

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

## **Die Funktion Translokon-assoziiierter Komponenten zum ER-Import von Vorstufenproteinen in humanen Zellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der theoretischen Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: **Alexandra Hoffmann**  
geboren am: 22.01.1987 in Saarlouis

*Stärke entsteht nicht im Körper. Sie entsteht aus einem unbändigen Willen*  
– Mahatma Gandhi

Meiner Familie gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1 Aufbau und Funktionen des Endoplasmatischen Retikulums . . . . .	6
2.2 Proteintransport in das ER . . . . .	7
2.2.1 Bedeutung der Signalsequenzen . . . . .	8
2.2.2 Transportwege . . . . .	9
2.2.2.1 SRP-abhängiger Transport . . . . .	10
2.2.2.2 SRP-unabhängiger Transport . . . . .	11
2.3 Die Translokonkomponenten des ER . . . . .	12
2.3.1 Der Sec61-Komplex als Proteinkanal . . . . .	12
2.3.2 Akzessorische Translokonkomponenten . . . . .	13
2.3.2.1 Signalerkennung und Zielführung durch SRP und die SRP-Rezeptoruntereinheit . . . . .	13
2.3.2.2 Sec62 . . . . .	14
2.3.2.3 Sec63 . . . . .	15
2.3.2.4 TRAP . . . . .	16
2.3.3 Funktionale Proteine im ER Lumen . . . . .	16
2.3.3.1 Der Nukleotidaustauschfaktor Sil1 . . . . .	16
2.3.3.2 ER-lumenale Chaperone . . . . .	18
2.3.4 Lumenale ERj-Domänen-Proteine . . . . .	18
2.3.4.1 ERj3 . . . . .	19
2.3.4.2 ERj6 . . . . .	20
2.4 Zielsetzung . . . . .	21
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1 Material . . . . .	22
3.1.1 Geräte und zugehörige Software . . . . .	22
3.1.2 Enzyme, Chemikalien und Chemikaliensätze . . . . .	24
3.1.3 RNA Oligonukleotide . . . . .	25
3.1.4 Plasmide . . . . .	26
3.1.5 Antikörper . . . . .	27
3.1.6 Raue Mikrosomen . . . . .	28
3.1.7 Bakterienstämme . . . . .	29
3.1.8 Zelllinien . . . . .	29
3.2 Analysemethoden der Proteinbiochemie . . . . .	29
3.2.1 Präparation von Zellysat . . . . .	29

3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	30
3.2.3	Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western Blot) . . . . .	31
3.2.3.1	Transfer in der Halbtrockenzelle . . . . .	32
3.2.3.2	Transfer in der Tankzelle . . . . .	32
3.2.4	Immunologische Detektion von Proteinen . . . . .	33
3.2.5	Densitometrie . . . . .	33
3.3	Methoden der Molekularbiologie . . . . .	34
3.3.1	Klonierungsverfahren . . . . .	34
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	35
3.3.3	Medien und Platten zur Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	35
3.3.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	36
3.3.5	Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	36
3.3.6	Quantitative und qualitative Analyse isolierter Plasmid-DNA . . . . .	37
3.4	Praxis der Zellkultur und -manipulation . . . . .	37
3.4.1	Kultivierung von Säugerzellen . . . . .	37
3.4.2	Zellzählung mittels Countess . . . . .	38
3.4.3	Transfektionsmethoden . . . . .	38
3.4.3.1	siRNA-basierte Säugerzellmanipulation . . . . .	38
3.4.3.2	Plasmidbasierte Säugerzellmanipulation . . . . .	39
3.5	Methoden zur intrazellulären Lokalisierung von Proteinen . . . . .	41
3.5.1	Präparation von semipermeabilisierten Zellen . . . . .	41
3.5.2	Sequentielle Proteasesensitivität . . . . .	41
3.5.3	Alkalische Carbonatextraktion . . . . .	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
4.1	Etablierung der SR $\beta$ Depletion in HeLa-Zellen . . . . .	46
4.1.1	siRNAs gegen <i>SRPRB</i> in HeLa-Zellen wurden etabliert . . . . .	46
4.1.2	Kombination von <i>SRPRB</i> siRNA #3 und #4 erhöht die Depletionseffizienz . . . . .	48
4.1.3	Depletion von <i>SRPRB</i> verringert den Proteingehalt von SR $\alpha$ . . . . .	48
4.2	Studien zur Translokation von Prolaktin . . . . .	50
4.2.1	Präprolaktin liegt zytosolisch vor und die prozessierten PRL-Formen geschützt im Lumen des ER . . . . .	50
4.2.2	Präprolaktin ist zum Teil in die ER-Membran inseriert . . . . .	53
4.2.3	PRL zeigt einen Translokationsdefekt nach Depletion von Sec63 und SR $\alpha$ . . . . .	55
4.3	Studien zur Translokation von ERj6 . . . . .	59
4.3.1	ERj6 wird unter Kontrollbedingungen ineffizient transloziert . . . . .	60
4.3.2	Die Translokationseffizienz von ERj6 ist nach Depletion von Sec62 und Sec63 verringert . . . . .	62

4.3.3	Der endogene ERj6-Gehalt ist nach Depletion von Sec62 verringert	65
4.3.4	Der Vorläufer von ERj6 ist in die Membran inseriert . . . . .	66
4.4	Studien zur Translokation von ERj3 . . . . .	69
4.4.1	Die Depletion des heterodimeren SR-Komplex erzeugt keinen Translokationsdefekt von ERj3 . . . . .	69
4.4.2	Der Einsatz zweier verschiedener siRNAs gegen <i>SEC63</i> erzeugt einen additiven Transportdefekt von ERj3 . . . . .	72
4.5	Untersuchung von Transportsubstraten als DHFR-Fusionsproteine .	75
4.5.1	Das unglykoslierte prozessierte ERj3-DHFR ist unter Kontrollbedingungen nicht detektierbar . . . . .	75
4.5.2	Der Transport von ERj3-DHFR ist abhängig von Sec62 und verläuft cotranslational . . . . .	77
4.5.3	Apelin-DHFR wird unter Kontrollbedingungen effizient transportiert . . . . .	80
4.5.4	Die Depletion von Sec63 vermindert die Translokation von Apelin-DHFR . . . . .	81
4.6	Studien zur Translokation von Sil1 . . . . .	83
4.6.1	Unter Kontrollbedingungen ist das unglykosilierte reife Sil1 nicht darstellbar . . . . .	84
4.6.2	Die Verminderung von TRAP $\beta$ reduziert die Translokationseffizienz von Sil1 . . . . .	85
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
5.1	Der SR-Komplex unterstützt die Translokation von PRL, aber offenbar nicht von ERj3 . . . . .	89
5.2	Sec63 unterstützt den SRP-abhängigen Transport von PRL . . . . .	92
5.3	ERj6 folgt einer SRP-abhängigen und einer SRP-unabhängigen Transportroute in das ER . . . . .	94
5.4	Die Vorstufen von PRL und ERj6 sind inseriert in die ER-Membran .	97
5.5	ERj3-DHFR wird cotranslational transportiert . . . . .	99
5.6	Sil1 und Apelin-DHFR werden SRP-unabhängig transportiert . . . .	101
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AA</b>	Acrylamid
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	Breite
<b>BiP</b>	Bindungsprotein (engl.: immunoglobulin heavy chain binding protein)
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>CMV</b>	Zytomegalie-Virus
<b>C-Terminus</b>	Carboxyterminus
<b>DHFR</b>	Dihydrofolatreduktase
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ECL</b>	engl.: enhanced chemiluminescence
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EK</b>	Endkonzentration
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ERj</b>	ER-assoziiertes dnaJ-Protein
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alii)
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum (engl.: Fetal calve serum)
<b>GFP</b>	Grün-fluoreszierendes Protein
<b>Grp</b>	Glukose-reguliertes Protein
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>H</b>	Höhe
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
<b>Hsp</b>	Hitzeschockprotein
<b>LB</b>	engl.: lysogeny broth
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KHM-Puffer</b>	Puffer aus KOAc, MgOAc und HEPES
<b>M</b>	Molar
<b>MG132</b>	Benzyl N-[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-[[[(2S)-4-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]amino]-1-oxopentan-2-yl]carbam
<b>Mio</b>	Millionen
<b>MSS</b>	Marinesco-Sjögren-Syndrom

<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>MTX</b>	Methothrexat
<b>N-terminal</b>	Aminoterminal
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: Phosphate buffered saline)
<b>PDI</b>	Proteindisulfidisomerase
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>PLAC</b>	Proteaseinhibitormix (Pepstatin A, Leupeptin, Antipain, Chymostatin)
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PpCecA</b>	PreproCecropinA
<b>PRL</b>	Prolaktin
<b>RM</b>	Raue Mikrosomen
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (engl.: Ribonucleic acid)
<b>RNase</b>	Ribonukleinase
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SR</b>	SRP-Rezeptor
<b>SRP</b>	Signalerkennungspartikel (engl.: signal recognition particle)
<b>SSR</b>	Signalsequenzrezeptor
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Salzlösung (-T: mit TritonX-100; engl.: Tris-buffered saline)
<b>TE</b>	TRIS-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<b>TM</b>	Transmembranregion
<b>TRAM</b>	engl.: translocating chain-associated membrane protein
<b>TRAP</b>	engl.: translocon-associated protein complex
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
<b>Tx</b>	Triton X-100
<b>UdS</b>	Universität des Saarlandes
<b>UPR</b>	engl.: unfolded protein response
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>v/v</b>	Volumenprozent („volume/volume“)
<b>w/v</b>	Gewichtsprozent („weight/volume“)
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden akzessorische Proteine des dynamischen, Proteinleitenden Sec61-Kanals auf ihre Beteiligung am co- und posttranslationalen Transport von Apelin, ERj3, ERj6, Prolaktin (PRL) und Sil1 durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) untersucht. Diese Modellsubstrate wurden hinsichtlich der Mitwirkung von Sec62, Sec63, des SRP-Rezeptor- (SR) oder des TRAP-Komplex an ihrer effizienten Translokation analysiert. Der Einfluss dieser akzessorischen Proteine an der Zielführung und Translokation verschiedener Vorstufenproteine wurde durch siRNA-vermittelte Depletion in intakten humanen Zellen untersucht. Um den Vorläufer und die prozessierten Proteinformen der ausgewählten Substrate untersuchen und einen potentiellen Translokationsdefekt durch die Akkumulierung der Vorstufen detektieren zu können, kam Plasmid-vermittelte Expression in Kombination mit einem Proteasominhibitor und Tunicamycin zum Einsatz. Zur intrazellulären Lokalisierung der Vorstufenproteine von ERj6 und PRL wurden die Zellen mit Digitonin permeabilisiert und, anschließend an eine Carbonatextraktion, fraktioniert. Weiterhin wurden die Vorläufer auf Proteaseresistenz geprüft. Zur Untersuchung eines potentiellen posttranslationalen Transports der Vorstufenproteine von Apelin und ERj3 wurden diese als DHFR-Fusionsproteine in Kombination mit siRNA-vermittelter Depletion eingesetzt und mit dem Hemmstoff Methotrexat (MTX) behandelt.

Die Etablierung der Depletion von SR $\beta$  mit geeigneten siRNAs zeigte sich durch eine Proteinreduktion von 80 % in HeLa-Zellen als erfolgreich. Als Nebeneffekt dieser Verminderung wurde eine Reduktion von SR $\alpha$  festgestellt, was auf eine Destabilisierung der peripheren Rezeptorkomponente durch den Verlust an SR $\beta$  hinweist. Für ERj6 und PRL wurde ein Beteiligung am ER Import nachgewiesen, wohingegen die Experimente zeigten, dass ERj3 unabhängig vom SR-Komplex transloziert wird. Weiterhin bewirkte die Depletion von Sec63 eine Minderung der Translokationseffizienz von ERj6 und PRL, was auf seine zentrale Rolle während des Transports der beiden Substrate in das ER hinweist. Beide Vorstufenproteine zeigten zudem eine mögliche Insertion in die ER Membran, im Fall von ERj6 auch in Abwesenheit von Sec62. Weiterhin wurde nach Reduktion von Sec62 für den Vorläufer von ERj6 eine Akkumulierung im Zytosol und in der ER-Membran beobachtet. Dies deutet auf die Beteiligung von Sec62 an der Translokation von ERj6 und auf eine potentielle zusätzliche Funktion des Substrates als Membranprotein hin. Die Prozessierungsrate von ERj3-DHFR wurde durch Depletion von Sec62 reduziert, was auf seine Beteiligung am ER-Import hinweist. Des Weiteren bewirkte der Einsatz von MTX keine Veränderung im Translokationsverhalten von ERj3-DHFR als Hinweis auf seinen cotranslationalen Transport in das ER. Zum Transport von Apelin-DHFR wurde eine Abhängigkeit von Sec62, Sec63 und SR $\alpha$  nicht eindeutig nachgewiesen und weiterhin auch kein Hinweis zur co- oder posttranslationalen



Translokation erhalten. Die Depletion von TRAP $\beta$  bewirkte eine Minderung der Translokationseffizienz von Sil1, wobei der Effekt, wie auch für Sec63 und SR $\alpha$ , nicht signifikant war.

Sec62 zeigte eine Beteiligung am ER-Import von ERj6 in der späten Phase seiner Biogenese, wobei eine Funktion zur Inversion des Substrates, welches zunächst potentiell mit dem Kopf voraus in den Kanal gelangt, möglich erscheint. Eine ähnliche Funktion wird für Sec63 während der Translokation von PRL vermutet, welches den SRP-abhängigen Transport des Substrates unterstützt.

