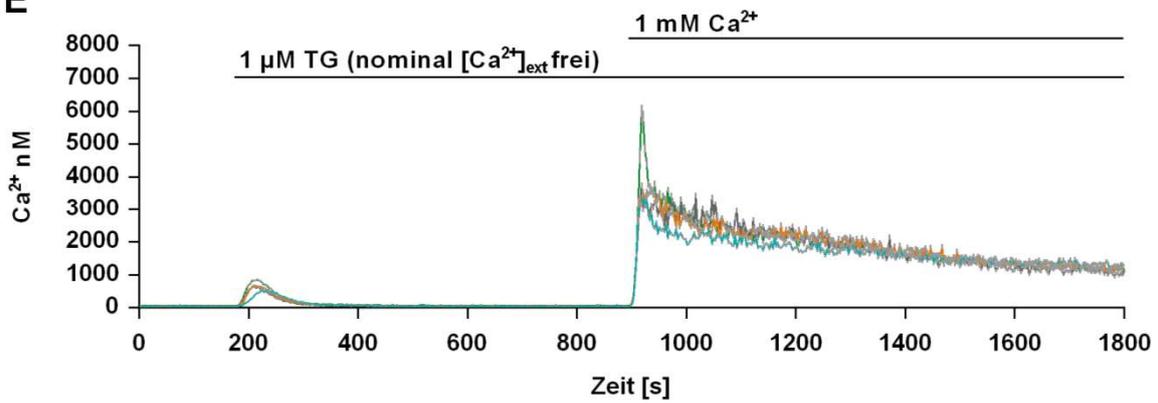
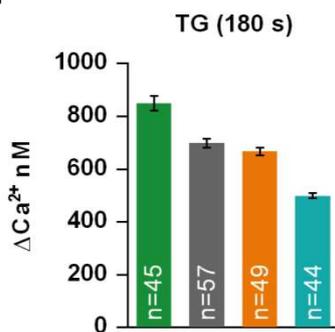
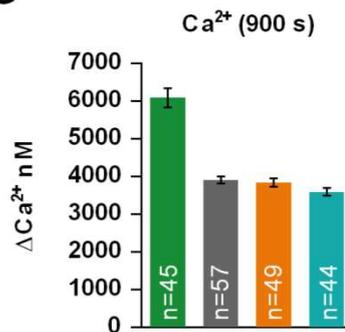
B**C****D****E****F****G**

Abbildung 32: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER. Nach Zugabe von Thapsigargin (TG) folgte die Hinzugabe von Ca^{2+} in der unbehandelten WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - und beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie. Die Zelllinien WT, $\text{PEX19}^{-/-}$ sowie $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin [$1 \mu\text{M}$] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die Messung erfolgte zunächst in nominal Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung, so dass erst durch sequentielle Zugabe von Ca^{2+} in die Messlösung nach 15 Minuten der SOCE aktiviert werden konnte. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ca^{2+} hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

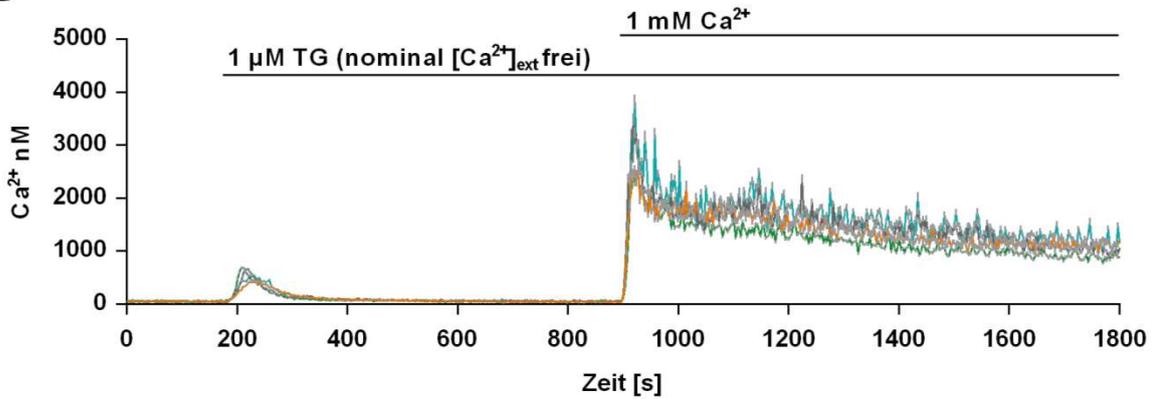
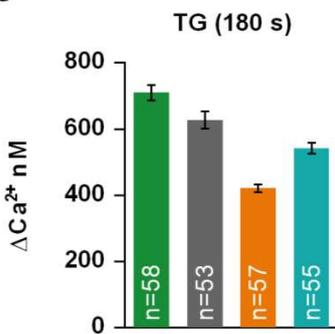
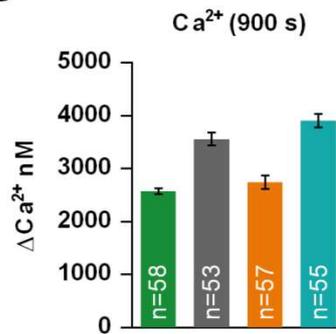
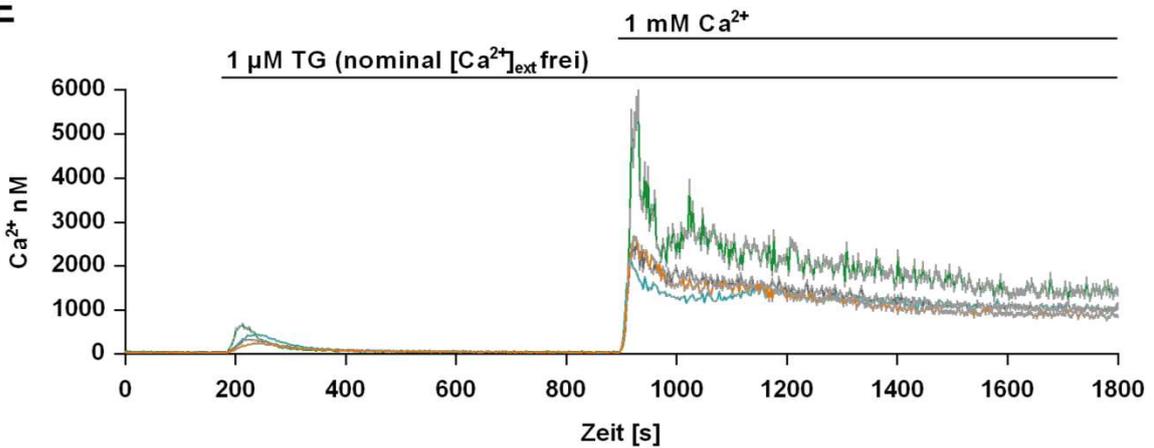
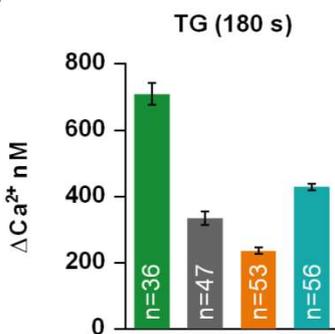
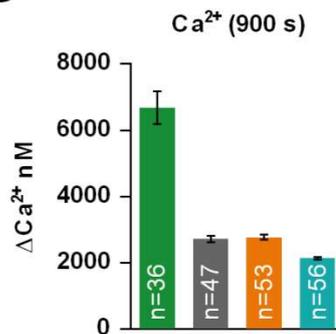
B**C****D****E****F****G**

Abbildung 33: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER. Nach Zugabe von Thapsigargin (TG) folgte die Hinzugabe von Ca^{2+} in der unbehandelten WT-, PEX19^{-/-}- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19^{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin [1 μM] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die Messung erfolgte zunächst in nominal Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung, so dass erst durch sequentielle Zugabe von Ca^{2+} in die Messlösung nach 15 Minuten der SOCE aktiviert werden konnte. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ca^{2+} hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