## ABSTRACT

In this work, the necessity of accessory proteins of the dynamic protein conducting channel Sec61 for the co- and post-translational transport of Apelin, ERj3, ERj6, PRL and Sil1 across the ER membrane was analysed. It was investigated whether Sec62, Sec63, the SR receptor or the TRAP-complex are involved in the efficient translocation of these model proteins. The influence of these accessory proteins on targeting and translocation of different precursors was investigated by siRNA based depletion in intact human cells. To uncover the precursor and processed protein forms of selected substrates and detect a translocation defect by the accumulation of the precursor, plasmid-driven expression combined with a proteasome inhibitor and tunicamycin was used. For localisation of the precursors of ERj6 and PRL in their intracellular environment, cells were permeabilised by digitonin and fractionated subsequently to carbonate extraction. Furthermore, a protease resistance assay was performed. To investigate a potential post-translational transport of the precursors of Apelin and ERj3, both proteins were used as DHFR fusion proteins in combination with siRNA based depletion as well as treatment with the inhibitor MTX.

The establishment of depletion of SR $\beta$  with appropriate siRNAs was successful as indicated by a protein level reduction of over 80 % in HeLa cells. Additionally, depletion of the  $\beta$ -subunit leads to a reduction of SR $\alpha$ , suggesting a destabilization of the peripheral receptor component by the loss of SR $\beta$ . For ERj6 and PRL a participation of SR complex was verified for their ER import, whereas the experiments provide no evidence for ERj3 to be dependent on. The depletion of Sec63 caused a reduction of translocation efficiency for ERj6 and PRL, indicating a central role in their transport into the ER. Both precursors showed the potential of being inserted into the ER membrane, in the case of ERj6 also in absence of Sec62. Furthermore, after a reduction of Sec62 an accumulation of the precursor in the cytosol and in the ER membrane was observed for ERj6. This observation reveals its participation in the translocation of the substrate and suggests an additional function of ERj6 as a membrane protein. The processing rate of ERj3-DHFR was reduced because of the depletion of Sec62 indicating its participation in the ER-import. Furthermore, usage of MTX caused no change in translocation behaviour of ERj3-DHFR, revealing its co-translational transport into the ER. For Apelin-DHFR the results hint on no significant involvement of Sec62, Sec63 or SR $\alpha$  and so far no further indication of its co- or post-translational translocation. Depletion of TRAP $\beta$  caused a decrease in translocation efficiency of Sil1, but these effect was not significant, neither for Sec63 or SR $\alpha$ .

Sec62 showed to participate in the ER import of ERj6 during a late stage of its biogenesis, whereat a function to invert the substrate is possible, which potentially enters the channel head first. Sec63 is supposed to function in a similar way during the translocation of PRL and to support the SRP-dependent substrate transport.

## 2 EINLEITUNG

Das Studium und die Frage nach dem Leben fasziniert die Menschheit bereits seit vielen Jahrhunderten. Bereits im 17. Jahrhundert wurden erste Vorreiter der heutigen Mikroskope gebaut „per vedere da vicino le cose minime“ (Galileo Galilei, 1624; um die kleinsten Dinge aus der Nähe zu sehen). Den Begriff der Zelle prägte 1667 Robert Hooke an Gewebe von Flaschenkork. Zahlreiche Weiterentwicklungen führten schließlich zum modernen Verständnis der Zelle als Bau- und Funktionseinheit der Organismen und wurde durch die Erkenntnisse von Virchow zur Entstehung der Zelle gefestigt [1]. Heute werden lebende Organismen als autonome, sich eigenständig vermehrende, chemische Systeme verstanden. Das Prinzip der Kompartimentierung stellt den größten Unterschied zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen dar, während das Umschließen des Zytoplasmas durch die Plasmamembran weiterhin alle Zellen auszeichnet. So gelingt höheren Lebewesen die Ausbildung von Organellen mit spezifizierten Funktionen, die untereinander über komplex gestaltete Transportsysteme kommunizieren und so miteinander verbunden sind. Eine zentrale Rolle spielt in diesem System das Endoplasmatische Retikulum, welches als Bindeglied zwischen Zytoplasma und Golgi-Apparat fungiert, und zusätzlich als Speicherort für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowie zur Synthese und Modifizierung zellversorgender Grundstoffe dient.

### 2.1 Aufbau und Funktionen des Endoplasmatischen Retikulums

Jedes Kompartiment einer eukaryotischen Zelle beinhaltet einen nur ihm eigenen charakteristischen Satz an Enzymen, die zur Funktionalität und damit zur Viabilität der Zelle unentbehrlich sind. In ihrer Gesamtheit verleihen die Proteine dem Organell seine charakteristische Struktur sowie seine funktionellen Eigenschaften. Dabei werden die entsprechenden Organellen von einer Phospholipiddoppelschicht umsäumt, die als Biomembran fungiert und über Mechanismen zum Import und Einbau von spezifischen Proteinen in ihr Inneres oder ihre Membran verfügt [2]. Die Bedeutung des Endoplasmatischen Retikulums zeigt sich im großen Anteil an der Gesamtmembranfläche, die in Eukaryoten etwa die Hälfte der Zelle einnimmt. Das ER umschließt den Zellkern in labyrinthähnlicher verzweigter Struktur aus Röhren, Bläschen und Zisternen und geht kontinuierlich in die Kernhülle über [3]. Die Unterscheidung von glattem und rauem ER erfolgt auf Grund ansässiger Ribosomen, die zytoplasma-seitig an die Lipiddoppelschicht assoziiert sind und die Spezialisierung zur Proteinbiosynthese bedingen [4, 5, 6]. Das ER repräsentiert ein signalübertragendes Organell, das in physikalischem und biochemischem Kontakt

zum Zellkern steht und kontinuierlich intrazelluläre Veränderungen wahrnimmt, wie Variation der Glukosekonzentration oder in der Calciumhomöostase, Hitzeschock, Hypoxie, Veränderungen in Proteinstrukturen durch genetische Defekte, toxische oder endogene Komponenten oder durch Proteinfehlfaltung [7].

In die Membran von 50 Å Stärke sind Proteine integriert, die zur Interaktion zwischen Kompartimenten dienen und gleichzeitig die Voraussetzung zum Transport schaffen [8]. Der Import und Export sichert die grundlegende Funktionsweise des ERs, welchem die posttranslationale Modifikation von Proteinen obliegt, was die Sekretion chemisch veränderter Moleküle und deren korrekte Direktionierung sichert. Das ER ist grundsätzlich an zwei Transportwegen beteiligt. Dies geschieht zum Einen um Proteine mit dem Zytosol auszutauschen und zum Anderen um diese weiter zum Golgi Apparat zu leiten, woran sich ein Transfer zu anderen Kompartimenten anschließt. Zusätzliche Funktionen des ER bestehen in der Übernahme des Großteils der Lipidbiosynthese zur Membranbildung der Zelle, sowie eines Speicherortes für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [4, 9].

## 2.2 Proteintransport in das ER

Der sekretorische Weg ermöglicht neu synthetisierten Proteinen korrekt und gezielt zu ihrem Bestimmungs- und Wirkungsort transportiert zu werden, um die Struktur und Funktion der Zellen zu erhalten. Er gliedert sich in drei Phasen, die das Andocken des Vorläuferproteins an der Membran, die Insertion in die Translokopore und schließlich das Austreten des reifen Proteins aus dem Kanal in das Lumen des ER umfasst [10]. Ob der Transport während oder erst nach der Translation einsetzt, ist abhängig vom jeweiligen Substrat und an komplexe Mechanismen gekoppelt. Die Substrate umfassen Transmembranproteine zum Einbau in die Lipiddoppelschicht des ER und Proteine, die ins Lumen prozessiert werden und entweder ER-resident oder sekretorisch sind [5].

Die Translokation eines Proteins setzt eine N-terminale Signalsequenz voraus, die substratspezifisch ist und von entsprechenden Erkennungs- sowie Direktionsfaktoren gebunden wird, um das Protein zunächst zur Membran zu bringen und dort durch den Transportkanal in das Lumen des ER zu translozieren. Dies erfordert Rezeptoren zur Regulierung des Öffnungsmechanismus der Translokopore. Für integrale Membranproteine ist weiterhin eine spezielle Stop-Transfer-Sequenz notwendig, die zur lateralen Öffnung des Kanals führt und die Insertion in die Lipiddoppelschicht ermöglicht [5, 11]. Nach der Freisetzung des Proteins in die Translokopore durch die Rezeptoreinheiten, können diese neu binden und den nächsten Zyklus einleiten. Entgegen der Erwartung von Blobel *et al.* aus dem Jahre 1975 wird der Kanal nach der Translokation nicht auf einfache Weise wieder geschlossen, sondern bedarf höherer Mechanismen. Zur Inhibition einer vorzeitigen Faltung des Proteins, das nur im

ungefalteten Zustand eine geeignete Konformation zum Transport besitzt, verfügt die Zelle über Chaperone, die durch Interaktion mit dem Protein, oder gegebenenfalls der naszierenden Polypeptidkette, die Einnahme der nativen Struktur unterbinden. Im Lumen des ER befinden sich weitere Chaperone, die dort nach erfolgreicher Translokation die Einnahme der funktionalen Proteinstruktur unterstützen [12, 13].

Die Faltung sekretorischer Proteine im ER, schlägt substratspezifisch zu 10-75 % fehl, was ihren Rücktransport ins Zytoplasma zur Degradation durch Proteasomen erfordert. Bis zu 80 % der Proteasomen einer eukaryotischen Zelle sind mit der nuklearen Hülle oder dem ER assoziiert. Kanäle, die in den Export involviert sind, können nicht gleichzeitig von Ribosomen besetzt sein. Diese konkurrieren mit Proteasomen um die Bindung an der ER Membran, was vermuten lässt, dass beide an die selbe Domäne des Proteinkanals binden [14].

Die Bedeutung zur Aufklärung von Proteintransportmechanismen und Auswirkungen von Fehlfaltung wird deutlich durch die Relation zu bestimmten Krankheitsbildern repräsentiert. Durch Dysbalance in der extrazellulären Proteinhomöostase (Proteostase) und konsequente Proteinaggregation entstehen degenerative Phänotypen von über 30 humanen Krankheiten, darunter auch die Alzheimer- und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, die auf Proteinefehlfaltung zurückzuführen sind. Sekretorische Proteine regulieren die Proteostase um die Bildung von Proteinaggregaten, die mit den entsprechenden Krankheiten assoziiert sind, zu verhindern. Dazu gehört unter anderem eine kleine Population von ER Chaperonen wie die Hsp70-Proteine [15].

### **2.2.1 Bedeutung der Signalsequenzen**

Subpopulationen neu synthetisierter Proteine werden voneinander sortiert und auf den richtigen Weg für ihren Export oder zum gezielten Transport in weitere intrazelluläre Membranen oder Kompartimente gebracht. Hierfür verfügen die Polypeptidketten über eine einzigartige Signalsequenz, die direkt nach dem Startkodon und somit N-terminal synthetisiert wird und als Erkennungsmerkmal zum Transport durch die ER-Membran dient.

Die Signalsequenz wird von erforderlichen Rezeptorproteinen erkannt um die Assoziation an die Membran, den Transport zum Translokationskanal oder dessen Öffnung zu ermöglichen. Hierbei stabilisieren verschiedene akzessorische Translokationskomponenten das Transportsubstrat zum effizienten ER-Import, wobei die Signalsequenz die Information trägt, welche Rezeptoren involviert sind [12].

Physikalisch und funktional unterscheiden sich die Signalpeptide in Länge, Hydrophobizität, Ladung, Aminosäurezusammensetzung und den Effekt auf die Substrattranslokation [16]. Die drei strukturell unterschiedlichen Domänen der Signalsequenzen können in positiv geladene N-Terminus (N-Region), eine zentrale hydrophobe Region (H-Region) und eine eher polare C-terminale Region (C-Region),

die die Abspaltungsseite für die Signalpeptidase darstellt, gegliedert werden [17]. Durch Variation verschiedener physikalischer Parameter der Signalsequenzen, konnte Von Heijne die Hydrophobizität der H-Region als leitendes Merkmal innerhalb der Signalsequenz zur Veränderung der Transporteigenschaften herausstellen, die als Eintrittskarte für den SRP-abhängigen oder -unabhängigen Transportweg gilt. Der hydrophobe Kern interagiert mit SRP, was bei ausreichend starker Bindung zur Interaktion mit dem Komplex aus naszierender Kette und translatierendem Ribosom führt, wohingegen dieser Kern bei Proteinen, die tendenziell den SRP-unabhängigen Weg nehmen, abgeschirmt zu sein scheint [17, 18]. Dabei führt eine steigende Hydrophobizität des Signalpeptids zur erhöhten Tendenz eines SRP-abhängigen Substrattransportes [19].