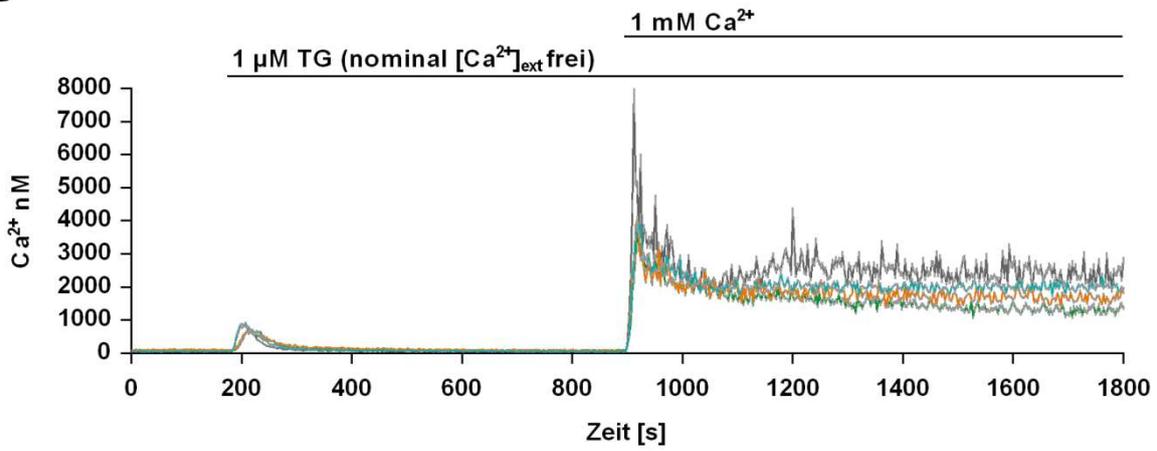
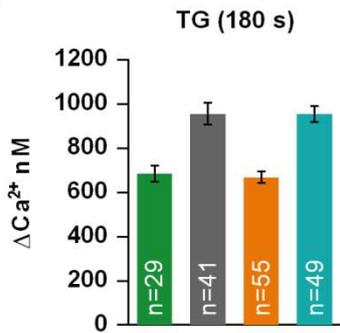
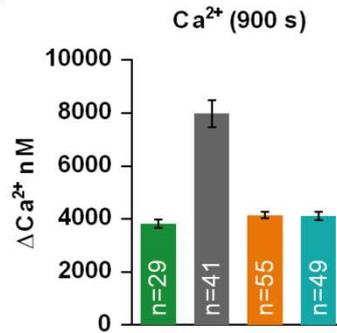
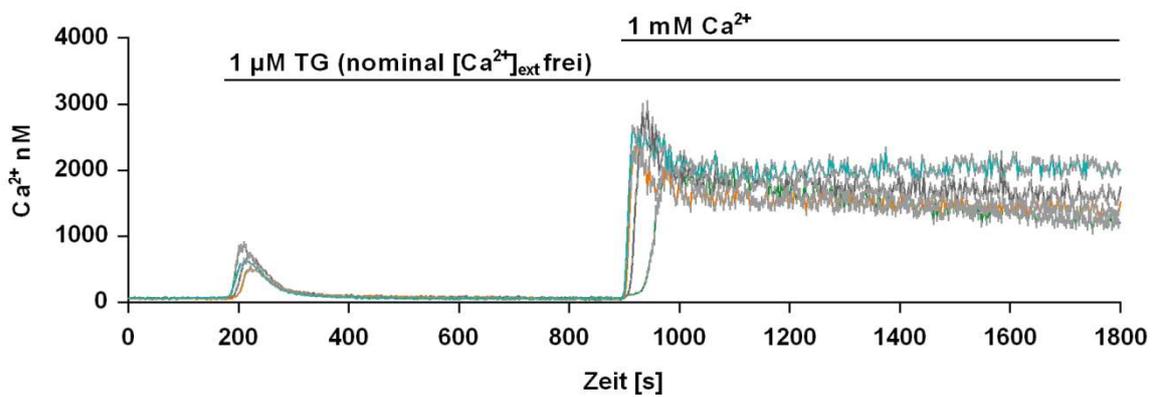
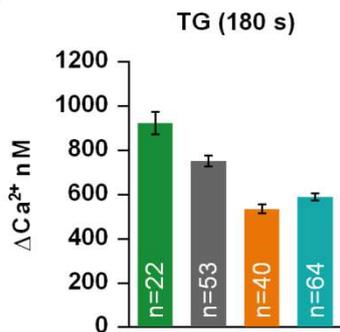
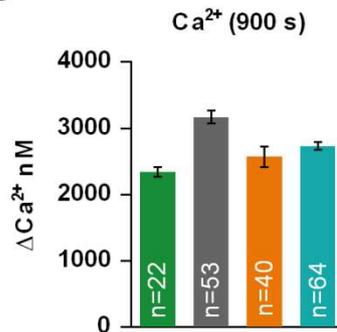
B**C****D****E****F****G**

Abbildung 34: Fura-2-AM basierte Ca^{2+} -Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca^{2+} aus dem ER. Nach Zugabe von Thapsigargin (TG) folgte die Hinzugabe von Ca^{2+} in der Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19^{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin [1 μM] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die Messung erfolgte zunächst in nominal Ca^{2+} -freier Ringer-Lösung, so dass erst durch sequentielle Zugabe von Ca^{2+} in die Messlösung nach 15 Minuten der SOCE aktiviert werden konnte. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ca^{2+} hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

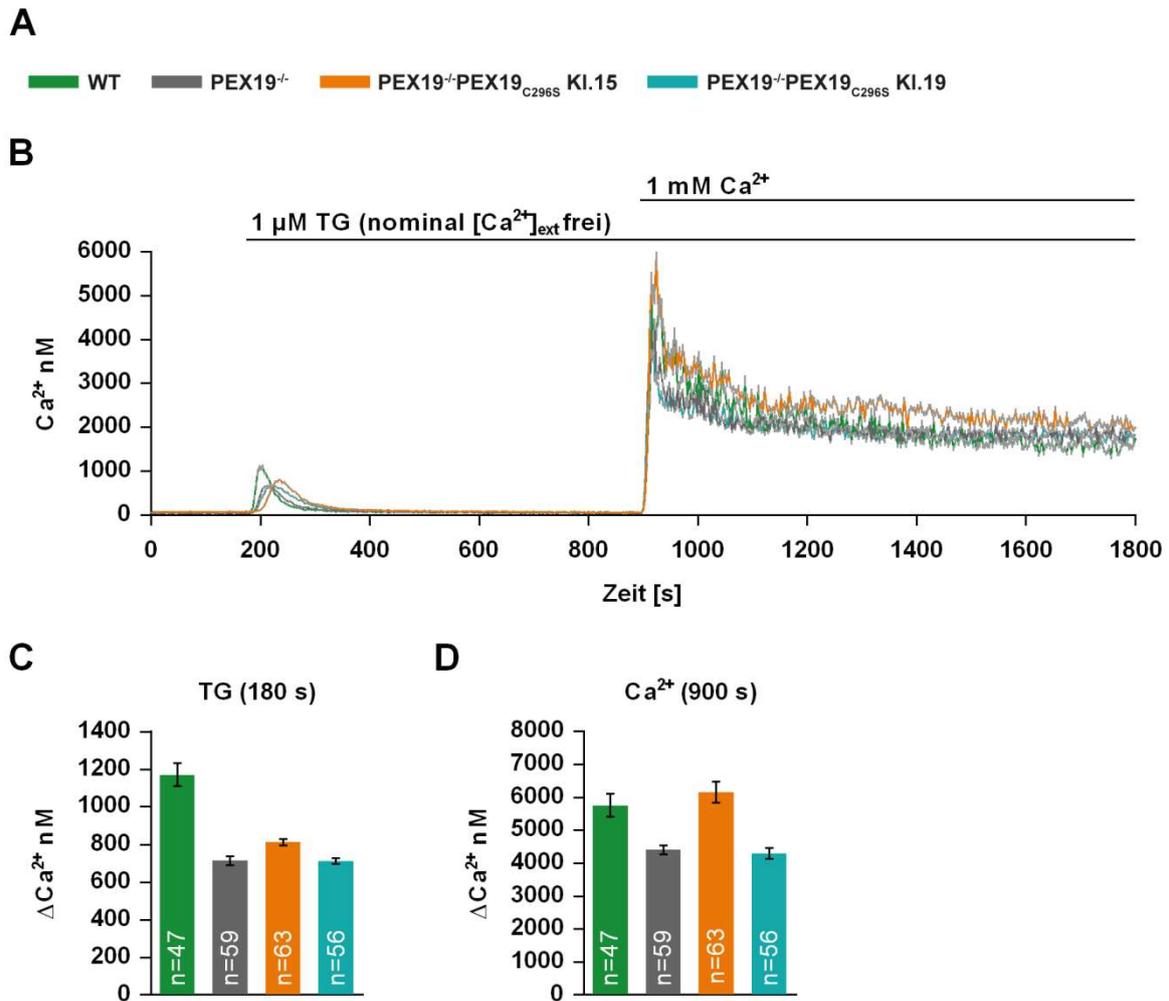


Abbildung 35: Fura-2-AM basierte Ca²⁺-Messungen zur Untersuchung des SOCE nach Depletion von Ca²⁺ aus dem ER. Nach Zugabe von Thapsigargin (TG) folgte die Hinzugabe von Ca²⁺ in der Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin [1 μM] wurde das ER-Ca²⁺ ins Zytosol depletiert. Die Messung erfolgte zunächst in nominal Ca²⁺-freier Ringer-Lösung, so dass erst durch sequentielle Zugabe von Ca²⁺ in die Messlösung nach 15 Minuten der SOCE aktiviert werden konnte. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration über einen Messzeitraum von 30 Minuten ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und im Balkendiagramm dargestellt (C). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ca²⁺ hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

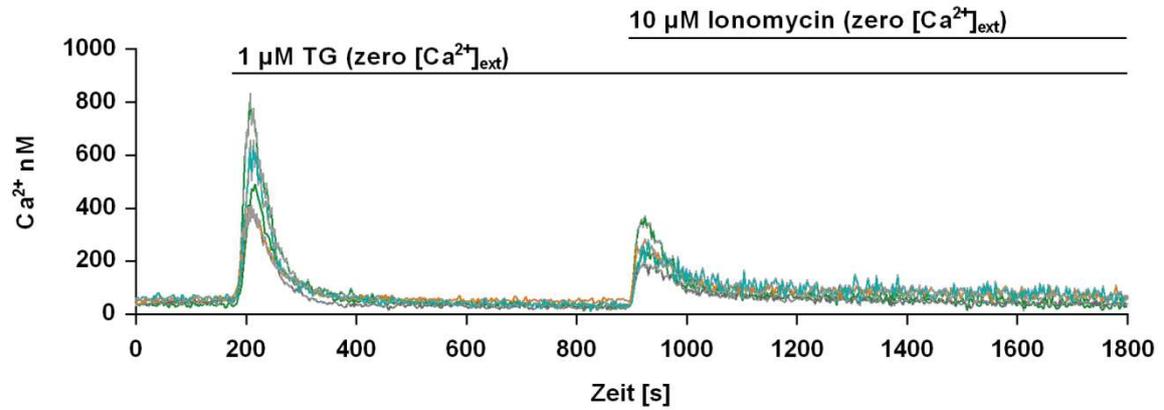
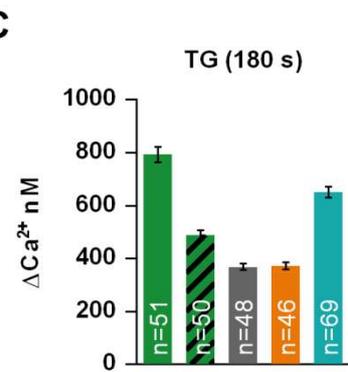
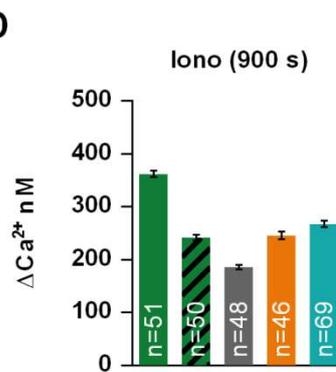
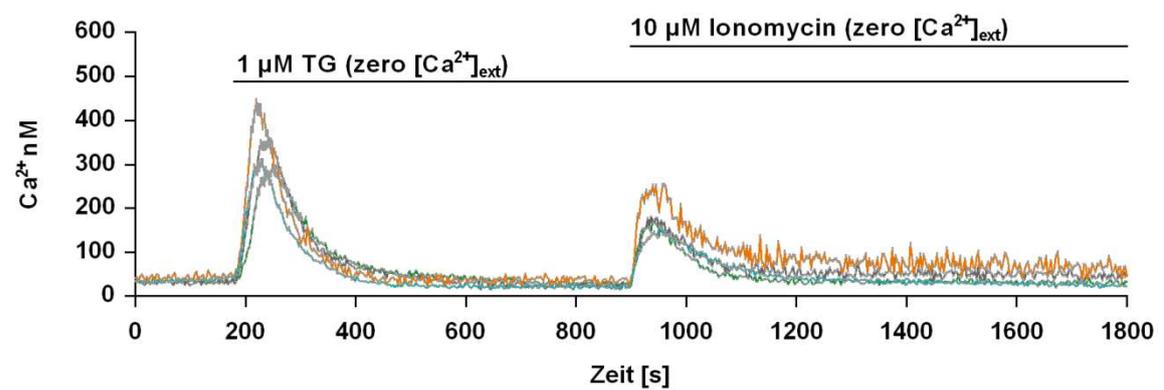
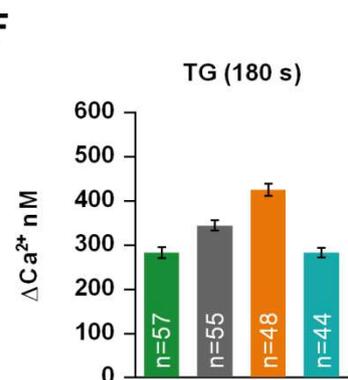
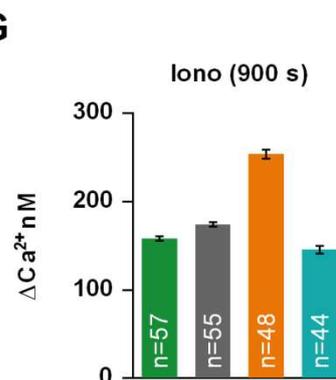
B**C****D****E****F****G**

Abbildung 36: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der unbehandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die anschließende Hinzugabe von Ionomycin (Iono) [10 μM] entleerte die ER-unabhängigen Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol. Die komplette Messung fand in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung (B-G) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 min ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ionomycin hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie. In C+D markiert die Schraffur eine wiederholte Messung der WT-Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

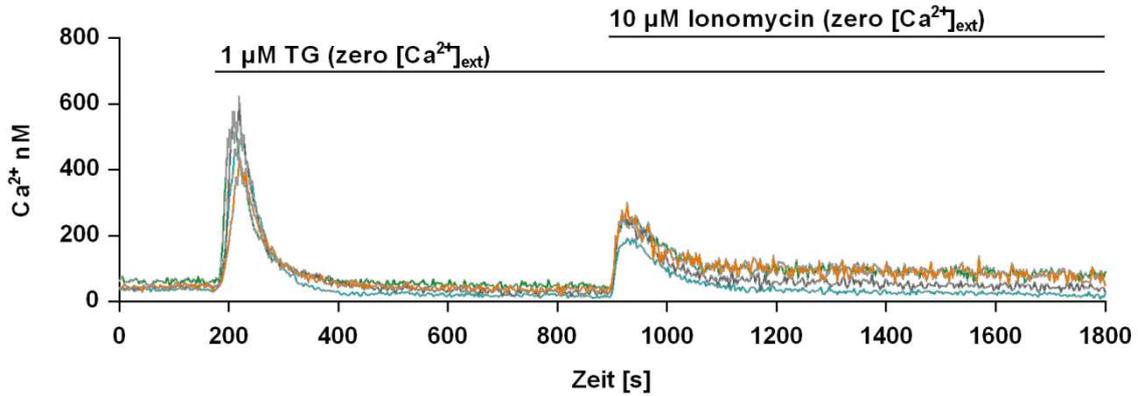
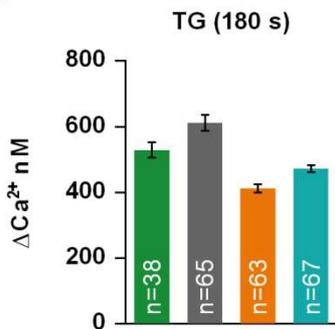
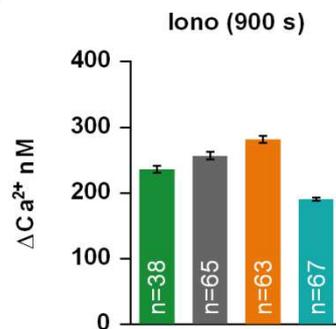
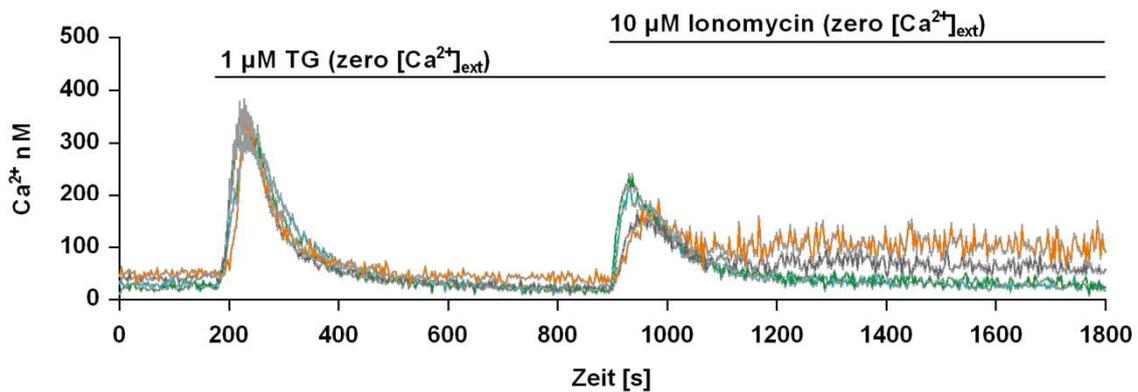
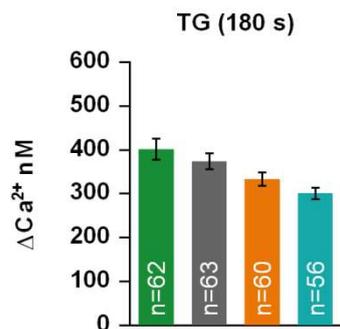
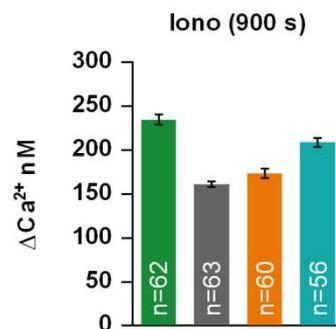
B**C****D****E****F****G**

Abbildung 37: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der unbehandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die anschließende Hinzugabe von Ionomycin (Iono) [10 μM] entleerte die ER-unabhängigen Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol. Die komplette Messung fand in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung (B-G) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 min ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ionomycin hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

A

■ WT
 ■ PEX19^{-/-}
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.15
 ■ PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI.19