Zur Ermöglichung einer erfolgreichen Öffnung des Kanals spielt nicht nur die Signalsequenz eine Rolle, sondern teilweise liegt die benötigte Information in der reifen Domäne des Proteins. Daraus folgen einzigartige und substratspezifische Kombinationen der jeweiligen Signalsequenz und der entsprechenden reifen Domäne zur effizienten Anlagerung an der ER-Membran wie auch zur Regulation des Öffnungsmechanismus der Translokopore [18]. Die Signalsequenz stellt sich als essentiell für die Anlagerung des entsprechenden Substrates an der ER-Membran dar, dennoch beeinflusst die reife Domäne wie das Protein dorthin transportiert wird. Dabei ist auch eine direkte Interaktion der Signalsequenz mit der Kernkomponente des Translokons, der  $\alpha$ -Untereinheit des Sec61-Komplex, möglich, weshalb ein zusätzliches Korrekturlesen des Signalpeptids durch den Sec61-Komplex vor der Insertion in den Kanal notwendig wird [20].

Signalsequenzen sind substratabhängig abspaltbar oder permanent, wie im Fall von Signalankerproteinen, und werden nach erfolgreicher Insertion in den Translokankanal gegebenenfalls von der Signalpeptidase entfernt [19].

## 2.2.2 Transportwege

Sekretorische, ER-residente und Membranproteine in eukaryotischen Zellen werden an Ribosomen synthetisiert und währenddessen oder danach initial an der ER-Membran angelagert, wo sie an spezifischen Interaktionspartnern binden. Die Unterteilung der Transportwege zum ER-Translokon gliedert sich in einen SRP-abhängigen und -unabhängigen Weg, wobei eine klare Trennung der beiden Optionen sich schwierig gestaltet, da einige Vorläuferproteine Anteile an beiden Transportarten vereinen. Insbesondere bei unzureichender Bindung von SRP an die naszierende Kette ist eine entsprechende Zuordnung erschwert [21, 22]. Eine effiziente Bindung von SRP an die Signalsequenz ist Voraussetzung, um den Translationsarrest einzuleiten und den ribosomalen Komplex mit der naszierenden Polypeptidkette vor der Termination der Synthese zur ER-Membran dirigieren zu können. Andernfalls werden alternative Translokationskomponenten, wie Sec62 und Sec63, benötigt, um die Translokation

über den SRP-unabhängigen Weg zu ermöglichen, was den nahtlosen Übergang der beiden Transportwege demonstriert. Dabei stellt der Sec61-Komplex den Konvergenzpunkt beider Optionen dar. Wie die Proteine zur ER-Membran dirigiert werden ist daher uneinheitlich, aber alle für den ER-Import vorgesehenen Proteine gelangen zur Translokation zum Kanal [23]. Die Komplexität der Translokationsmechanismen spielt eine entscheidende Rolle, da die Signalerkennung die Genauigkeit des Sortierungsprozesses verbessert und damit die Effizienz der Auslese erhöht, was eine Translokation von falschen Proteinen vorbeugt [18].

### **2.2.2.1 SRP-abhängiger Transport**

In höheren Eukaryoten überwiegt der ER-Import von entsprechenden Proteinen in Abhängigkeit von SRP. Zunächst erfolgt die Synthese des Proteins von der mRNA zu einer Polypeptidkette mit einer Länge von 10-40 Aminosäuren, bevor SRP die Signalsequenz der naszierenden Kette erkennen und daran andocken kann [12, 24]. Verläuft dieser Prozess unter Ausbildung einer stabilen Bindung des Erkennungspartikels am RNC-Komplex ("ribosome-nascent chain complex"), erfolgt die Einleitung eines Translokationsarrestes, was die weitere Synthese zunächst blockiert [19]. Durch entsprechende Experimente mit Prolaktin als Transportsubstrat erwuchs erstmals die Vermutung einer funktionalen substratspezifischen Signalsequenz nahe des Aminoterminus. Weiterhin wurde die Funktion des Elongationsarrestes in der Inhibition einer vorzeitigen vollständigen Synthese eines sekretorischen Proteins im Zytosol gesehen, welches bei fehlender Interaktion mit Chaperonen, die das Protein in einem translokationskompetenten Zustand halten, nicht mehr ins ER gelangt [25].

In die ER-Membran sind SRP-Rezeptoren integriert, die den ribosomalen SRP-gebundenen Komplex erkennen, was zur Entlassung der Signalsequenz von SRP in einer GTP-abhängigen Reaktion führt und gleichzeitig den Translokationsarrest aufhebt. Der weitere Transfer der naszierenden Kette unter Bindung des Ribosoms an die Translokationspore geschieht SRP-unabhängig, womit der Erkennungspartikel nur als Direktionsfaktor zur Initiation benötigt wird [5, 13, 26]. Neben der Bindung an SRP sind weitere zusammenhängende Prozesse abhängig von der Signalsequenz. Zunächst erfolgt die Bindung des Ribosoms an den Sec61-Komplex, was zur Abdichtung des ribosomalen Tunnelausgangs mit der naszierenden Kette und dem Translokondient. Anschließend wird der Kanal in Richtung des ER Lumen geöffnet [18]. Nach der Insertion des Vorläufers in die Translokationspore, spaltet die Signalpeptidase die Signalsequenz ab, was im cotranslationalen Transportweg bereits gleichzeitig zur fortlaufenden Synthese der naszierenden Kette aus dem Ribosom erfolgt [20].

SRP ist in Eukaryonten nicht essentiell, dennoch zeigt sich die Bedeutung des cotranslationalen Transportweges unter Einbindung von SRP in der starken Konservierung der beteiligten Erkennungs- und Rezeptorkomponenten. Zudem kann für entsprechend abhängige Substrate bei Depletion der SRP-Rezeptor-Untereinheiten

ein Translokationsdefekt provoziert werden, ohne das Überleben der Zelle zu gefährden. Daher sind alternative Targetingrouten für funktional unentbehrliche Proteine gegeben, um die Funktionen der Zelle aufrecht zu erhalten [23].

### **2.2.2.2 SRP-unabhängiger Transport**

In Hefen dominiert zum Transport von Proteinen der posttranslationale Mechanismus, was auch für einige, überwiegend kleine Säugerproteine, wie Apelin und Statherin, ebenfalls beobachtet werden konnte [21, 27, 28]. Während die cotranslationale Translokation von sekretorischen Proteinen über membrangebundene Ribosomen verläuft, wurde auch eine Translokationsmaschinerie entdeckt, die an freien Ribosomen zytosolische Proteine erzeugt [12]. Die Translokation erfolgt außerdem unabhängig von der Bindung an SRP. Vollständig synthetisierte Proteine, die im Zytosol vorliegen, werden durch das Hsp40/Hsp70-Chaperon-System geschützt um deren Aggregation zu verhindern und halten das Protein in einem locker gefalteten und damit translokationskompetenten Zustand.

Während dieses Prozesses besteht eine wichtige Funktion in der Abschirmung des hydrophoben Kerns. Für den SRP-unabhängigen Transport entsprechender Substrate hat die reife Domäne einen deutlich größeren Einfluss als die Signalsequenz, was durch dessen Variation am Insektenprotein PpCecA ohne entscheidende Änderung der stattfindenden Transportart gezeigt werden konnte. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist zudem durch die Kettenlänge des Polypeptids gegeben. Durch die Verlängerung der Kette eines SRP-unabhängig transportierten Substrates konnte ein Verlust seiner Abhängigkeit von Sec62/Sec63 bewirkt werden.

Typische Komponenten wie Sec62 und Sec63, die hauptsächlich in SRP-unabhängigen Transporten mitwirken, können als beteiligte Proteine im cotranslationalen Weg, nach Beobachtung eines Transportdefektes eines Sec62/Sec63-abhängigen Substrates nach Depletion der  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors, nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Dies deutet erneut auf nicht klar trennbare Transportwege hin, und demonstriert die Nutzung beider Wege zum effizienten ER-Import mancher Vorläuferproteine. Gleichzeitig konnte an Hand von Tailanchor-Proteinen die Nutzung des SRP-Weges posttranslational dargestellt werden. Dennoch fehlen bisher Hinweise gegen die Hypothese Sec62- und Sec63-Involvierung als posttranslationalen Transportweg anzusehen. Für kleine Proteine konnte die Beteiligung von TRC40, ein Homolog zu Get3 aus Metazoen und Hefen, welches insbesondere für Tailanchor-Proteine von Bedeutung ist, genauso wie für Calmodulin als posttranslationale Transportkomponente gezeigt werden [20, 29].



## 2.3 Die Translokationskomponenten des ER

### 2.3.1 Der Sec61-Komplex als Proteinkanal

Die Proteinbiogenese involviert die Kernkomponente des Translokationskanals des ERs, der durch Assoziation zu einem Heterooligomer die wässrige Pore bildet. Der heterotrimere Komplex setzt sich zusammen aus drei Untereinheiten, wobei die  $\alpha$ -Komponente aus 10 Transmembrandomänen besteht, während Sec61 $\beta$  und Sec61 $\gamma$  die ER-Membran jeweils einmal durchqueren [30, 31, 32]. Der Sec61-Komplex ist homolog zum bakteriellen SecYEG Komplex, der evolutionär stark konserviert vorliegt [33]. Die Homologie umfasst die Membran-Topologie, hydrophile Reste innerhalb der membranumspannenden Umgebung sowie hydrophile Schleifen [13]. Der heterotrimere Membranproteinkomplex formt einen Zylinder mit quasipentagonaler Erscheinung und einer zentralen Pore, die durch Sec61 $\alpha$  geformt wird und die translozierenden Polypeptidketten kontinuierlich umgibt [14, 30, 33]. Diese Form gleicht einer Sanduhr, die in der Mitte eine Engstelle aufweist und somit den sogenannten „pore ring“ bildet. Die Struktur wurde für das bakterielle SecY beschrieben und für den Kanal in Säugern extrapoliert [34, 35]. Der Kanal wird durch eine einzige Kopie des heterotrimeren Komplexes gebildet, was in Säugern bestätigt werden konnte [35, 36]. Die Bildung der Kanalstruktur erfolgt durch die Bindung an ein Ribosom, wobei die Kanalöffnung durch die entsprechende Signalsequenz einer naszierenden Kette initiiert wird [33]. Mutationen führen zu Defekten im Translokationsprozess, der durch Akkumulation von Vorläufern bestätigt wurde. [13].

Prinzipiell liegen der Interaktion mit dem Sec61-Komplex zwei Funktionen zu Grunde, welche zum Einen das Targeting und zum Anderen die Translokation eines Transportsubstrates umfasst [13]. Der Translokationskanal fungiert als Bindestelle für den kurzen, hydrophoben Kern von Signalpeptiden, gleichzeitig wird hydrophoben Segmenten von Membranproteinen das laterale „gating“ erlaubt, um sie in die umgebende Lipiddoppelschicht zu entlassen. Der Sec61-Kanal zeigt neben dem Transport von Proteinen auch die Eigenschaft einen Ionenverlust zu verursachen. Sobald eine naszierende Kette den Tunnel besetzt, werden Maßnahmen gegen den Austritt von Ionen ergriffen, da die Pore eine ausreichende Größe besitzt, um sogar zwei Proteine gleichzeitig zu translokieren [5]. Das Translokationskanal wird auf einen Durchmesser von 100 Å geschätzt, sowie 20 Å für die Transmembranpassage von Substraten [4]. Die Bildung des Rings erfolgt erst in Anwesenheit eines Ribosoms, bleibt aber nach der Translokation bestehen. Zur Stabilisierung dienen unter anderem der TRAP-Komplex, der Signalpeptidase-Komplex oder der glykosilierende Oligosaccharyltransferase-Komplex, die am Sec61-Komplex auch nach Solubilisierung der ER-Membran assoziiert bleiben [37, 38]. Eine zusätzliche Funktion des Sec61-Komplexes, gemeinsam mit Sec63 und BiP, besteht in der Retrotranslokation, zur Beförderung von Proteinen aus dem ER Lumen zurück ins Zytosol [39].

## 2.3.2 Akzessorische Translokationskomponenten

### 2.3.2.1 Signalerkennung und Zielführung durch SRP und die SRP-Rezeptoruntereinheit

Die zentrale Komponente während der cotranslationen Zielführung zur ER-Membran stellt SRP durch seine Fähigkeit diverse Signalsequenzen zu binden und gleichzeitig zwischen Sequenzen mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften zu differenzieren. Die Funktion des Proteins als Erkennungspartikel des Signalpeptids war dabei namensgebend für SRP [24]. Das 11S Ribonukleoprotein setzt sich aus 6 Protein-Untereinheiten, die gemäß ihres molekularen Gewichtes unterschieden und benannt werden, sowie einer einzelnen 7SL-RNA zusammen und kann in 2 Domänen unterteilt werden.

Die S-Domäne wird gebildet aus dem heterogenen Dimer aus SRP68 und SRP72, SRP54 und SRP19, sowie den Helices 6-8 der SRP-RNA. Das Heterodimer SRP9/SRP14 sowie die 3' und 5' Enden der SRP RNA ergeben die Alu-Domäne, welche die Bindungsstelle für das Ribosom darstellt und entsprechend den Elongationsarrest bewirkt [40, 41, 42]. Diese Funktion erweitert das Zeitfenster zur Bindung an den SRP-Rezeptor durch Inhibierung des Erreichens einer kritischen Länge der Signalsequenz, die andernfalls bereits in eine Konformation faltet, in welcher die entscheidende Erkennungssequenz durch SRP abgeschirmt wird oder einen translokationsinkompetenten Zustand bewirkt [42, 43].

Die Bedeutung des 54 kDa schweren Proteins zeigt sich durch die direkte Interaktion mit der hydrophoben Signalsequenz einer naszierenden Polypeptidkette, sobald diese aus dem ribosomalen Tunnel austritt [44]. Ein ähnliches Homolog zur putativen GTP-Bindungsstelle konnte 1989 von Bernstein *et al.* auch in der  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors gefunden werden, mit dem Unterschied der Lokalisation am C-Terminus des Proteins. Er konnte die Beteiligung von GTP am initialen Schritt der Assoziation aneinander zeigen, sowie die entsprechende Interaktion zur Freisetzung des Erkennungspartikels von der Signalsequenz und vom membrangebundenen Ribosom. Die Methionin-reiche Region des SRP54 fungiert als Bindungsseite für Signalpeptide und zeichnet sich durch hohe Basizität und eine hohe Anzahl positiver Ladungen aus, die möglicherweise zur Neutralisation negativer Ladungen durch das Rückgrat der Nukleinsäuren fungieren [45, 46].

Nach der Bindung von SRP an die Signalsequenz erfolgt das Targeting zur ER-Membran durch Bindung des Partikels an den Rezeptorkomplex, der aus zwei Untereinheiten besteht [26]. Die membranintegrierte  $\beta$ -Untereinheit weist ein Molekulargewicht von 29,7 kDa auf. Das Membranprotein liegt in 2-fach Molariät gegenüber der daran assoziierten Komponente SR $\alpha$  vor, welches peripher im Zytosol lokalisiert ist und ein Molekulargewicht von 69,8 kDa besitzt [47]. Beide fungieren als Einheit um den Komplex aus naszierendem Polypeptid, translatierendem Ribosom und dem Erkennungspartikel zu binden und diesen so an der ER-Membran anzula-

gern um die Interaktion zwischen dem ribosomalen Komplex und dem Translokator zu ermöglichen [48]. Dabei koppelt die  $\alpha$ -Untereinheit an SRP54 des Signalerkennungskomplexes [44]. Ohne die membranständige Rezeptoreinheit fehlt die Möglichkeit zur Bindung von SR $\alpha$  an der Lipiddoppelschicht, was einen fehlerhaften Transport zur Folge hat [49]. Nach der erfolgreichen Übertragung der naszierenden Kette zum Translokationskanal löst SRP sich, durch Hydrolyse von gebundenem GTP, sowohl vom Ribosom als auch vom Rezeptorkomplex. Durch die Freisetzung des Signalpeptids wird die temporär unterbrochene Translation des Polypeptids fortgesetzt und die naszierende Proteinkette unmittelbar in das Translokator synthetisiert. Gleichzeitig öffnet sich die der Sec61-Kanal in Richtung des Lumen und ermöglicht so den ER-Import [4].

### 2.3.2.2 Sec62

Die Identifizierung von Sec62 und Sec63 als akzessorische Membranproteine um Sec61 erfolgte zunächst in Hefen. Die beiden Komponenten liegen dort gemeinsam mit Sec71 und Sec72 als Sec62/63-Komplex vor. Sec62 stellt ein integrales Protein mit zwei helicalen Transmembrandomänen und einem Molekulargewicht von 45,9 kDa dar. Sowohl der N-Terminus als auch das C-terminale Ende des Protein sind im Zytosol lokalisiert. In Hefen wurde auch zunächst entdeckt, dass ATP-unabhängig ein Sec62-Vorläufer-Komplex entstehen kann, ohne dass eine vorangehende Bindung des Vorstufenprotein an ein Ribosomen erforderlich ist, wozu aber eine intakte Signalsequenz benötigt wird. Gegenüber dem Homolog aus Hefen, ist Sec62 aus Säugern in der Lage an den ribosomalen Tunnel zu binden, was einem evolutionären Funktionsgewinn entspricht [22, 27, 32, 50].

Die Identifikation von Sec62 als beteiligte Translokator-Komponente zum posttranslationalen Transport wurde an Hand des Insektenproteins PreprocecropinA festgestellt, welcher nach beendeter Synthese, in Abwesenheit von SRP und Ribosomen sowie deren Rezeptoren, erfolgt. Da das Substrat aber auch mit Hilfe von SRP transportiert werden kann, zeigt sich erneut die schwierige Unterteilung von co- und posttranslationalen Weg allein auf Grund einer Beteiligung des Erkennungspartikels. Dabei zeigte sich die Involvierung der ribosomalen Bindungsseite von Sec62 zur Koordination des Substrates auf co- oder posttranslationalen Weg [51, 52].

Sec62 erfüllt innerhalb des Zielführungs- oder Transportprozesses vielfältige Funktionen wie die Beteiligung an der Kanalschließung, die Translokation des C-Terminus von Membranproteinen, die Membraninsertion und Orientierung von mäßig hydrophoben Signalankerproteinen sowie zur Sekretion kleiner Vorläufermoleküle, die unabhängig von SRP transloziert werden [32, 53]. Die Beteiligung von Sec62 am Transport von kleineren Proteinen, mit einer Aminosäuresequenz geringer als 160, sichert deren Sekretion bei unzugänglichem SRP-Weg. Lakkaraju *et al.* setzten eine Grenze zwischen 100-160 Aminosäuren für ein Protein, das beide Transportwege

nutzen kann. Die Korrelation schlägt bei manchen Substraten allerdings fehl, was das Längen-Kriterium nicht als unwesentliches aber unzureichendes Merkmal darstellt [21, 54].

Karzinome in Lunge, Prostata und Cervix sowie colorektale Tumore stehen in Zusammenhang mit der endogenen Überexpression des *SEC62* Gens, was sich durch Erhöhung des Migrationspotentials äußert, weswegen es als migrationstimulierendes Onkogen vermutet wird [54, 55].

### **2.3.2.3 Sec63**

Neben Sec62 befindet sich nahe des Translokationskanals in der ER-Membran ein weiteres integrales Protein. Sec63 weist eine lumenale J-Domäne auf, dessen negativ geladener C-Terminus mit dem positiv geladenen N-Terminus von Sec62 interagiert. Aus dieser Konfiguration ergibt sich die Vermutung der Bildung eines funktionalen Sec62/Sec63-Komplexes, dem ein Hefe-ähnlicher Aufbau zu Grunde liegt und die Beteiligung an Transportprozessen unterstützt. Die negativen Ladungen sind auf die Übertragung geladener Phosphatgruppen auf Sec63 zurückzuführen, was sich vertärkend auf die Wechselwirkung zwischen Sec62 und Sec63 auswirkt [56, 57]. Das 88 kDa schwere Sec63, auch ERj2 genannt, ein DnaJ-ähnliches Protein aus Bakterien mit 3 Membransegmenten, ist in Säugern konserviert, wobei sich die J-Domäne zwischen den Transmembranregionen TM2 und TM3 in das ER Lumen erstreckt. Diese Subdomäne von Sec63 ist homolog zum aminoterminalen DnaJ-Protein aus *E.coli*.

Die als Cochaperon fungierende Komponente ist affin zur Interaktion mit einem Hsp70-Protein des entsprechenden Organismus, wobei diese Wechselwirkung stark konserviert vorliegt und zur Rekrutierung der lumenalen Komponente zur naszierenden Kette dient, sobald dieses ins Innere des ERs importiert wird. So interagiert in *E.coli* DnaJ mit DnaK, welche Interaktion in Hefen und Säugern analog zwischen Sec63 mit Kar2 bzw. BiP zu finden ist [50, 56, 58]. In Hefen konnte diese Interaktion zur Öffnung der Translokationspore beobachtet werden [22]. Da das Hsp70-Protein BiP auch als Komponente zur Regulation des Öffnungsmechanismus des Translokationskanals identifiziert wurde, war diese Funktion auf Basis der funktionalen Interaktion mit Sec63 in Säugern, ebenfalls zunächst denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass Sec63 an der BiP-Rekrutierung beteiligt ist um die Proteintranslokation zu initiieren aber keine Auswirkungen auf die Schließung des Kanals hat [52, 59, 60].

Sowohl Mutationen von Sec62 als auch Sec63 verursachen in Hefen Transportdefekte, was auf deren Beteiligung am Translokationsprozess mit Sec61 hinweist. Die Involvierung des Membranproteins, sowohl am co- als auch am posttranslationalen Transport, konnte erstmals in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Auch in Säugern konnte eine substratspezifische Beteiligung von Sec63 am ER-Import von Vorläuferproteinen gezeigt werden, wobei der Verlust seiner Funktion zu polycystischen

Lebererkrankungen führen kann [13, 61, 62].

#### **2.3.2.4 TRAP**

Als essentielle Komponente zur Signalerkennung wurde vormals ein weiterer Proteinkomplex vermutet, der daher als Signalsequenzrezeptor (SSR) bezeichnet wurde. Durch seine Lokalisierung und Assoziation an der Translokationsseite des Sec61-Komplex wurden die Komponenten des heteroquartären Komplex in Translokationsassoziierte Proteine (TRAP) umbenannt, der sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist die größte Komponente des Komplexes mit einem Molekulargewicht von 32,2 kDa und bezeichnet ein integrales glykosiliertes Protein mit einer Transmembrankomponente. Das Glykoprotein TRAP $\beta$  zeigt eine molare Masse von 20,1 kDa mit ebenfalls einem Membransegment und liegt im Vergleich zu TRAP $\alpha$  in stöchiometrischen Mengen vor. Im Jahr 1993 gelang Hartmann *et al.* die Identifikation zweier weiterer Bestandteile des TRAP-Komplexes. Die  $\gamma$ -Untereinheit, 21,1 kDa, die die ER-Membran vier mal durchspannt, und TRAP $\delta$ , 19,0 kDa, mit einer Transmembrandomäne weist eine Disulfidbrücke auf [63, 64, 65].

Der Komplex interagiert zytosolseitig und auch lumenal, was durch proteolytische Spaltung der zytosolischen Domänen gezeigt werden konnte, indem die Bestandteile nicht dissoziierten. TRAP ist funktional involviert in den Proteintransport. Im Stadium des Post-Targtings beeinflusst es die Proteintranslokation zur unterstützenden Initiierung des Substrattransportes, wobei dem Komplex für den Prozess der Signalerkennung eine untergeordnete Rolle zuzukommen scheint. Die Abhängigkeit ist im Signalpeptid des jeweiligen Substrates festgelegt. TRAP liegt gegenüber dem Sec61-Komplex in stöchiometrischen Mengen vor, weswegen die Vermutung nahe liegt mit mindestens einer Kopie pro Sec61-Komplex vertreten zu sein [16]. Zusätzlich ist TRAP in die Topogenese von Membran-Proteinen in Säugern involviert. Das Protein TRAM und der TRAP-Komplex in Säugern gleichen funktional dem Sec62/Sec63-Komplex in Hefen [32].

### **2.3.3 Funktionale Proteine im ER Lumen**

#### **2.3.3.1 Der Nukleotidaustauschfaktor Sil1**

Da die Hsp70-Chaperone ohne Cofaktoren zur Bewerkstelligung einen effizienten Transportprozesses nicht ausreichend sind und um ihre Funktion zu gewährleisten, bedarf es zusätzlicher Faktoren, die durch die Stimulation der ATPase-Domäne die Bindungsaffinität für Substrate aktivieren [66].

Eine entsprechende Komponente zur Assistenz eines Hsp70 konnte durch Tyson *et al.* in Hefen identifiziert werden. Er charakterisierte Sls1 als interagierendes Protein mit der ATP-Bindedomäne von Kar2 und moduliert seine Aktivität im ATP-abhängigen Reaktionszyklus [66]. Später wurde ein entsprechendes Homolog auch in Säugern

gefunden, das zwar nur geringe Gemeinsamkeiten in der Sequenz aufweist, aber viele Eigenschaften mit Sls1 teilt. Dieses Protein wird Sil1, oder auch BAP (BiP-assoziiertes Protein), genannt und bindet an das Chaperon BiP der HSP70-Familie, welches im Abschnitt 2.3.3.2 kurz erläutert wird, über seine ATPase-Domäne. Dabei erfolgt keine direkte Assoziation des Nukleotids an Sil1, sondern das Cochaperon bewirkt die Konformationsänderung in der ATPase-Domäne von BiP [67]. Dies ermöglicht die Freisetzung von ADP an BiP sowie des gebundenen Substrates und weiterhin eine erneute Bindung von ATP. Somit leistet Sil1 einen Beitrag zur Regulation von komplexen Mechanismen im ER von Säugerzellen.

BAP wurde als ER-residentes Glykoprotein mit 2 Polyadenylierungssequenzen charakterisiert und stellt den ersten identifizierten Nukleotidaustauschfaktor für BiP in Säugern dar. Das Cochaperon setzt sich aus 461 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 52,1 kDa zusammen und trägt N-terminal eine ER-zielführende Signalsequenz sowie C-terminal ein ER-Retentionssignal, was seine Residenz im ER Lumen sicherstellt [68].

Eine Mutation von *SIL1* konnte in sogenannten „woozy“-Mäusen gefunden werden, die in spätem Stadium eine Ataxie entwickeln, welche begleitet wird von Verlust an Purkinje-Zellen in den Lappchen II-VIII, was zu Neurodegeneration mit Charakteristika von Apoptose und Autophagie führt. Sowohl BiP als auch Sil1 werden beide in cerebellaren Purkinje-Zellen exprimiert. Die woozy-mutierte Form von Sil1 ist in der Lage mit BiP zu interagieren, allerdings deutlich schwächer verglichen mit dem Wildtyp [69]. Ein ähnlicher Phänotyp konnte in Patienten nachgewiesen werden, die am Marinesco-Sjögren-Syndrom (MSS) leiden und ebenfalls in den meisten Fällen eine genetische Veränderung von *SIL1* aufweisen. Es handelt sich um eine autosomal rezessive Krankheit, die wegen zerebellarer Atrophie mit Purkinje-Zellverlust zu zerebellarer Ataxie führt, welches als Kennzeichen von MSS gilt. Weiterhin sind skeletale Abnormitäten, wie Zwergwuchs, sowie Dysarthrie oder Schielen mehrfach aufgetreten [70].