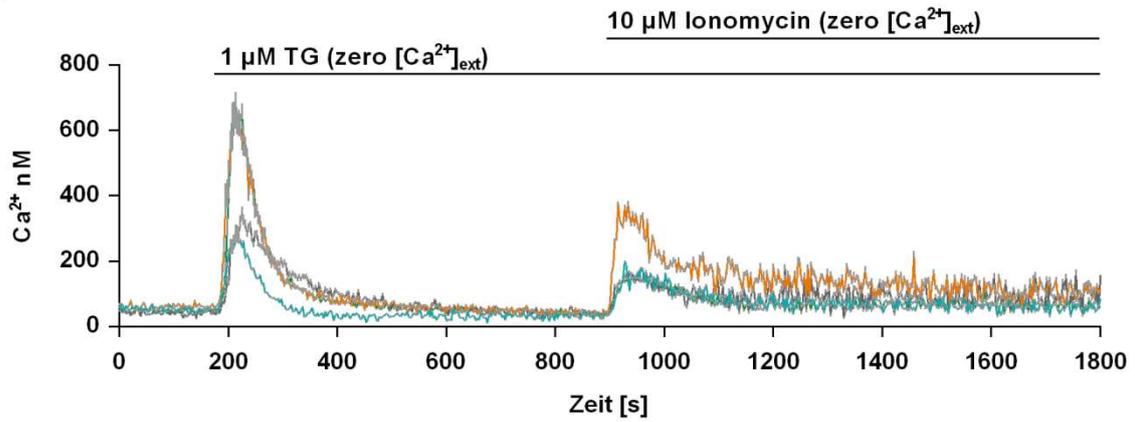
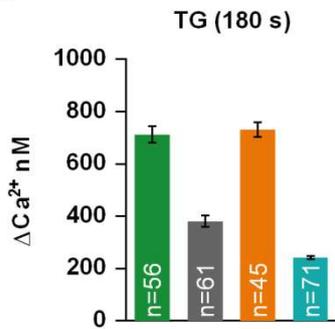
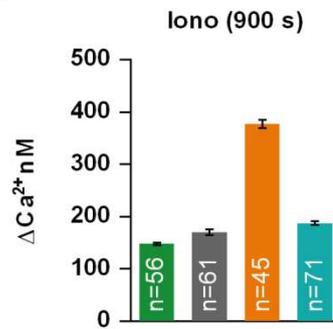
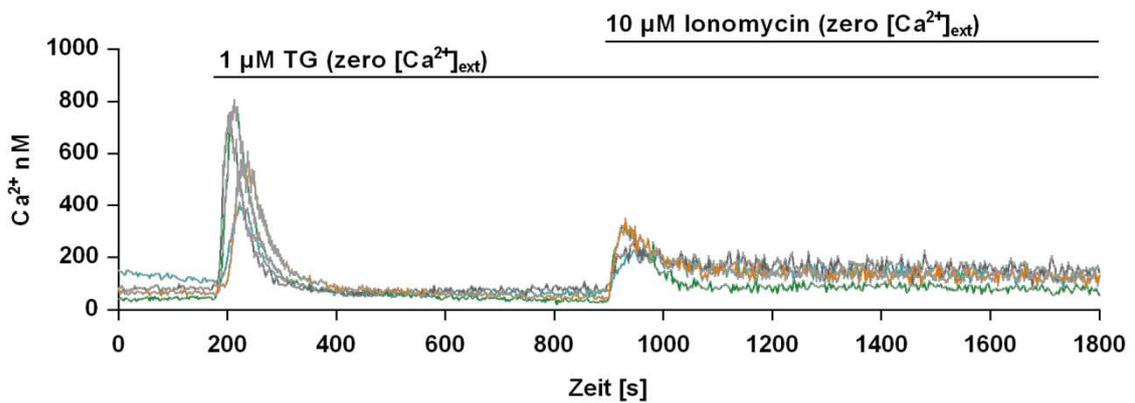
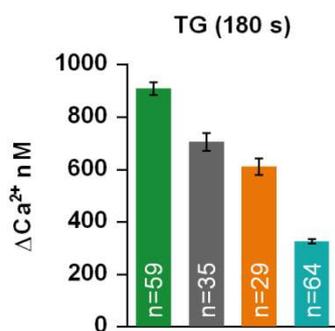
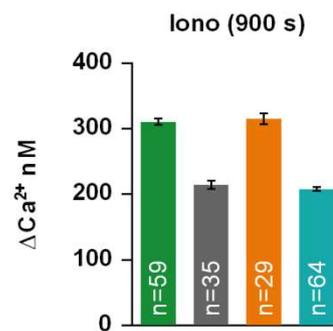
B**C****D****E****F****G**

Abbildung 38: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} Kl. 15 bzw. Kl. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die anschließende Hinzugabe von Ionomycin (Iono) [10 μM] entleerte die ER-unabhängigen Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol. Die komplette Messung fand in EGTA-enthaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung (B-G) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 min ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B+E). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (C+F). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ionomycin hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D+G). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

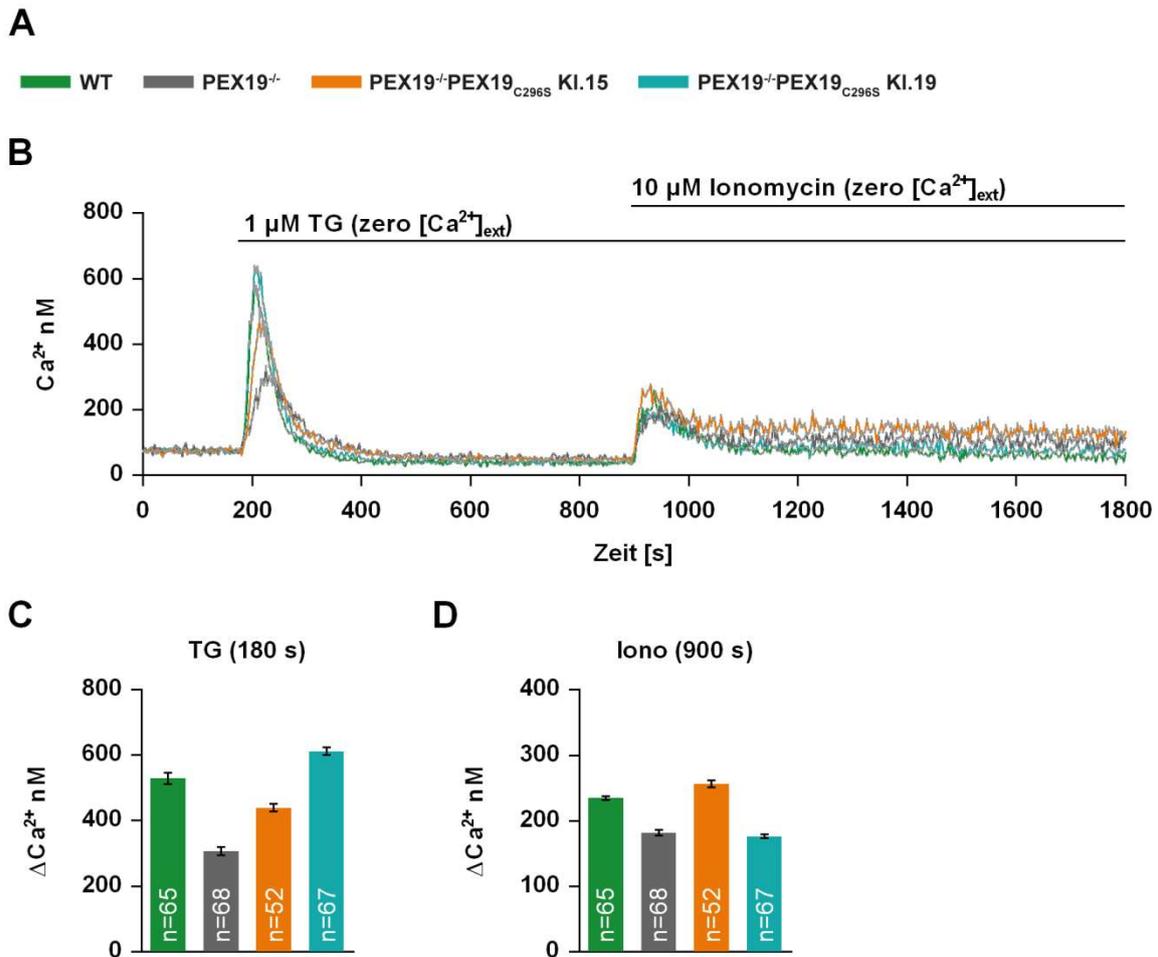


Abbildung 39: Fura-2-AM-basierte Ca^{2+} -Messungen nach Zugabe von Thapsigargin und darauffolgender Hinzugabe von Ionomycin in der Oleat-behandelten WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Die Zelllinien WT, PEX19^{-/-} sowie PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} KI. 15 bzw. KI. 19 sind mit je einer Farbe codiert (A). Durch Zugabe des irreversiblen SERCA-Hemmers Thapsigargin (TG) [1 μM] wurde das ER- Ca^{2+} ins Zytosol depletiert. Die anschließende Hinzugabe von Ionomycin (Iono) [10 μM] entleerte die ER-unabhängigen Ca^{2+} -Speicher ins Zytosol. Die komplette Messung fand in EGTA-enhaltender (Ca^{2+} -freier) Ringer-Lösung (B) statt. Der zeitliche Verlauf der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über einen Messzeitraum von 30 min ist für alle 4 Zelllinien dargestellt (B). Die Zugabe von Thapsigargin erfolgte nach einer Messzeit von 3 Minuten, das Delta des resultierenden Maximums der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde für jede Zelllinie berechnet und im Balkendiagramm dargestellt (C). Nach 15 Minuten Messzeit wurde Ionomycin hinzugegeben, bei dem hierdurch induzierten Maximum der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde ebenfalls für jede Zelllinie das Delta bestimmt (D). Aufgetragen ist der arithmetische Mittelwert aller Zellen einer Messung mit SEM. n = Anzahl der gemessenen Zellen je Zelllinie.