Die Mutation von Sil1 verhindert möglicherweise die korrekte subzelluläre Lokalisation durch Veränderung des C-terminalen ER-Retentionssignals. Die Folge ist ein Funktionsverlust des Proteins oder gar Degradation des Gens oder Proteins. Durch den potentiellen Verlust der Nukleotid-Austausch-Aktivität, wird die Funktionalität von BiP stark eingeschränkt, woraus für diese Mutation Fehlfunktionen resultieren, die durch eine abnorm erhöhte Zahl an fehl- oder ungefalteten Proteinen ER Stress hervorruft. Funktionales BiP ist am Öffnungsmechanismus des Translokationskanals, an der Faltung neu synthetisierter Proteine, deren anschließender Sekretion und an der Degradation fehlgefalteter Substrate beteiligt. Nicht nur die Proteinfaltungsmaschinerie sondern eine Beeinträchtigung der Kanalöffnung durch BiP, was die Proteintranslokation behindert, sind als mögliche Folgen denkbar, woraus eine fehlerhafte Entwicklung von Proteinen resultiert, die kritisch für Organe im Zusammenhang mit MSS sind und multisystemischen Störungen verursachen [71].

Als potentieller Angriffspunkt zur Entwicklung von Therapien wird die Kernhüllenintegrität des Phänotyps angesehen, der einen kritischen ethiopathologischen Faktor in neurodegenerativer Fehlfunktion darstellt [72].

### **2.3.3.2 ER-lumenale Chaperone**

Eine weitere Klasse wichtiger eukaryotischer Proteine zur Erhaltung der Funktionen im ER sind durch Stress-abwehrende Glukose-regulierte Proteine (Grp) gegeben. Sie reagieren sensitiv gegenüber Stress im ER, weswegen sie auch UPR-reguliert sind, der beispielsweise durch vermehrte Fehlfaltungen lumenaler ER Proteine auftritt. Sie wirken dort funktional zur Unterstützung der Prozessierung von Substraten als molekulare Chaperone. Zu dieser Proteinklasse gehören unter anderem Grp170 und Grp78. Dabei bezeichnet die Nummerierung das Molekulargewicht. Die genannten Eigenschaften wurden später für andere Mitglieder der Grp-Familie ebenfalls nachgewiesen [73, 74].

Grp78, das wegen seiner Bindungsfähigkeit an schwere Immunoglobulinketten auch BiP (Immunoglobulin heavy chain binding protein) genannt wird, repräsentiert ein multifunktionales, lumenales ER Protein, das sich, neben seinen Faltungs- und Substratbindungseigenschaften, durch Interaktion mit Sec63, auf Grund seiner hohen Affinität zu dessen J-Domäne, direkt an der Proteintranslokation beteiligt [75, 76]. Des Weiteren trägt das Hsp70-Chaperon, wie bereits erwähnt, zur Regulierung der Kanalschließung des Sec61-Translokons bei [77]. Seine Aktivität ist dabei bestimmt durch die Form des gebundenen Nukleotids ATP oder ADP, wodurch es auf entsprechende Austauschfaktoren angewiesen ist [66].

Neben seiner Rolle als Chaperon im Lumen des ER zeigt Grp170 Potential zur ATP-Bindung im lumenalen ER. Später konnte das Chaperon als zweiter Nukleotid-austauschfaktor neben Sil1 klassifiziert werden. Dies erklärt auch, wieso der Verlust der Sil1-Funktionen durch Mutation in entsprechenden Organismen nicht lethal ist, da Grp170 einen Teil der Fehlfunktion kompensieren kann [66, 78, 79].

Wie auch die Grp-Proteine ist die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als Immunoglobulin-assoziiertes Protein identifiziert worden. Als Mitglied der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen entfaltet das 57,1 kDa schwere Protein seine Funktion im ER Lumen und fungiert dort als Oxidoreduktase speziell hinsichtlich der Oxidation oder Reduktion von Disulfid-Bindungen, und vermag auch nicht-native Disulfidbindungen umzulagern. So verhilft es Substraten die korrekte Faltung und somit ihre Funktionsfähigkeit zu erreichen [80, 81, 82, 83]. Zusätzlich besitzt PDI die Fähigkeit sezerniert zu werden, um extrazellulären Disulfid-Austausch zu stimulieren [15].

### **2.3.4 Lumenale ERj-Domänen-Proteine**

Zur Unterstützung der Faltung von neu synthetisierten, fehl- oder ungefalteten Proteinen betreibt die Zelle ein effizientes Chaperon-System. Verschiedene Hsp40-

Proteine unterstützen die Faltung und Assemblierung von Untereinheiten in Hefen und auch in Säugern, indem sie an Peptide, naszierende Ketten und ungefaltete Substrate binden und diese zu ATP-gebundenem Hsp70 transportieren. Die Faltungshelfer der Proteinfamilie weisen N-terminale J-Domänen auf, wobei es sich um eine konservierte Region von 70 Aminosäuren handelt. Sie enthält ein HPD-Leitmotiv aus der Folge an Histidin, Prolin und Aspartat, welches die Stimulierung der ATPase-Aktivität von Hsp70-Proteinen induziert [84, 85, 86]. Solche ERj-Domänen Proteine können peripher oder integral in der ER-Membran vorliegen. Ein Beispiel für ein Membranprotein mit lumenaler J-Domäne ist ERj2, auch Sec63 genannt, welches Gegenstand des Abschnitts 2.3.2.3 war.

Zwei funktionale Vertreter von löslichen Proteinen mit ERj-Domäne, die dank ihres ER-Retentionssignals überwiegend lumenal vorliegen, sind durch ERj3 (40,5 kDa) und ERj6 (57,6 kDa) gegeben. Sie weisen eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten auf, was sich auch auf ihre vergleichbaren Funktionen innerhalb des ER als Faltungs- und Translokationshelfer auswirkt. Beide Proteine können am Sec61-Komplex assoziieren und sind an der BiP-vermittelten Kanalschließung beteiligt [60, 87, 88]. Ihre Substratbindedomänen werden vermutet die Rekrutierung von BiP zur lumenal lokalisierten Schleife 7 des Sec61 $\alpha$  zu ermöglichen und somit einen möglichen Mechanismus zur Schließung des Transportkanals zu initiieren. Des Weiteren zeichnet sich ihre essentielle Funktionalität innerhalb der Zelle durch ein negativ beeinflusstes Wachstum der Populationen nach Depletion der entsprechenden Gene aus [60, 89, 84]. Dennoch verfügen die beiden Cochaperone über eigene spezifische Funktionen.

#### **2.3.4.1 ERj3**

Die Involvierung des DnaJ-Homologs Scj1p an der Proteinfaltung in Hefen konnte 1998 bereits von Silberstein und Kollegen demonstriert werden. Einige Jahre später konnte auch in Säugern ein homologes lösliches Protein im ER Lumen identifiziert werden [80, 84, 90]. Später wurde seine Beteiligung an der Faltung fehlgefalteter Proteine und am Export zur Degradation von Proteinen gezeigt [91, 92]. Neben seiner Funktion als Cochaperon für BiP, zeigt sich das Glykoprotein ERj3 als bedeutende Komponente während der Antwort der Zelle auf ER Stress. Das Cochaperon bindet nicht nur an fehlgefaltete Proteine im ER Lumen, sondern auch im extrazellulären Raum, wodurch die Proteostase durch seine Co-Sekretion günstig beeinflusst wird [15, 84]. Unabhängig von seiner Bindungsfähigkeit an BiP über die J-Domäne, zeigt sich eine Dimerisierung von ERj3 zur Substratbindung als notwendig. Dabei erfordert die Freisetzung des Cochaperons vom Substrat eine produktive Interaktion von einem Protomer mit BiP zu dessen ATPase-Stimulation [85]. Zur Inhibierung der Aggregation oder Fehlfaltung bindet ERj3 direkt und unabhängig von BiP an das ungefaltete Substrat und dient dazu das Hsp70 zu rekrutieren. Die J-Domäne von ERj3 vermag die ATP-Hydrolyse von BiP zu stimulieren, wodurch dieses an



Affinität gewinnt. Es bildet sich ein heterotrimerer Komplex aus Substrat, Hsp40 und Hsp70, der sicher stellt, dass die nachfolgende Ablösung des Cochaperons, erst nach Assoziation des Substrates an BiP erfolgt [91, 93].

ERj3 weist eine kurze Signalsequenz von 22 Aminosäuren auf, die ungeladen und apolar ist, vergleichbar mit PreproCecropinA und Prionprotein, was einen möglichen Faktor im Signalpeptid zur Involvierung von Sec63 in den Transportprozess beinhaltet [52].

#### **2.3.4.2 ERj6**

ERj6 ist, gegenüber anderen murinen Gewebearten, in erhöhtem Ausmaß in der Leber und im Pankreas, sowie in Geweben von Mäusen höheren Alters, exprimiert. Der Verlust des Cochaperons bewirkt die Zerstörung von Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen, wodurch weniger Insulin zu Verfügung steht und Hypoinsulinemia ausgelöst wird. Die Konsequenz sind erhöhte Apoptose und die Entstehung von Diabetes Typ I und II [7]. Für humane Organismen zeigt der ERj6-Verlust nicht nur einen Diabetes mellitus Phänotyp, sondern auch multisystemische Neurodegeneration.

Wie auch ERj3 zeigt ERj6 eine bedeutsame Rolle zur ER-Proteinfaltung und als regulierende Komponente bei UPR, was in Zusammenhang mit entsprechenden verlinkten Krankheiten steht [94]. Für diese Funktionen sind die Wiederholungen von Tetratricopeptiden im C-Terminus verantwortlich, die nicht nur zur Interaktion mit dem hoch konservierten C-Terminus von Hsp70-Proteinen dienen, sondern auch zur Bindung an Kinasen zur Regulation von UPR [88]. Diese Domäne ist mutmaßlich auch an der Funktion zur Kanalschließung des Sec61-Komplex beteiligt [60]. Neben der Antwort der Zelle durch Aktivierung der UPR, besteht eine weitere Möglichkeit zur Verringerung der Last an fehlgefalteten Proteinen durch Degradation der entsprechenden Proteine. Als Schlüsselkomponente in diesem Prozess wurde ERj6 als zytosolisches Cochaperon angesehen.

Nachweisbare Querverbindungen an neu synthetisierten Substraten deuten auf eine direkte Interaktion von ERj6 an das ungefaltete Protein hin. Weiterhin konnte eine direkte Assoziation des Cochaperons an den Sec61-Kanal gezeigt werden, was seine Bedeutung im Translokationsprozess weiter hervorhebt [88]. Eine zunächst angenommene Funktion von ERj6 während der Degradation wurde widerlegt, indem sein Beitrag zur Entlastung nach ER Stress durch Faltung fehl- und ungefalteter Proteine gezeigt wurde [86]. Bei fehlendem ERj6 ist die Faltungskapazität herabgesetzt, was die phänotypischen Beobachtungen in Zellen und Tieren unter entsprechenden Bedingungen erklärt [95].

Zu diesem Ablauf schlugen Petrova *et al.* einen Mechanismus vor, in welchem ERj6 nach Aktivierung durch ATP-Hydrolyse an das Substrat bindet. Dieses wird an das Chaperon der Hsp70-Familie übergeben, unter Bildung eines intermediären heterotrimeren Komplexes der drei Komponenten. Dabei wird das Chaperon BiP durch die

J-Domäne des Cochaperons zur ATP-Hydrolyse stimuliert und somit aktiviert. Zur Übergabe des Substrates durch ERj6 an das Hsp70 erfolgt eine reziproke Regulation von BiP über die J-Domäne zur Dissoziation des Substrates vom Cochaperon. Das BiP-gebundene Substrat kann somit gefaltet werden [86].

## 2.4 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Absicherung sowie die Ergänzung bereits vorliegender Befunde zur Beteiligung der ER-Membranproteine Sec62, Sec63 und des SRP-Rezeptors (SR) am Transport der Vorstufen von Apelin, ERj3, ERj6 und Prolaktin in das ER von humanen Zellen. Ein zentraler Bestandteil war die Frage einer potentiellen Beteiligung von SR am Import der Vorstufen von ERj3 und ERj6 und einer möglichen posttranslationalen Translokation der Vorstufen von Apelin und ERj3. Hinsichtlich der Funktion des SR-Komplexes galt es zunächst eine Methode zur Depletion der  $\beta$ -Untereinheit von SR zu etablieren. Die zweite Fragestellung sollte durch Einsatz von DHFR-Fusionsproteinen und dem Hemmstoff MTX geklärt werden. Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass PRL in Abwesenheit von SR $\alpha$ , sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen, einen verringerten Transport zeigt [43, 44, 96]. Für Sec62 wurde keine Beteiligung am ER-Import von PRL festgestellt. Hingegen wurde für ERj6 und ERj3 keine Abhängigkeit von SR $\alpha$  in intakten Zellen, aber ein Sec62- und Sec63-abhängiger ER-Import beobachtet, was auf einen SRP-unabhängigen Transportweg hinweist [97]. Mit PRL als Kontrollsubstrat, sollte daher der Effekt der Depletion des SR-Komplexes auf die beiden ER-luminalen Substrate untersucht werden. Mittels *in vitro*-Studien wurde eine Beteiligung von SR $\alpha$ , Sec62 und Sec63 zum ER-Import des wildtypischen Apelin gezeigt.