6.2. Mitochondriale Ca^{2+} -Messungen

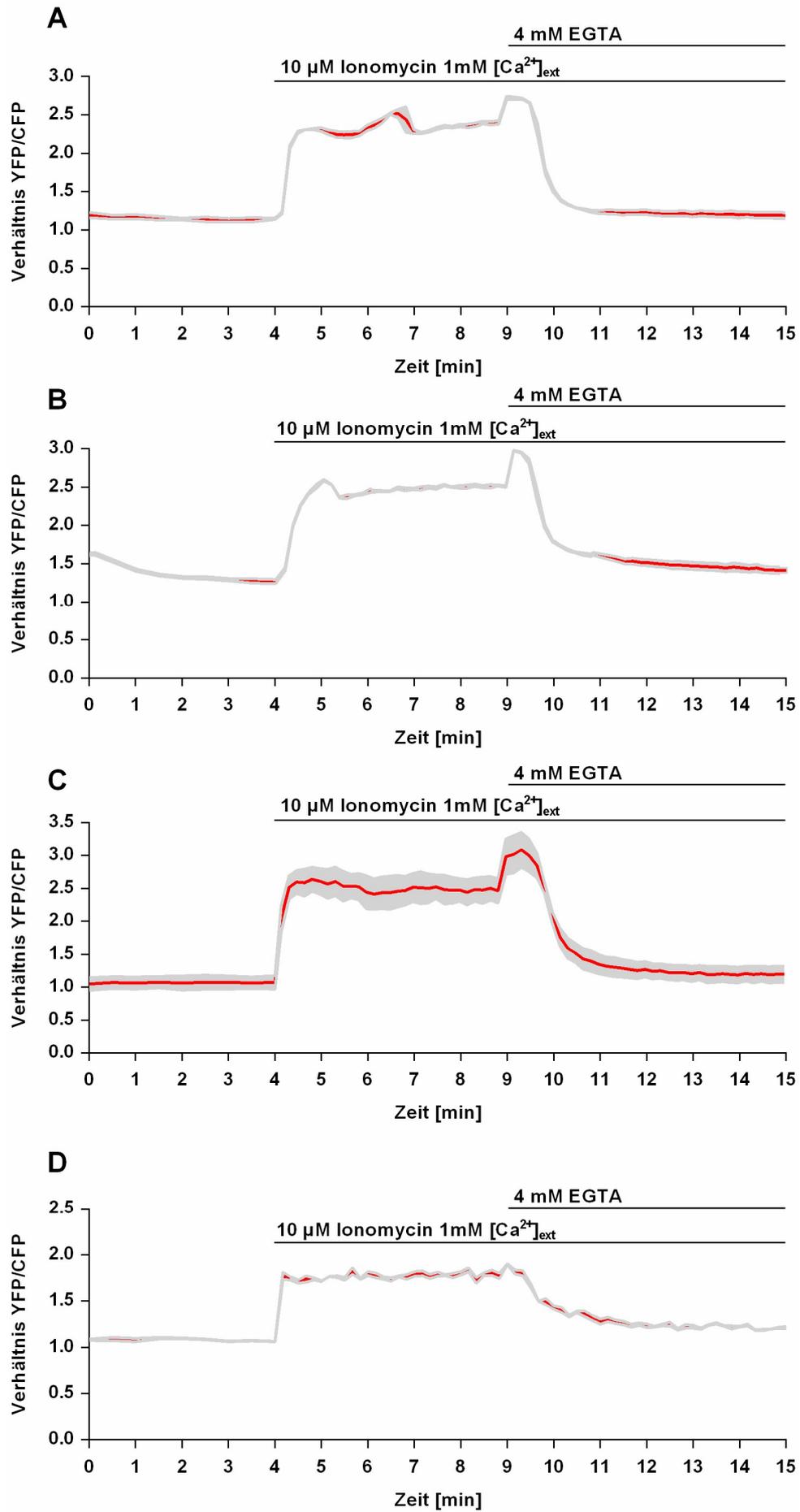


Abbildung 40 (Positivkontrollen): Überprüfung der Funktionsfähigkeit des transient exprimierten Ca^{2+} -Sensors D3cpv in lebenden HeLa Zellen der WT-, $\text{PEX19}^{-/-}$ - sowie den beiden Klonen der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie ohne Induktion der LT-Biogenese. A: WT-Zelllinie B: $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie. C: Kl.15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie. D: Kl.19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie. Der arithmetische Mittelwert (rot) der ratiometrischen mitochondrialen Ca^{2+} -Messungen mit entsprechenden Standardfehlern des Mittelwertes (grau) ist über die Messzeit aufgetragen (A-C). Die Zugabe von Ionomycin [10 μM] mit Ca^{2+} [1 mM] erfolgte nach 4 Minuten und die von EGTA [4 mM] nach 9 Minuten. Die ratiometrischen Messergebnisse ergaben sich aus der Division der Fluoreszenzemission des Akzeptors YFP durch die Fluoreszenzemission des Donors CFP. Anzahl der gemessenen transfizierten Zellen: WT-Zelllinie = 2; $\text{PEX19}^{-/-}$ -Zelllinie = 2; Kl.15 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie = 5 Zellen; Kl.19 der $\text{PEX19}^{-/-}\text{PEX19}_{\text{C296S}}$ -Zelllinie = 2 Zellen.

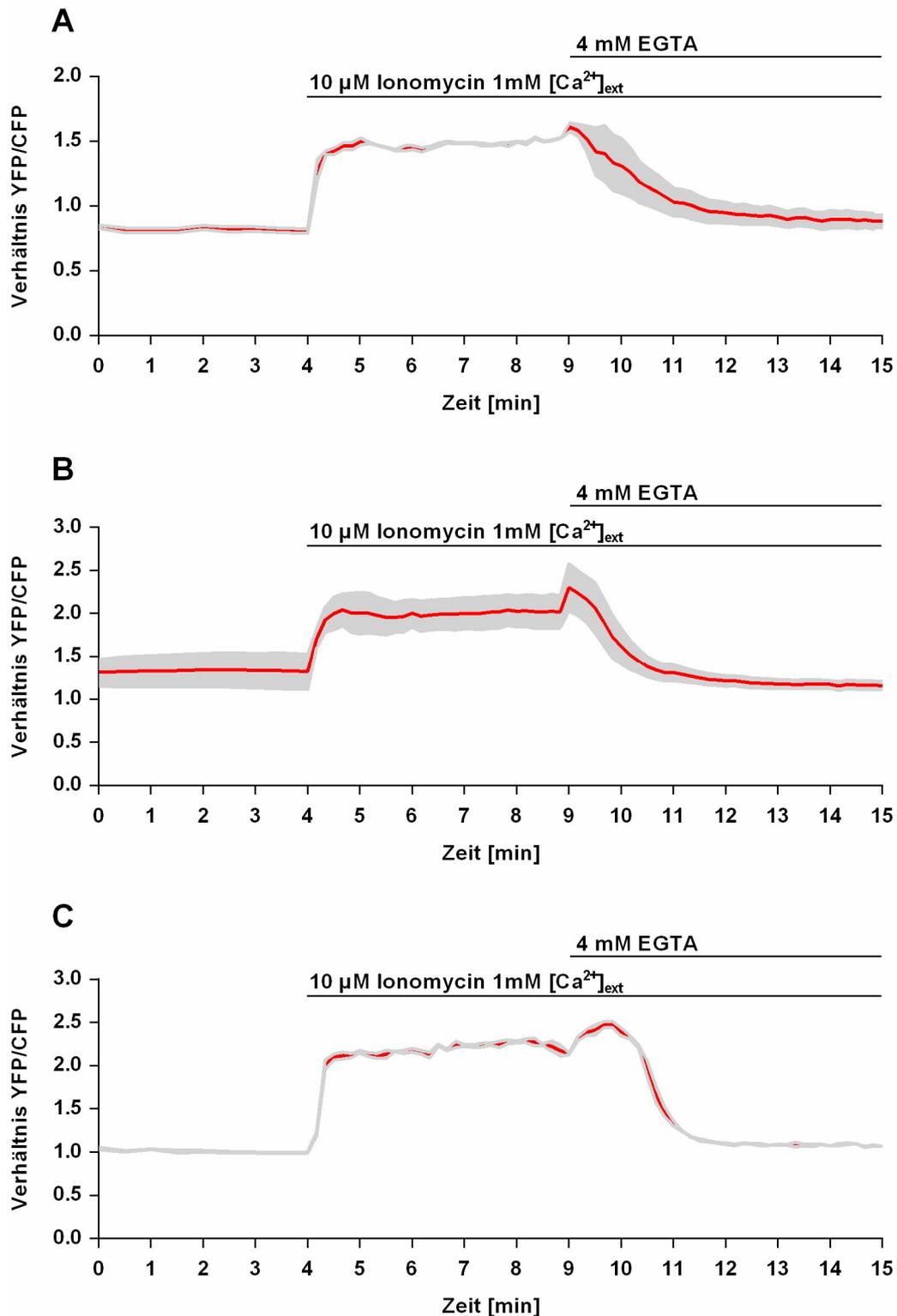


Abbildung 41 (Positivkontrollen): Überprüfung der Funktionsfähigkeit des transient exprimierten Ca²⁺-Sensors D3cpv in lebenden HeLa Zellen der PEX19^{-/-} sowie den beiden Klonen der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nach Induktion der LT-Biogenese. A: PEX19^{-/-}-Zelllinie. B: Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. C: Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. Der arithmetische Mittelwert (rot) der ratiometrischen mitochondrialen Ca²⁺-Messungen mit entsprechenden Standardfehlern des Mittelwertes (grau) ist über die Messzeit aufgetragen (A-C). Die Zugabe von Ionomycin [10 μM] mit Ca²⁺ [1 mM] erfolgte nach 4 Minuten und die von EGTA [4 mM] nach 9 Minuten. Die ratiometrischen Messergebnisse ergaben sich aus der Division der Fluoreszenzemission des Akzeptors YFP durch die Fluoreszenzemission des Donors CFP. Anzahl der gemessenen