Die Fragen sollten mittels siRNA-vermittelter Interferenz der jeweiligen Komponenten in HeLa-Zellen beantwortet werden. Dazu sollten die genannten Modellproteine durch Plasmidtransfektion exprimiert werden. Für die unterschiedlichen Modellproteine mussten jeweils zunächst das Vorstufenprotein und reife(s) Protein(e) im Westernblot identifiziert werden. Dazu wurden MG132 als Proteasominhibitor und Tunicamycin zur Hemmung der N-Glykosilierung eingesetzt. Darüber hinaus sollten die, gegebenenfalls akkumulierenden, Vorstufenproteine intrazellulär lokalisiert werden, um weitere Einblicke zur genauen Funktion der Komponenten am jeweiligen Transportprozess zu gewinnen. Hierzu wurden die Zellen mit Digitonin permeabilisiert, woran sich eine Carbonatextraktion bzw. Proteasebehandlung anschloss.

Auf Grund der Beobachtung eines verringerten Sil1-Gehaltes in TRAP-defizienten Zellen, war es ein weiteres Ziel eine mögliche Beteiligung des Translokon-assoziierten Komplexes am ER-Import des Substrates zu untersuchen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und zugehörige Software

Vertrieb	Produkt
Abimed	Gilson-Pipetten, Pipetman Concept 5-100 µl
Agfa	Curix 60 (Filmentwickler)
Aseptex	Molded Surgical Mask 1800 + NL
Bachhofer	Rollinkubator
Beckman	J2-MG (Zentrifuge), GS-6KR (Bactifuge), Optima L-80 (Ultrazentrifuge), Coulter™ Optima™ MAX-E 100.000 rpm (Ultrazentrifuge), Rotoren: J-Lite Tm, JLA-10.500, JA-20, Type 70 Ti, TLA 100.3; Zentrifugenröhrchen: Polycarbonate Centrifuge Tubes, Polyallomer 1,5 ml Reaktionsgefäße
BIORAD	Trans-Blot™ CELL (Elektrophoresezelle)
Brand	Glaspipetten, Plastikbrand Entsorgungsbeutel
Braun	Vasco™ Nitril white (Handschuhe), Injekt 20 ml (Spritze), Sterican® 0,9 x 70 mm(Kanüle)
Diamond®	ECO.Pack™ 10 µl + EASY.Pack™ 5000 µl Pipettenspitzen
DNASTAR	Lasergene SeqBuilder (Version 7.0.0)
Eppendorf	5436 (Thermomixer), 5415 C (Zentrifuge), 5415 R (Kühlzentrifuge), Reagiergefäß 2 ml
Fröbel Laborgeräte	Sterilbank, Rocky® (Wipptisch), Con-1000 Speed Vac, Con-Jet (Vakuumanlage)
Fuji Film	Thermal Imaging SystemFM-500
GE Healthcare	ImageQuant Software Version 5.1, Image Scanner III, Typhoon Trio™ (Fluoreszenz-Laserscanner), Typhoon Scanner Control Greenlaser (Version 5.0)
Gelaire Flow laboratories	TC72 (Sterilbank)
Greiner Bio-One	Cellstar® Zellkultur-Multiwellplatte 6 Well, Cellstar® TC Zellkulturflasche 250 ml (75cm <sup>2</sup> ), Zellkulturschalen ø6 cm + 3,5 cm
Heidolph	MR 3002 (Heizrührer)
Heraeus	B 5042 E (Inkubator), TL 12 (Trockenschrank)

Hirschmann	Pasteurpipetten (150 mm), pipetus® Akku (Pipettierhilfe)
HT infors	Schüttelinkubator
Invitrogen	Countess™ automated cell counter, Countess™ cellcounting chamber slides
Isotherm KGW	Dewargefäß, Stickstoff-Vorratsbehälter
Julabo	VC (Thermostat), 5 (Heizbad)
Konrad Benda	N90 LW 366 nm (UV-Lampe)
LG	PC
Liebherr	Kühl- und Gefriergeräte
LKB Instrument GmbH	Multistepper Pipette (0,6 - 60 ml)
Machery-Nagel	Faltenfilter ø150 mm + 70 mm
Memmert	BE 500 (Inkubator), UL 50 Trockenschrank
Merck	Universalindikator pH 0-14
Microsoft	Office 2007
Millipore Co.	MiliQ Plus (Wasseraufbereiter), QPak®1 (Säule), Immobilon-P PVDF-Transfermembran (0,45 µm Porengröße), MilliBlot™-Graphite Electroblotter II
Nikon Instruments	Eclipse TE 2000-S mit Hg-Lampe, Plan Flour 10x/0.30 Ph1 DL (Objektiv)
neoLab®	Isoliergefäß, Cat RM5 (Rollinkubator), Surgical Disposable Scalpels (Skalpelle)
Panasonic	Mikrowelle
Pechiney	Parafilm "M"
Peqlab	Vilber Lourmat Fusion SL (Imaging-Gerät), FusionCapt Advance Solo 4 16.11 (Software), NanoDrop® Spectralphotometer ND-1000, Software V3.3.0
Pharmacia Biotech	LKB Multi Temp II (Kühleinheit für Elektrophoresezelle), Electrophoresis Power Supply EPS-200/-600/-3500, Image Master® VDS
Roche	Lumi Imager F1
Sarstedt	3,5 ml Transferpipetten, Filtrationsvorsätze steril ø 25 mm (Porengröße 0,2 µm), Reagiergefäß 1,5 ml, Pipettenspitzen 1000 µl und 200 µl, Röhren 15 ml und 50 ml
Sartorius	BP61, ED5201 und LA420 (Feinwaagen)
Schleicher + Schuell Micro Science	Filterpapier ISP 2727
Schott	Laborglaskolben und -flaschen
Schütt	Bioclav (Autoklav)

Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Systec GmbH	DX-65 (Autoklav)
Thermo Fisher Scientific	Hettich HT4086 (-80 °Gefriertruhe), Nalgene® Rapid Flow Bottle Top Filter 500 ml, aPES membrane (Porengröße 0,2 µm) , ø75 mm (Filtereinheit), HERACell 150i (CO <sub>2</sub> -Inkubator)
VWR	Light-Duty Tissue Wipers (Tücher), Rührfische
Wenzel Gläsererei München	Glasplatten
Werkstatt Medizinische Biochemie Homburg	Elektrophoresekammern, Plexiglasröhren
Whatman	Whatman FP30/0,2 CA-S rotand (0,2 µm)
WTW	LKB Multi Temp II (Kühleinheit für Tankzelle)
Zeiss	47 12 02 - 9901 (Mikroskop), 10/0.22 46 04 01 - 9904 (Objektiv), KF 10x/18 46 04 26 (Okular)
Ziegara	Eismaschine

### 3.1.2 Enzyme, Chemikalien und Chemikaliensätze

Agfa	G 153 (Entwickler), G 354 (Fixierer)
Calbiochem	Protease Inhibitor MG 132, Tunicamycin
Carl Roth GmbH & co KG	LB-Agar, LB-Medium (Luria/Miller)
DIFCO	Bacto-Agar
Fermentas	Restriktionsendonukleasen und -puffer, DNA-Probenpuffer
Fluka	2-Propanol LC-MS ChromosolIV, DMSO
GE Healthcare	Trypsin EDTA (1x) 0,05 %/ 0,02% in PBS, Amersham Hyperfilm™ MP (Filme)
life technologies	Trypan Blue stain 0,4 %, Gibco™ PBS pH 7,2 (1x), Gibco™ Opti-MEM (1x) + GlutaMAX™-I (reduced serum medium), Gibco™ DMEM (1x) GlutaMAX™-I, Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)
Genomed	Jet Star 2.0 Plasmid Maxi Kit 20, Jet Star 2.0 Plasmid Purification MIDI Kit / 50
Merck KGaA	Dinatriumhydrogencarbonat, EDTA, Ethidiumbromid, Kaliumhydroxid, Magnesiumacetat, Natriumchlorid , Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Millipore	2-D Electrophoresis Bromphenol Blau
Promega	FuGene® HD Transfection Reagent
Qiagen	HiPerFect Transfection Reagent, siRNA Oligonukleotide
Riedel-de Haën	Kaliumacetat

Roche	Dnase1, Proteinase K
Roth	Agarose
Serva	Acrylamid 4x solution (40% w/v), Ammoniumpersulfat, Ammoniumsulfat, Harnstoff, HEPES, Magnesiumchlorid, Natriumdodecylsulfat in Pellets (research grade), N,N'-Methylenbisacrylamid (2x) (analytical grade), N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, Triton X-100, Sucrose
Sigma-Aldrich	Ampicillin, Kanamycin, $\beta$ -Mercaptoethanol M6250, Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)
Sigma life sciences	Fetal Bovine Serum (FCS)
Thermo Scientific	Super Signal <sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate 1000 ml Kit, GeneRuler DNA Ladder, PageRuler <sup>™</sup> plus prestained protein ladder
TSI	Sucofin Magermilchpulver
VWR chemicals	Glycin, Glycerol, Hydrochlorige Säure 37%
Wako Pure Chemical Industries LTD	Digitonin
ZChL	Ethanol 99%, vergällt mit 1 % PE, Essigsäure 99,8% reinst, Methanol 98% z. Synthese, Aceton
Zymo Research	ZR Plasmid Miniprep <sup>™</sup> -Classic

### 3.1.3 RNA Oligonukleotide

Die folgende Tabelle zeigt alle RNA-Oligonukleotide, die zur siRNA-vermittelten Depletion, wie unter 3.4.3.1 beschrieben, verwendet wurden. Sie wurden in lyophilisierter Form mit RNase freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zu einer Konzentration von 20  $\mu$ M verdünnt und in einer Endkonzentration von 20 nM eingesetzt. Die nachfolgend genannten Zielgene stammten aus *homo sapiens*. Da in manchen Experimenten mehrere siRNA gegen das gleiche Gen eingesetzt wurden, sind die zur Einfachdepletion verwendeten siRNAs mit (\*) gekennzeichnet. Zur Kontrolle wurde „AllStars Negative Control siRNA“ der Firma Qiagen genutzt, die keine Homologie zu einem bekannten Gen aus Säugern zeigt.

Tabelle 1: Überblick über die zur Depletion von Proteinen verwendeten siRNA-Oligonukleotide

<b>Name</b>	<b>Zielgen</b>	<b>Sequenz</b>
<i>SEC62</i> #1*	<i>SEC62</i>	GGCUGUGGCCAAGUAUCUUtt
<i>SEC62</i> UTR	<i>SEC62</i>	CGUAAAGUGUAUUCUGUACtt
<i>SEC63</i> #5 UTR*	<i>SEC63</i>	GTGGC/TAC/TTTGCCTTAAAtt
<i>SEC63</i> #7	<i>SEC63</i>	CAGCUUUAGUUUUAGCAAAtt
<i>SRPRA</i> #2	<i>SRPRA</i>	CTGGACAAGATGCGTGATCATct
<i>SRPRA</i> #3 UTR*	<i>SRPRA</i>	CACCAGAGCTTTGCTAATAATta
<i>SRPRB</i> #1	<i>SRPRB</i>	ACGCTAGTCTTCTGGAAGTta
<i>SRPRB</i> #2	<i>SRPRB</i>	TAGCCTGCAATAAGCAAGAta
<i>SRPRB</i> #3*	<i>SRPRB</i>	ACAGTATGGGTCTGAAGAAta
<i>SRPRB</i> #4 UTR*	<i>SRPRB</i>	TAGTGTGTTCTTAGTGGTtat
<i>TRAPB</i> #2	<i>TRAPB</i>	AAGGGUAUCUAAAUGCAAAtt
<i>TRAPB</i> #3	<i>TRAPB</i>	CCUCGGCAACAAUUACUUAtt

### 3.1.4 Plasmide

Die Amplifikation der Plasmide in nachstehender Tabelle erfolgte im *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ . Nach der Isolation (Abschnitt 3.3.5) wurden die Plasmide mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in TE-Puffer (pH = 7,2) eingesetzt oder zu 100  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die nachfolgende Übersicht (Tabelle 2) zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Alle verwendeten Plasmide enthalten einen CMV-Promotor sowie eine Ampicillin-Resistenz.

Tabelle 2: Überblick über die zur Überexpression von gewünschter cDNA verwendeten Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3-IRES-GFP	Leervektor	OriGene
pcDNA3-ERJ3-IRES-GFP	Insertion der wildtypischen humanen ERJ3-cDNA und GFP-cDNA	J.Dudek, UdS
pCMV6-Apelin-DHFR-AC-IRES-GFP	Insertion der humanen Apelin-cDNA mit zusätzlichem DHFR-Tag	S. Haßdenteufel, UdS
pCMV6-ERJ3-DHFR-AC-IRES-GFP	Insertion der humanen ERJ3-cDNA mit zusätzlichem DHFR-Tag	S. Haßdenteufel, UdS
pCMV6-ERj6-AC-IRES-GFP	Insertion der wildtypischen humanen ERJ6-cDNA und GFP-cDNA	Diese Arbeit (siehe 3.3)
pCMV6-PRL-AC-IRES-GFP	Insertion der wildtypischen humanen PRL-cDNA und GFP-cDNA	Diese Arbeit (siehe 3.3)
pCAGGSM2-Sil1-IRES-GFP	Insertion der wildtypischen humanen Sil1-cDNA und GFP-cDNA	S.Cappel, UdS

### 3.1.5 Antikörper

Die verwendeten Peptidantikörper erkennen kurze Abschnitte des Zielproteins. Neben diesen wurden zur Immunisierung alternativ gereinigte Proteine verwendet. Von Dr. Martin Jung, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, wurden die entsprechenden Peptide synthetisiert, zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt und die entwickelten Antikörper aus den erhaltenen Seren isoliert. In nachfolgender Tabelle 3 sind die zur Detektion von Proteinen verwendeten primären Antikörper gelistet. Solche, die mit enzymatisch gekoppeltem Sekundärantikörper kombiniert wurden, sind in der Tabelle mit (\*) markiert, während die unmarkierten Antikörper mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt wurden. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich in der nachfolgenden Tabelle um den Einsatz von polyklonalen Peptidantikörpern.

Tabelle 3: Überblick über die primären Antikörper

Antikörper	Name	Charakteristik	Herkunft	Verdünnung
BiP*	950	gegen den N-Terminus von ER-lumenalem BiP	Kaninchen, UdS	1:500
DHFR*	DHFR	Proteinantikörper von DHFR	Kaninchen, UdS	1:250
ERj3*	336	gegen den C-Terminus von ERj3	Kaninchen, UdS	1:250



ERj6*	ERj6	Proteinantikörper gegen ERj6	Kaninchen, UdS	1:1000
Flag*	1341	gegen Flag	Kaninchen, UdS	1:500
Flag*	Flag	gegen MYK-DDK	Maus,	1:1000
Grp170	ABP 150	gegen den N-Terminus von Grp170	Kaninchen, UdS	1:1000
PDI*	PDI	Proteinantikörper gegen humanes PDI	Kaninchen, UdS	1:500
Sec62	262b	gegen den N-Terminus von Sec62	Kaninchen, UdS	1:1000
Sec63	N380	gegen den N-Terminus von Sec63	Kaninchen, UdS	1:500
Sil1	BAP	gegen den C-Terminus von Sil1	Kaninchen, UdS	1:500
SR $\alpha$	178a	gegen den N-Terminus von SR $\alpha$	Kaninchen, UdS	1:500
SR $\beta$	510	gegen den N-Terminus von SR $\beta$	Kaninchen, UdS	1:500
TRAP $\beta$	TRAP $\beta$	Peptidantikörper gegen den N-Terminus von TRAP $\beta$	Kaninchen, UdS	1:500
$\beta$ -Aktin	Aktin	Monoklonal, gegen $\beta$ -Untereinheit des Aktin	Maus, Sigma	1:5000

In Tabelle 4 sind die sekundären Antikörper aufgeführt, welche zur immunologischen Detektion von Proteinen Im Anschluss an den Western Blot eingesetzt wurden.

Tabelle 4: Überblick über die sekundären Antikörper

Antikörper	Markierung	Herkunft	Verdünnung
anti-Kaninchen	ECL <sup>TM</sup> Plex Cy5	Ziege, Sigma	1:1000
anti-Maus	ECL <sup>TM</sup> Plex Cy3	Ziege, Sigma	1:2500
anti-Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Ziege, Sigma	1:1000
anti-Maus	Meerrettich-Peroxidase	Ziege, Sigma	1:1000

### 3.1.6 Raue Mikrosomen

Raue Mikrosomen (RM) des Endoplasmatisches Retikulum (ER) sind kleine Membranvesikel. Als „Miniaturausgabe“ des ER ist die biochemische Zusammensetzung

der Mikrosomen annähernd identisch mit diesem Organell, wodurch funktionale Prozesse wie Proteinimport in das Lumen des ER und Glykosilierung von Proteinen weiterhin möglich sind. Dies erlaubt ihre Verwendung als Postivkontrolle von ER-Proteinen im Rahmen einer immunologischen Detektion. Ihre Präparation erfolgte durch Martin Jung, Universität des Saarlandes, nach einer etablierte Methode aus Hundepankreas [98, 12].

### 3.1.7 Bakterienstämme

Die verwendeten Plasmide zur Transfektion von Zelllinien wurden mittels eines *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstamms amplifiziert. In der vorliegenden Arbeit wird der *E. coli*-Stamm des Genotyps DH5 $\alpha$  eingesetzt:

(F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*)

### 3.1.8 Zelllinien

Die Durchführung der Experimente zur Manipulation intakter Zellen wurde mit der etablierten humanen Zelllinie HeLa (ATCC, NR. CCL-2<sup>TM</sup> ACC-57) realisiert. Es handelt sich um Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und entstammte ursprünglich dem erkrankten Gebärmutterhalsgewebe einer 31-jährigen Afroamerikanerin. Durch diese Biopsie gelang es erstmal eine permanente Zelllinie zu kultivieren [99].

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit DMEM + GlutaMAX<sup>TM</sup>-I der Firma Gibco<sup>®</sup> unter Zusatz von 10 % (v/v) Fetales Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin.

## 3.2 Analysemethoden der Proteinbiochemie

### 3.2.1 Präparation von Zellysat

Adhärente HeLa-Zellen wurden nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Kulturschale gelöst und mit Kulturmedium resuspendiert. Nach der anschließenden Zellzählung mittels Countess (Abschnitt 3.4.2) wurden die Zellsuspensionen für 3 min bei 3000 rpm pelletiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets mit PBS noch einmal resuspendiert sowie erneut unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde die Konzentration mit Lysepuffer auf 12.500 Zellen/ $\mu$ l eingestellt und für 30 min bei 37 °C auf dem Thermomixer unter ständigem Schütteln inkubiert. Den Proben wurde ein Viertel des Volumens 5-fach Lämmli-Probenpuffer zugesetzt und diese somit zu einer Endkonzentration von 10.000 Zellen/ $\mu$ l verdünnt. Schließlich wurden die Zellysate

für 10 min bei 56 °C denaturiert. Die präparierten Zellhomogenate wurden bei –20 °C eingefroren oder nach kurzer Zentrifugation sofort zur SDS-PAGE (Abschnitt 3.2.2) verwendet.

<u>Lysepuffer (10x):</u>			<u>Lämmli-Probenpuffer (5x):</u>		
100	mM	NaCl	300	mM	Tris/HCl, pH 6,8
100	mM	Tris/HCl; pH 8,0	50	% (v/v)	Glycerin
30	mM	MgCl <sub>2</sub>	10	% (w/v)	SDS
5	% (v/v)	Nonident P40	0,01	% (w/v)	Bromphenolblau
			25	% (v/v)	β–Mercaptoethanol

Zur Verwendung des Lysepuffers (10x) als Arbeitslösung wurde dieser 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt und mit PMSF (EK 100 µM), DNase (0,025 µg/µl) sowie einer PLAC-Lösung (pH 7,3; EK 1:100.000) frisch angesetzt. Die PLAC-Lösung besteht aus je 3 mg/ml der Proteaseinhibitoren Pepstatin A, Leupeptin, Antipain und Chymostatin, gelöst in DMSO.

### 3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine wesentliche Methode zur Auftrennung von Proteinmischungen besteht in der gelelektrophoretischen Separation in modifizierter Form nach Lämmli [100]. Der Vernetzungsgrad des Trenngels wird in Abhängigkeit des Molekulargewichtes des zu analysierenden Proteins gewählt.

Die Gele werden nach dem folgenden Schema (Tabelle 5) zwischen zwei, durch Abstandshalter (0,1 cm) getrennte, Glasplatten gegossen. Für kleinere Gele der Größe 14 cm x 11 cm (B x H) wird eine Abdichtung durch ein Bodengel bestehend aus 2 %-iger (w/v) Agarose erreicht. Um eine größere Trennstrecke, falls erforderlich, zu ermöglichen wurde ein Polyacrylamidgel der Maße 35 cm x 27 cm angefertigt, welche das 5-fache Volumen der in Tabelle 5 gegebenen Mengen umfasst. Als Bodengel dient in diesem Fall ein Gel mit 20 % (v/v) Acrylamidanteil.

Die auspolymerisierten Gele wurden in der Elektrophorese-Kammer eingefasst und beide Elektrodenkammern mit Elektrophoresepuffer befüllt, bis beide Seiten des Gels ausreichend bedeckt waren. Die präparierten Zellysate (Abschnitt 3.2.1) wurden erneut, für den Fall des vorangegangenen Einfrierens, kurz auf 56 °C erhitzt und bei 3000 rpm für wenige Sekunden zentrifugiert. Eine definierte Menge der Proben wurde in die Geltaschen pipettiert und zusätzlich ein Größenstandard, Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, zum Größenabgleich der Proteine aufgetragen. Zur Durchführung der elektrophoretischen Trennung wurde für kleine Gelsysteme eine Stromstärke von 5 mA bei einer Laufzeit von 16 h eingestellt, während die großen Gelsysteme für 24 h bei 25 mA betrieben wurden.

Markerproteine wurden stets über ein kleines 12,5 %-iges Gel getrennt, ebenso wie das Transportsubstrat Sil1. Die übrigen Proteine wurden zur besseren Auftrennung

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung von Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen

AA-Konzentration Lösungen	Trenngel			Sammelgel	Bodengels
	10 %	12,5 %	15 %	5 %	20 %
40 % (w/v) Acrylamid (ml)	3,75	4,69	5,63	0,9	20
2 % (w/v) Bisacrylamid (ml)	1,0	1,25	1,5	0,24	2,67
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (ml)	4,0	2,86	1,67	5,01	16,6
1,875 M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	6			-	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-			0,9	-
10 % (w/v) SDS (µl)	150			72	400
TEMED (µl)	5			10,5	100
AMPS (µl)	45			67,5	200
Gesamtvolumen (ml)	15			7,2	40

des Vorläufers mittels großen Gelen getrennt. Dabei werden PRL und Apelin-DHFR auf 15 %-ige Gele aufgetragen, dagegen wurde für ERj3, ERj3-DHFR und ERj6 jeweils ein Polyacrylamidgel von 10 % verwendet. Die kleinen Gele wurden mit je 300.000 Zellen, während die Großen mit 450.000 Zellen beladen wurden.

Elektrophoresepuffer SDS-PAGE (5x):

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

### 3.2.3 Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

Zur immunologischen Detektion der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels SDS-PAGE, ist ein Transfer auf eine PVDF-Membran unter Immobilisierung der Polypeptidketten notwendig [101].

Um die Übertragung der Proteine auf die Membran zu ermöglichen, muss diese zuvor mit Methanol benetzt und damit aktiviert werden. Gleichzeitig wurde das Polyacrylamidgel nach Lösen von der Glasplatte im gleichen Puffer für etwa 10 min inkubiert.

### 3.2.3.1 Transfer in der Halbtrockenzelle

Hydrophobe Wechselwirkungen zwischen transferierten Polypeptiden und der Membran halten die Proteine zurück und verhindern ein Weiterwandern. Je kleiner die Proteine sind, desto wahrscheinlicher sind aber unzureichende Interaktionen, die zum Verlust von übertragenen Proteinen führen können. Die Verwendung der Halbtrockenzelle (Semi-Dry Blot; SDB) eignet sich daher für kleine Proteine sehr gut, da sie mit kurzen Blotzeiten auskommt und das Risiko des Verlustes reduziert. Ein weiterer Vorteil in dieser Methode besteht in der geringen Menge an benötigtem Transferpuffer. Für den Aufbau wurde die Anode mit Puffer befeuchtet und mit einem Filterpapier belegt. Weiterhin wurden zunächst die Gelmatrix, die aktivierte Membran und ein weiteres feuchtes Filterpapier geschichtet und die Luftblasen entfernt. Die Apparatur schloss mit der Kathode und wurde beschwert, um einen gleichmäßigen Druck zu erzielen. Die Elektrophorese erfolgte für 2 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup>.

Sofern nicht anders angegeben, wurde ein Halbtrockenblotverfahren nur zur Unterscheidung der Substrate ERj3-DHFR, Apelin-DHFR und ERj6 angewandt. Für alle übrigen Studien wurden der Western Blot in der Tankzelle durchgeführt.

#### Transferpuffer SDB:

20	% (v/v)	MeOH
20	mM	Tris
150	mM	Glycin

### 3.2.3.2 Transfer in der Tankzelle

Bei der Übertragung im Nasszellensystem wurde ein kühlbarer Tank verwendet, in welchem Transferkassetten vertikal fixiert und gänzlich mit Transferpuffer bedeckt sind. Zur Vorbereitung wurden die zugehörigen getränkten Schwämme sowie größengerechte Whatman-Papierstücke gemeinsam mit der Membran in ein mit Puffer befülltes Gefäß gelegt. Die Nasszellenkassette wurde zügig in der nachstehenden Reihenfolge, luftblasenfrei geschichtet: Schwamm, Whatman-Papier, Gelmatrix, Membran, Whatman-Papier, Schwamm. Die Kassette wird so im mit Puffer befüllten Tank platziert, dass die Membran sich zwischen Gel und Anode befindet. Bei 15 °C und 400 mA Stromstärke wurden kleine Gelmatrizen für 3 h und Große für 6 h angeschlossen.