transfizierten Zellen: PEX19^{-/-}-Zelllinie = 2; Kl.15 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie = 7 Zellen; Kl.19 der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie = 2 Zellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Ackerman D, Tumanov S, Qiu B, Michalopoulou E, Spata M, Azzam A, Xie H, Simon MC, Kamphorst JJ (2018) Triglycerides Promote Lipid Homeostasis during Hypoxic Stress by Balancing Fatty Acid Saturation. *Cell Rep* 24:2596-2605.e5
2. Agnello M, Morici G, Rinaldi AM (2008) A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology* 56:145–149
3. Akimzhanov AM, Boehning D (2011) Monitoring Dynamic Changes In Mitochondrial Calcium Levels During Apoptosis Using A Genetically Encoded Calcium Sensor. *J Vis Exp JoVE*
4. Ali ES, Petrovsky N (2019) Calcium Signaling As a Therapeutic Target for Liver Steatosis. *Trends Endocrinol Metab* 30:270–281
5. Andersen TB, López CQ, Manczak T, Martinez K, Simonsen HT (2015) Thapsigargin—From Thapsia L. to Mipsagargin. *Molecules* 20:6113–6127
6. Antigny F, Jousset H, König S, Frieden M (2011) Thapsigargin activates Ca²⁺ entry both by store-dependent, STIM1/Orai1-mediated, and store-independent, TRPC3/PLC/PKC-mediated pathways in human endothelial cells. *Cell Calcium* 49:115–127
7. Arnemann J (2019) DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. Springer, Berlin Heidelberg
8. Arruda AP, Hotamisligil GS (2015) Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. *Cell Metab* 22:381–397
9. Ashby MC, Tepikin AV (2001) ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin Cell Dev Biol* 12:11–17
10. Aviram N, Schuldiner M (2017) Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *J Cell Sci* 130:4079–4085
11. Barba I, Chavarria L, Ruiz-Meana M, Mirabet M, Agulló E, Garcia-Dorado D (2009) Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia–reperfusion injury in cardiomyocytes. *J Physiol* 587:1331–1341
12. Barrero MJ, Montero M, Alvarez J (1997) Dynamics of [Ca²⁺] in the Endoplasmic Reticulum and Cytoplasm of Intact HeLa Cells A COMPARATIVE STUDY. *J Biol Chem* 272:27694–27699
13. Bartz R, Li W-H, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RGW, Liu P, Chapman KD (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* 48:837–847
14. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports* 27:4–25
15. Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B (2006) Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. *Hum Gene Ther* 17:253–263

16. Baumgart E, Vanhorebeek I, Grabenbauer M, Borgers M, Declercq PE, Fahimi HD, Baes M (2001) Mitochondrial Alterations Caused by Defective Peroxisomal Biogenesis in a Mouse Model for Zellweger Syndrome (PEX5 Knockout Mouse). *Am J Pathol* 159:1477–1494
17. Ben M'barek K, Ajjaji D, Chorlay A, Vanni S, Forêt L, Thiam AR (2017) ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation. *Dev Cell* 41:591-604.e7
18. Benador IY, Veliova M, Mahdaviani K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, Acín-Pérez R, Shum M, Oliveira MF, Cinti S, Sztalryd C, Barshop WD, Wohlschlegel JA, Corkey BE, Liesa M, Shirihai OS (2018) Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab* 27:869-885.e6
19. Bersuker K, Olzmann JA (2017) Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1862:1166–1177
20. Bersuker K, Peterson CWH, To M, Sahl SJ, Savikhin V, Grossman EA, Nomura DK, Olzmann JA (2018) A Proximity Labeling Strategy Provides Insights into the Composition and Dynamics of Lipid Droplet Proteomes. *Dev Cell* 44:97-112.e7
21. Bi J, Wang W, Liu Z, Huang X, Jiang Q, Liu G, Wang Y, Huang X (2014) Seipin Promotes Adipose Tissue Fat Storage through the ER Ca²⁺-ATPase SERCA. *Cell Metab* 19:861–871
22. Bootman MD, Berridge MJ (1996) Subcellular Ca²⁺ signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Curr Biol* 6:855–865
23. Bootman MD, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M (2013) Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging. *Cold Spring Harb Protoc* 2013:pdb.top066050
24. Bootman MD, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M (2013) Loading Fluorescent Ca²⁺ Indicators into Living Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2013:pdb.prot072801
25. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori CR, Mitro N, Ruscica M (2018) PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? *Int J Mol Sci* 19:
26. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7297–7301
27. Boxberger HJ (2006) Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken: Einführung in Grundlagen und Techniken. 1. Edition. Wiley-Blackwell, Weinheim
28. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF (1997) Eosinophil Lipid Bodies: Specific, Inducible Intracellular Sites for Enhanced Eicosanoid Formation. *J Exp Med* 186:909–920
29. Bozza PT, Viola JPB (2010) Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids PLEFA* 82:243–250

30. Brasaemle DL (2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48:2547–2559
31. Brown Robert B, Audet Julie (2008) Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface* 5:S131–S138
32. Bruce JIE (2018) Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium* 69:28–36
33. Bush KT, Lee H, Nagele RG (1992) Lipid droplets of neuroepithelial cells are a major calcium storage site during neural tube formation in chick and mouse embryos. *Experientia* 48:516–519
34. Camello C, Lomax R, Petersen OH, Tepikin AV (2002) Calcium leak from intracellular stores—the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32:355–361
35. Carr A (2000) HIV Protease Inhibitor-Related Lipodystrophy Syndrome. *Clin Infect Dis* 30:S135–S142
36. Cartwright BR, Binns DD, Hilton CL, Han S, Gao Q, Goodman JM (2014) Seipin performs dissectible functions in promoting lipid droplet biogenesis and regulating droplet morphology. *Mol Biol Cell* 26:726–739
37. Cases S, Smith SJ, Zheng Y-W, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV (1998) Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13018–13023
38. Castro IG, Eisenberg-Bord M, Persiani E, Rochford JJ, Schuldiner M, Bohnert M (2019) Promethin Is a Conserved Seipin Partner Protein. *Cells* 8:
39. Cermelli S, Guo Y, Gross SP, Welte MA (2006) The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol* 16:1783–1795
40. Chernorudskiy AL, Zito E (2017) Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection. *J Mol Biol* 429:620–632
41. Chung J, Wu X, Lambert TJ, Lai ZW, Walther TC, Farese RV (2019) LDAF1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex. *Dev Cell* 0:
42. Clapham DE (2007) Calcium Signaling. *Cell* 131:1047–1058
43. Colasante C, Chen J, Ahlemeyer B, Bonilla-Martinez R, Karnati S, Baumgart-Vogt E (2017) New insights into the distribution, protein abundance and subcellular localisation of the endogenous peroxisomal biogenesis proteins PEX3 and PEX19 in different organs and cell types of the adult mouse. *PLOS ONE* 12:e0183150
44. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T (2010) Mitochondria: The calcium connection. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1797:607–618
45. Day CD, Lee E, Kobayashi J, Holappa LD, Albert H, Ow DW (2000) Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev* 14:2869–2880

46. Diarra A, Sauvé R (1992) Effect of thapsigargin and caffeine on Ca²⁺ homeostasis in HeLa cells: implications for histamine-induced Ca²⁺ oscillations. *Pflüg Arch* 422:40–47
47. Djafarzadeh S, Jakob SM (2017) High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. *J Vis Exp JoVE*
48. Drago I, Giacomello M, Pizzo P, Pozzan T (2008) Calcium Dynamics in the Peroxisomal Lumen of Living Cells. *J Biol Chem* 283:14384–90
49. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *The Lancet* 365:1415–1428
50. Farese RV, Walther TC (2009) Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139:855–860
51. Fonteriz RI, de la Fuente S, Moreno A, Lobatón CD, Montero M, Alvarez J (2010) Monitoring mitochondrial [Ca²⁺] dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium* 48:61–69
52. Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR, Hotamisligil GS (2011) Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 473:528–531
53. Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, Naruko T, Itabe H, Kawada N, Caldwell SH, Ueda M (2010) Expression of Perilipin and Adipophilin in Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Relevance to Oxidative Injury and Hepatocyte Ballooning. *J Atheroscler Thromb* 16:893–901
54. Fujiki Y, Yagita Y, Matsuzaki T (2012) Peroxisome biogenesis disorders: Molecular basis for impaired peroxisomal membrane assembly: In metabolic functions and biogenesis of peroxisomes in health and disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1822:1337–1342
55. Fujiki Y, Okumoto K, Mukai S, Honsho M, Tamura S (2014) Peroxisome biogenesis in mammalian cells. *Front Physiol* 5:
56. Gamayun I, O’Keefe S, Pick T, Klein M-C, Nguyen D, McKibbin C, Piacenti M, Williams HM, Flitsch SL, Whitehead RC, Swanton E, Helms V, High S, Zimmermann R, Cavalié A (2019) Eeyarestatin Compounds Selectively Enhance Sec61-Mediated Ca²⁺ Leakage from the Endoplasmic Reticulum. *Cell Chem Biol* 26:571-583.e6
57. Garg A, Agarwal AK (2009) Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1791:507–513
58. Gatto C, Milanick MA (1993) Inhibition of the red blood cell calcium pump by eosin and other fluorescein analogues. *Am J Physiol-Cell Physiol* 264:C1577–C1586
59. Gey GO (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12:264–265
60. Gingrich JC, Davis DR, Nguyen Q (2000) Multiplex Detection and Quantitation of Proteins on Western Blots Using Fluorescent Probes. *BioTechniques* 29:636–642
61. Goldman A, Harper S, Speicher DW (2016) Detection of Proteins on Blot Membranes. *Curr Protoc Protein Sci* 86:10.8.1-10.8.11

62. Gomes KB, Pardini VC, Fernandes AP (2009) Clinical and molecular aspects of Berardinelli–Seip Congenital Lipodystrophy (BSCL). *Clin Chim Acta* 402:1–6
63. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
64. Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Walther TC (2009) Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* 122:749–752
65. Guštin E, Jarc E, Kump A, Petan T (2017) Lipid droplet formation in HeLa cervical cancer cells depends on cell density and the concentration of exogenous unsaturated fatty acids. *Acta Chim Slov* 64:549–554
66. Hall AHS, Alexander KA (2003) RNA Interference of Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Induces Senescence in HeLa Cells. *J Virol* 77:6066–6069
67. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986–994
68. Helle SCJ, Kanfer G, Kolar K, Lang A, Michel AH, Kornmann B (2013) Organization and function of membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1833:2526–2541
69. Honsho M, Tamura S, Shimosawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y (1998) Mutation in PEX16 Is Causal in the Peroxisome-Deficient Zellweger Syndrome of Complementation Group D. *Am J Hum Genet* 63:1622–1630
70. Hoppe UC (2010) Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett* 584:1975–1981
71. Hostetler HA, Kier AB, Schroeder F (2006) Very-Long-Chain and Branched-Chain Fatty Acyl-CoAs are High Affinity Ligands for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α). *Biochemistry* 45:7669–7681
72. Hoving S, Gerrits B, Voshol H, Müller D, Roberts RC, Oostrum J van (2002) Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. *PROTEOMICS* 2:127–134
73. Hu F, Pan L, Zhang K, Xing F, Wang X, Lee I, Zhang X, Xu J (2014) Elevation of Extracellular Ca²⁺ Induces Store-Operated Calcium Entry via Calcium-Sensing Receptors: A Pathway Contributes to the Proliferation of Osteoblasts. *PLoS ONE* 9:
74. Hymer WC, Kuff EL (1964) Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of triton x-100. *J Histochem Cytochem* 12:359–363
75. Iannetti EF, Smeitink JAM, Beyrath J, Willems PHGM, Koopman WJH (2016) Multiplexed high-content analysis of mitochondrial morphofunction using live-cell microscopy. *Nat Protoc* 11:1693–1710
76. Inesi G, Tadini-Buoninsegni F (2014) Ca²⁺/H⁺ exchange, lumenal Ca²⁺ release and Ca²⁺/ATP coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Cell Commun Signal* 8:5–11
77. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28

78. Ivannikov MV, Sugimori M, Llinás RR (2010) Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons. *Cell Calcium* 47:507–513
79. Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneider R (2011) Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 124:2424–2437
80. Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R (1999) Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci* 96:13807–13812
81. Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10:870
82. Kory N, Farese RV, Walther TC (2016) Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol* 26:535–546
83. Kraemer N, Farese RV, Walther TC (2013) Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* 5:973–983
84. Krebs J, Agellon LB, Michalak M (2015) Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 460:114–121
85. Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C (2008) Imaging of Lipid Biosynthesis: How a Neutral Lipid Enters Lipid Droplets. *Traffic* 9:338–352
86. Kumar Y, Cocchiaro J, Valdivia RH (2006) The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. *Curr Biol* 16:1646–1651
87. Kurat CF, Wolinski H, Petschnigg J, Kaluarachchi S, Andrews B, Natter K, Kohlwein SD (2009) Cdk1/Cdc28-Dependent Activation of the Major Triacylglycerol Lipase Tgl4 in Yeast Links Lipolysis to Cell-Cycle Progression. *Mol Cell* 33:53–63
88. Lacruz RS, Feske S (2015) Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann N Y Acad Sci* 1356:45–79
89. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
90. Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM (2013) The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 Bethesda Md* 3:1213–1224
91. Lang S, Pfeffer S, Lee P-H, Cavalié A, Helms V, Förster F, Zimmermann R (2017) An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front Physiol* 8:
92. Lasorsa FM, Pinton P, Palmieri L, Scarcia P, Rottensteiner H, Rizzuto R, Palmieri F (2008) Peroxisomes as Novel Players in Cell Calcium Homeostasis. *J Biol Chem* 283:15300–15308
93. Layerenza JP, González P, García de Bravo MM, Polo MP, Sisti MS, Ves-Losada A (2013) Nuclear lipid droplets: A novel nuclear domain. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1831:327–340

94. Lee JN, Zhang X, Feramisco JD, Gong Y, Ye J (2008) Unsaturated Fatty Acids Inhibit Proteasomal Degradation of Insig-1 at a Postubiquitination Step. *J Biol Chem* 283:33772–33783
95. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Ory DS, Schaffer JE (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 100:3077–3082
96. Liu C, Hermann TE (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253:5892–5894
97. Lodhi IJ, Semenkovich CF (2014) Peroxisomes: A Nexus for Lipid Metabolism and Cellular Signaling. *Cell Metab* 19:380–392
98. Long AP, Manneschmidt AK, VerBrugge B, Dortch MR, Minkin SC, Prater KE, Biggerstaff JP, Dunlap JR, Dalhaimer P (2012) Lipid Droplet De Novo Formation and Fission Are Linked to the Cell Cycle in Fission Yeast. *Traffic* 13:705–714
99. Lopes RHC, Reid ID, Hobson PR (2007) The two-dimensional Kolmogorov-Smirnov test. *Proceedings of Science* URL: <http://bura.brunel.ac.uk/handle/2438/1166>
100. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM (2009) Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133:1463–1467
101. Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM, Lewis RS (2008) Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* 454:538–542
102. Lundin C, Nordström R, Wagner K, Windpassinger C, Andersson H, von Heijne G, Nilsson I (2006) Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Lett* 580:2281–2284
103. Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl Jr T, Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, Meier M, Mégarbané A, BSCL Working Group, Lathrop M, Capeau J (2001) Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 28:365–370
104. Mahmood T, Yang P-C (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am J Med Sci* 4:429–434
105. Manfredi G, Yang L, Gajewski CD, Mattiazzi M (2002) Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* 26:317–326
106. Martin S, Parton RG (2006) Opinion: Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:373–378
107. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH-J, Quast MJ, Gorenstein D, Chen K-H, Chan L (2000) Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lep^{db/db}* mice. *Nat Genet* 26:474–479
108. Martínez-Zaguilán R, Parnami J, Martinez GM (1998) Mag-Fura-2 (Furaptra) Exhibits both Low (μM) and High (nM) Affinity for Ca^{2+} . *Cell Physiol Biochem* 8:158–174
109. Mason RR, Mokhtar R, Matzaris M, Selathurai A, Kowalski GM, Mokbel N, Meikle PJ, Bruce CR, Watt MJ (2014) PLIN5 deletion remodels intracellular lipid composition and causes insulin resistance in muscle. *Mol Metab* 3:652–663

110. Mason RR, Watt MJ (2015) Unraveling the roles of PLIN5: linking cell biology to physiology. *Trends Endocrinol Metab* 26:144–152
111. Masters JR (2002) HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2:315–319
112. Matsuzono Y, Kinoshita N, Tamura S, Shimozawa N, Hamasaki M, Ghaedi K, Wanders RJA, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y (1999) Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2116–2121
113. Maus M, Cuk M, Patel B, Lian J, Ouimet M, Kaufmann U, Yang J, Horvath R, Hornig-Do H-T, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Moore KJ, Cuervo AM, Feske S (2017) Store-Operated Ca²⁺ Entry Controls Induction of Lipolysis and the Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism. *Cell Metab* 25:698–712
114. Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438:612
115. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, Smedt HD, Missiaen L (2011) Endoplasmic-Reticulum Calcium Depletion and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004317
116. Miller DJ, Smith GL (1984) EGTA purity and the buffering of calcium ions in physiological solutions. *Am J Physiol-Cell Physiol* 246:C160–C166
117. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9:1089–1097
118. Moore KJ, Tabas I (2011) Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell* 145:341–355
119. Morgenstern M, Stiller SB, Lübbert P, Peikert CD, Dannenmaier S, Drepper F, Weill U, Höß P, Feuerstein R, Gebert M, Bohnert M, van der Laan M, Schuldiner M, Schütze C, Oeljeklaus S, Pfanner N, Wiedemann N, Warscheid B (2017) Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep* 19:2836–2852
120. Murphy DJ, Vance J (1999) Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 24:109–115
121. Murphy DJ (2001) The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40:325–438
122. Murphy DJ (2012) The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma* 249:541–585
123. Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3197–3202
124. Olzmann JA, Carvalho P (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20:137
125. P. Y. Kao J (1990) Active involvement of Ca²⁺ in mitotic progression of Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 111:183–196

126. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY (2006) Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chem Biol* 13:521–530
127. Palty R, Hershinkel M, Sekler I (2012) Molecular Identity and Functional Properties of the Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *J Biol Chem* 287:31650–31657
128. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK (2011) Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca²⁺ pumps: Invention and applications of caloxins. *World J Biol Chem* 2:39–47
129. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. *Methods* 46:143–151
130. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, Ozcan U (2010) Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:19320–19325
131. Petan T, Jarc E, Jusović M (2018) Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Mol Basel Switz* 23:
132. Pinto MCX, Kihara AH, Goulart VAM, Tonelli FMP, Gomes KN, Ulrich H, Resende RR (2015) Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal* 27:2139–2149
133. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74:595–636
134. Prakriya M, Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 95:1383–1436
135. Prins D, Michalak M (2011) Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004069
136. Rakhshandehroo M, Knoch B, Müller M, Kersten S (2010) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR Res* 2010:
137. Rapoport TA, Li L, Park E (2017) Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:369–390
138. Raychaudhury B, Gupta S, Banerjee S, Datta SC (2006) Peroxisome is a reservoir of intracellular calcium. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 1760:989–992
139. Richard Altmann (1894) *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Verlag von Veit & Comp., Leipzig
140. Ringer S (1883) A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 4:29-42.3
141. Rivero-Gutiérrez B, Anzola A, Martínez-Augustín O, de Medina FS (2014) Stain-free detection as loading control alternative to Ponceau and housekeeping protein immunodetection in Western blotting. *Anal Biochem* 467:1–3
142. Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T (1992) Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358:325
143. Roe MW, Lemasters JJ, Herman B (1990) Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium* 11:63–73

144. Roy S, Kumar V (2014) A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *Int J Sci Res IJSR*
145. Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T (2003) Looking forward to seeing calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:579–586
146. Salpietro V, Phadke R, Saggari A, Hargreaves IP, Yates R, Fokoloros C, Mankad K, Hertecant J, Ruggieri M, McCormick D, Kinali M (2015) Zellweger syndrome and secondary mitochondrial myopathy. *Eur J Pediatr* 174:557–563
147. Samtleben S, Jaepel J, Fecher C, Andreska T, Rehberg M, Blum R (2013) Direct Imaging of ER Calcium with Targeted-Esterase Induced Dye Loading (TED). *J Vis Exp JoVE*
148. Schatzmann HJ (1966) ATP-dependent Ca^{++} -extrusion from human red cells. *Experientia* 22:364–365
149. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, Linxweiler J, Dudek J, Blum R, Helms V, Paton AW, Paton JC, Cavalié A, Zimmermann R (2012) BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca^{2+} leakage from the ER. *EMBO J* 31:3282–3296
150. Schröder M, Kaufman RJ (2005) The Mammalian Unfolded Protein Response. *Annu Rev Biochem* 74:739–789
151. Schrul B, Kopito RR (2016) Peroxin-Dependent Targeting of a Lipid Droplet-Destined Membrane Protein to ER-subdomains. *Nat Cell Biol* 18:740–751
152. Schrul B, Schliebs W (2018) Intracellular communication between lipid droplets and peroxisomes: the Janus face of PEX19. *Biol Chem*
153. Sepp D, Kohlwein, Veenhuis M, van der Klei IJ (2013) Lipid Droplets and Peroxisomes: Key Players in Cellular Lipid Homeostasis or A Matter of Fat—Store 'em Up or Burn 'em Down | *Genetics*. *Genetics* 193:1–50
154. Shai N, Schuldiner M, Zalckvar E (2016) No peroxisome is an island — Peroxisome contact sites. *Biochim Biophys Acta* 1863:1061–1069
155. Sharma V, O'Halloran DM (2014) Recent structural and functional insights into the family of sodium calcium exchangers. *genesis* 52:93–109
156. Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Imamura A, Ghaedi K, Fujiki Y, Kondo N (2000) Identification of PEX3 as the gene mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures. *Hum Mol Genet* 9:1995–1999
157. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85
158. Smyth JT, Hwang S-Y, Tomita T, DeHaven WI, Mercer JC, Putney JW (2010) Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med* 14:2337–2349
159. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL (2012) STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:549–565

160. Soni KG, Mardones GA, Sougrat R, Smirnova E, Jackson CL, Bonifacino JS (2009) Coatomer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci* 122:1834–1841
161. Sui X, Arlt H, Brock KP, Lai ZW, DiMaio F, Marks DS, Liao M, Farese RV, Walther TC (2018) Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin. *J Cell Biol* 217:4080–4091
162. Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M (2014) Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun* 5:
163. Suzuki M (2017) Regulation of lipid metabolism via a connection between the endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Anat Sci Int* 92:50–54
164. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G (2006) Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:358
165. Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T (2002) The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *J Biol Chem* 277:44507–44512
166. Thiam AR, Forêt L (2016) The physics of lipid droplet nucleation, growth and budding. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1861:715–722
167. Thiele C, Spandl J (2008) Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 20:378–385
168. Toyoshima C, Inesi G (2004) Structural Basis of Ion Pumping by Ca²⁺-ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu Rev Biochem* 73:269–292
169. Uzbekov R, Roingeard P (2013) Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections. *BMC Res Notes* 6:386
170. Vartak R, Porras CA-M, Bai Y (2013) Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 4:582–590
171. Vastiau IMK, Anthonio EA, Brams M, Brees C, Young SG, Van de Velde S, Wanders RJA, Mannaerts GP, Baes M, Van Veldhoven PP, Franssen M (2006) Farnesylation of Pex19p is not essential for peroxisome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Cell Mol Life Sci CMLS* 63:1686–1699
172. Verma AK, Filoteo AG, Stanford DR, Wieben ED, Penniston JT, Strehler EE, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S (1988) Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 263:14152–14159
173. Walter P, Ron D (2011) The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334:1081–1086
174. Walther TC, Farese RV (2009) The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 1791:459–466
175. Walther TC, Chung J, Farese RV (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:491–510
176. Wanders RJA, Waterham HR (2006) Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annu Rev Biochem* 75:295–332

177. Wang H, Sreenivasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, Gong D, Stanley WC, Sztalryd C (2011) Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res* 52:2159–2168
178. Wang H, Becuwe M, Housden BE, Chitraju C, Porras AJ, Graham MM, Liu XN, Thiam AR, Savage DB, Agarwal AK, Garg A, Olarte M-J, Lin Q, Fröhlich F, Hannibal-Bach HK, Upadhyayula S, Perrimon N, Kirchhausen T, Ejsing CS, Walther TC, Farese RV Jr (2016) Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *eLife* 5:e16582
179. Wilfling F, Wang H, Haas JT, Kraemer N, Gould TJ, Uchida A, Cheng J-X, Graham M, Christiano R, Fröhlich F, Liu X, Buhman KK, Coleman RA, Bewersdorf J, Farese RV, Walther TC (2013) Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets. *Dev Cell* 24:384–399
180. Wilfling F, Haas JT, Walther TC, Jr RVF (2014) Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 29:39–45
181. Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck R, Gould TJ, Allgeyer ES, Pincet F, Bewersdorf J, Farese JR, Walther TC (2014) Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *eLife* 3:e01607–e01607
182. Wilson CH, Ali ES, Scrimgeour N, Martin AM, Hua J, Tallis GA, Rychkov GY, Barritt GJ (2015) Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca²⁺ entry and reduces ER Ca²⁺ through a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem J* 466:379–390
183. Wilson EB (1896) *The cell in development and inheritance*. The Macmillan company, New York
184. Wu H, Ploeger JM, Kamarajugadda S, Mashek DG, Mashek MT, Manivel JC, Shekels LL, Lapiro JL, Albrecht JH (2019) Evidence for a Novel Regulatory Interaction Involving Cyclin D1, Lipid Droplets, Lipolysis, and Cell Cycle Progression in Hepatocytes. *Hepatology Commun* 3:406–422
185. [www.abcam.com Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail \(ab110413\) | Abcam.](https://www.abcam.com/total-oxphos-rodent-wb-antibody-cocktail-ab110413.html) URL: <https://www.abcam.com/total-oxphos-rodent-wb-antibody-cocktail-ab110413.html>. Aufgerufen am 03.11.2019
186. [www.uniprot.org MT-CO1 - Cytochrome c oxidase subunit 1 - Homo sapiens \(Human\) - MT-CO1 gene & protein.](https://www.uniprot.org/uniprot/P00395) URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/P00395>. Aufgerufen am 03.11.2019
187. Yan R, Qian H, Lukmantara I, Gao M, Du X, Yan N, Yang H (2018) Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids. *Dev Cell* 47:248-256.e4
188. Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, Yu J, Zhang P, Na H, Zhang H, Ma Y, Liu P (2012) The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* 53:1245–1253
189. Yu S, Viswakarma N, Batra SK, Sambasiva Rao M, Reddy JK (2004) Identification of promethin and PGLP as two novel up-regulated genes in PPAR γ 1-induced adipogenic mouse liver. *Biochimie* 86:743–761
190. Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* 16:333–340

191. Zehmer JK, Huang Y, Peng G, Pu J, Anderson RGW, Liu P (2009) A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *PROTEOMICS* 9:914–921
192. Zhang C, Liu P (2017) The lipid droplet: A conserved cellular organelle. *Protein Cell* 8:796–800
193. Zheng J, Zeng X, Wang S (2015) Calcium ion as cellular messenger. *Sci China Life Sci* 58:1–5
194. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* 306:1383–1386

8. Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Frau Jun.-Prof. Dr. Bianca Schrul für die Bereitstellung des Themas und die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe. Dabei möchte ich mich insbesondere für die exzellente Betreuung, die stete Möglichkeit zur Klärung von Fragen sowie die konstruktiven Diskussionen bedanken. Eine bessere Betreuung während der experimentellen Laborarbeit hätte ich mir nicht vorstellen können.

Ein besonderer Dank gebührt auch Dr. Tillman Pick für die ausführliche und geduldige Einarbeitung in die Ca^{2+} -Messungen. Bei Fragen und Problemen war er auch über die Einarbeitungsphase hinaus immer erreichbar. Zudem danke ich Ihm für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Cavalié für sein Feedback zu meinen Daten aus den Fura-2-AM basierten Ca^{2+} -Messungen sowie Interpretationsvorschlägen danken.

Für die konstruktiven Gespräche zur Auswahl geeigneter mitochondrialer Ca^{2+} -Sensoren und die technische Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie möchte ich mich bei Dr. Alexander von der Malsburg bedanken.

Bei Phillip Knapp möchte ich mich für die technische Hilfe bei der Durchführung der Experimente zur Messung der mitochondrialen Ca^{2+} -Messung bedanken. Für die Hilfe bei der Durchführung der Messungen zur Kinetikbestimmung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration danke ich Mona Schöppe.

Bei Silke Guthörl möchte ich mich für die systematische Durchführung und Quantifizierung zahlreicher Immunoblots bedanken.

Für die unkomplizierte Bereitstellung von Antikörpern möchte ich mich bei der AG Lang, der AG Flockerzi, der AG van der Laan sowie der AG Niemeyer bedanken.

Außerdem bedanke ich mich insbesondere bei Dr. Steffi Caesar, Sven Lyschik, Carsten Mattes, John Reinhard und Toni Radanovic für ihre Hilfsbereitschaft bei der Klärung experimenteller Fragen. Darüber hinaus möchte ich auch allen nicht namentlich genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppen Schrul und Ernst für die allzeitige Hilfsbereitschaft sowie die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Meinem Bruder und Mitstreiter Andreas Riske danke ich für hilfreiche Diskussionen und die gemeinsame Erarbeitung von Lösungsstrategien.

Ein besonderer Dank gilt meiner Eltern, Carla und Helmut Riske und meinen Großeltern Karin und Eugen Fischer, für das in mich gesetzte Vertrauen verbunden mit stets motivierenden Worten. Ihr wart immer für mich da und dafür möchte ich mich ganz herzlich bei euch bedanken.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.