#### Transferpuffer (1x):

96	mM	Glycin
12,4	mM	Tris/HCl

### 3.2.4 Immunologische Detektion von Proteinen

Zur Absättigung der unbesetzten Proteinbindungsstellen der Blotmembran, wurde diese zunächst mit einer Blockerlösung versetzt. Hierzu wurde die Membran im feuchten Zustand im direkten Anschluss an den Western Blot in eine Plexiglasrolle platziert und für 10 min mit einer Blockierlösung, bestehend aus TBS-T-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver, rollend inkubiert. Anschließend wurde diese verworfen und durch eine Lösung des primären Antikörpers ersetzt, der in Blockierlösung laut Tabelle 3 in der gewünschten Verdünnung angesetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C wurde 4 mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die nachfolgende Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte für 60 min auf einem Rollinkubator, im Fall der Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten Markers unter lichtgeschützten Bedingungen. Unter Verwendung von je 2 mal TBS, gefolgt von TBS-T für je 5 min, wurde die Membran erneut gewaschen.

Bei Verwendung des Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch aus Meerrettich-Peroxidase-Puffer und Luminol/ „Enhancer“ des Chemolumineszenzkits Super Signal® West Pico versetzt und, falls nicht anders angegeben, mit Hilfe des Imaging-Systems Lumi Imager F1 oder Vilber Lourmat Fusion SL detektiert. Alternativ wurde die behandelte Membran in eine lichtgeschützte Kassette eingespannt und die Schwärzung eines Röntgenfilms durch Substratumsatz mittels Entwickler der Firma Agfa sichtbar gemacht. Nach Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern wurde die Membran zunächst vollständig getrocknet und anschließend durch den Typhoon Trio™ Scanner eingelesen. Die Erfassung von anti-Maus-Cy3 erfolgte bei 580 nm, während anti-Kaninchen-Cy5 bei 670 nm eingelesen wurde.

Waschpuffer TBS-T (1x):

11	mM	Tris/HCl, pH 7,4
154	mM	NaCl
0,05	% (v/v)	Triton X-100

### 3.2.5 Densitometrie

Die quantitative Erfassung der Farbmenge pro Fläche zur Ermittlung der Signalstärken wurde computergestützt mit Hilfe der Software ImageQuant (Version 5.1) und FusionCapt Advance Solo 4 16.11 realisiert. Die densitometrische Analyse erfolgte nach immunologischer Detektion mittels Chemilumineszenz- oder Fluoreszenzfarbstoff und die anschließende Datenverarbeitung mit Hilfe von Microsoft Excel2007.

## 3.3 Methoden der Molekularbiologie

### 3.3.1 Klonierungsverfahren

Restriktionsendonukleasen eignen sich zur gezielten Spaltung von DNA als initialer Schritt einer Klonierung. Mit passenden Enzymen, die in der multiplen Klonierungsstelle des Zielvektors schneiden, wird ein Transgen durch einen präparativen Verdau aus dem Ausgangsvektor isoliert. Ein analytischer Verdau dient zur Kontrolle der anschließenden Ligation.

Zur Spaltung der DNA-Konstrukte wurden 1 µg der Ausgangs-Vektoren von *PRL* und *ERJ6*, je 1 µl der Restriktionsenzyme *MluI* und *SgfI*, 1 µl des zugehörigen 10-fach Restriktionspuffers sowie 7 µl H<sub>2</sub>O für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 min bei gleicher Temperatur die Dephosphorylierung des Zielvektors mit Hilfe alkalischer Phosphatase. Der Verdau wurde mit 6-fach Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Größenmarker auf ein 1 %-iges Agarosegel 3.3.2 aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 mA bis das Insert aus dem Gel mittels Skalpell unter dem UV-Licht ausgeschnitten werden konnte. Das Gelstück wurde in ein vorgewogenes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut das Gewicht bestimmt. Die Extraktion des Inserts zu einem Endvolumen von 30 µl wurde mit dem QIAquick DNA extraction Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Gewinnung des geschnittenen und dephosphorylierten Zielvektors erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Zur Ligation wurden 1 µg des geschnittenen Zielvektors, 4 µg des extrahierten Transgens, 1 µl 10-fach Ligasepuffer und 1 µl Ligase T4 mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und bei RT für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in *E. coli*-Zellen transformiert, ausplattiert und selektiert. In diesem Fall enthielt der Ausgang-Vektor eine Kanamycin-Resistenz, während der Zielvektor eine Sequenz für Ampicillin beinhaltetete, weswegen die Ausplattierung auf ampicillinhaltigem Nährboden erfolgte. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Selektierte Einzelklone wurden in Reagenzgläser mit 2 ml LB-Medium und 0,1 % Ampicillin inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator gerollt. Die Präparation der Ansätze erfolgte mit dem ZR Plasmid Miniprep™-Classic der Firma Zymo Research und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Nach der Bestimmung der Konzentration der aufbereiteten Plasmide mittels NanoDrop® wurden diese einem analytischen Verdau zur Kontrolle unterzogen. Dazu wurden 0,6 µg Plasmid, 2 µl Restriktionsenzym-puffer und 2 µl Restriktionsendonuklease gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 h bei der für das Enzym angegebenen Temperatur und anschließend gegebenenfalls für 15 min bei 85 °C zur Inaktivierung der Enzyme inkubiert. Zur Vorbereitung auf die folgende Agarose-Gelelektrophorese wurde der Restriktionsverdau mit 5 µl 6-fach Probenpuffer versetzt.

### 3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Klonierung, werden die rekombinanten Plasmide gezielt mit Restriktionsenzymen gespalten und ihre Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dem Gel wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, was unter UV-Licht eine anschließende Dokumentation ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 1-%-ige Gele zur Trennung der DNA-Fragmente verwendet. Dazu werden 1,2 g Agarose mit 120 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, 1x) aufgekocht. Nach Abkühlen zur lauwarmen Lösung und Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid (EK 0,5 µg/ml) wurde die Mischung in eine vorbereitete horizontale Form gegossen, die einen Kamm zur Aussparung der Geltaschen enthält. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer positioniert, mit TAE-Puffer bedeckt und zur Auftragung der Proben der Kamm gezogen.

Die vorbereiteten Proben wurden neben dem Größenmarker auf das Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Stromstärke von 200 mA für 2 h wurden die DNA-Abschnitte der Größe nach aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht mit Hilfe von Image Master<sup>®</sup> VDS dokumentiert.

### 3.3.3 Medien und Platten zur Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Zur Kultivierung wurden die *E. coli*-Zellen in 100 ml LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Im Medium wurde außerdem das Selektionsantibiotikum in einer Konzentration von 100 µg/ml vorgelegt. Als Reaktionsgefäß wurde ein 1-l-Schüttelkolben gewählt, der genügend Möglichkeit zum Gasaustausch bietet.

Nährböden aus LB-Agar in Petri-Schalen, versetzt mit Selektionsantibiotikum, dienen zur Vereinzelung von Transformationsansätzen. Die Platten wurden nach unten stehendem Schema gegossen und die Suspension mit enthaltenem Plasmid darauf ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Zur Vorbereitung der LB-Amp-Platten wurden 35 g LB-Agar in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C wurde das Selektionsantibiotikum (EK 0,1 mg/ml) zugesetzt und die Mischung in 10 cm Petrischalen verteilt. Die LB-Agarplatten sind nach ihrer vollständigen Auskühlung verwendbar.

#### LB-Medium:

25 g LB-Medium  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
(Autoklavieren)



### 3.3.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA, wurden die entsprechenden Vektoren in kompetenten *E. coli* Zellen transformiert. Das Einbringen der Vektoren in den ausgewählten Bakterienstamm erfolgt nachdem diese zunächst auf Eis aufgetaut werden. Dazu wurde jedem 100 µl-Ansatz einer Kultur eines DH5α-Stammes 0,2 µg des zu amplifizierenden Plasmids zugesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein anschließender Hitzeschock für 90 s bei 42 °C ermöglicht die Aufnahme der DNA. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurde mit 500 µl LB-Medium aufgefüllt und die transformierten Zellen für 1 h auf dem Rollinkubator bei 37 °C inkubiert.

Das weitere Vorgehen kann je nach Reinheit des verwendeten Plasmids variieren. Bei Verwendung aufbereiteter Plasmid-DNA wurde der gesamte Ansatz in einen Schüttelkolben (gemäß Abschnitt 3.3.3) gegeben, welcher bereits mit 100 ml LB-Medium sowie dem Selektionsantibiotikum befüllt war. Im Fall einer Maxi-Präparation wurde dieser Ansatz auf ein Volumen von 500 ml Kulturmedium erhöht. Die transformierten Zellen wurden auf dem Schüttelinkubator über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA, die möglicherweise durch RNA oder andere Zellbestandteile verunreinigt ist, bietet sich die Möglichkeit zunächst Kolonien zu züchten, welche dann einzeln kultiviert werden können. Die transformierten Zellen wurden für wenige Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgezogen. Die resuspendierten Zellen wurden auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Einzelne Klone wurden mit Hilfe eines Holzstäbchen gepickt und zur Inokulierung, wie oben beschrieben, in den Schüttelkolben gegeben.

### 3.3.5 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Die Aufbereitung von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen erfolgte, je nach Größenordnung des Kulturansatzes, unter Verwendung des Jetstar Midi- oder Maxi-Kits der Firma Qiagen. Nach dem Aufschluss der Zellen, basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, wird der Überstand der pH-neutralisierten Suspension mittels eines Anionenaustauschers gereinigt. Die DNA bindet an die Säule und wird nach mehreren Waschschrritten durch stark salzhaltige Lösungen kompetitiv verdrängt und eluiert. Diese Methode erlaubt die Isolierung der DNA von genomischen Nukleinsäuren und Proteinen unter Erhalt eines hohen Reinheitsgrades und vermeidet den Einsatz giftiger Chemikalien wie Phenol bei gleichzeitig hoher Ausbeute. Daher eignet sich diese Art der Präparation gut zur Extraktion von Plasmiden für den nachfolgend vorgesehenen Einsatz in der Zellkultur.

Zur Durchführung wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Das erhaltene getrocknete Plasmid wurde in TE-Puffer aufgenommen und auf die gewünschte

Konzentration verdünnt.

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH=8,0

1 mM EDTA

### **3.3.6 Quantitative und qualitative Analyse isolierter Plasmid-DNA**

Zur Kontrolle des Reinheitsgrades der extrahierten Plasmide, wurde die optische Dichte der in TE-Puffer gelösten DNA bei 260 und 280 nm mit Hilfe des UV/Vis-Spektralphotometers NanoDrop® ND-1000 bestimmt. Dabei wird das Verhältnis aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> berechnet. Eine Kontamination durch Proteine wird durch erhöhten OD<sub>280</sub> angezeigt, während die Verunreinigung durch RNA einen höheren OD<sub>260</sub> verursacht. Ein Quotient von  $\approx 1,8$  steht für einen hohen Reinheitsgrad. Zusätzlich gibt der OD<sub>260</sub> Aufschluss bezüglich der Konzentration.

Nach Equilibrierung des Gerätes mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und Kalibrierung unter Verwendung des Lösemittels, kann durch Auftrag von 1 µl der Plasmidlösung dessen Konzentration und Reinheit bestimmt werden. Nach der Messung erfolgt die Einstellung zu 1 µg/µl.

## **3.4 Praxis der Zellkultur und -manipulation**

### **3.4.1 Kultivierung von Säugerzellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich HeLa-Zellen untersucht (Abschnitt 3.1.8), die in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit geeignetem Nährmedium, bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert wurden. Die Subkultivierung erfolgte jeweils nach 3 Tagen im Verhältnis 1:10. Um vergleichbare Bedingungen bezüglich der Experimente unter Beachtung der unterschiedlichen Passagen zu schaffen, wurden die Zellen am Tag vor Beginn eines Experimentes im Verhältnis 1:2 passagiert, um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase untersuchen zu können. Zur Ausdünnung wurden die adhärenenten Zellen zunächst vom Nährmedium befreit, mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml frischem DMEM aufgenommen, im gewünschten Verhältnis auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt und auf 12 ml Gesamtvolumen mit weiterem Zusatz von Kulturmedium aufgefüllt.

Zur Lagerung unter zellteilungsfreien Umständen wurden die Zellen in Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % DMSO sowie 20 % FCS ohne Zugabe von Antibiotikum in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um die Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden sie nach dem Auftauen zentrifugiert und das DMSO-haltige Kulturmedium

wurde ausgewaschen unter Wiederaufnahme in FCS- und Antibiotikum-haltigem Kulturmedium. Nach der ersten Subkultivierung wurde ein Teil der Zellanzucht mittels eines geeigneten Verfahrens auf Kontamination durch parasitäre Mycoplasmen getestet.

### **3.4.2 Zellzählung mittels Countess**

Zur Einstellung einer definierten Konzentration, wurden die Zellsuspensionen zu Beginn oder zum Ende eines Experiments in Falcon-Röhrchen oder Eppendorf-Reaktionsgefäße, überführt. Die Suspensionen wurden dafür mit Hilfe eines Vortexmischer bei niedriger Drehzahl gut durchmischt und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt.

Der Farbstoff erlaubt die Zählung von intakten Zellen unter Berücksichtigung der als nicht lebend registrierten, blau gefärbten Zellen. Die Zellzählung ist essentiell, um vor einem Experiment eine definierte Menge an vitalen Zellen einsetzen und aussäen zu können und zur Schaffung vergleichbarer Bedingungen sowie für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Des Weiteren ist die Zählung nach einem Experiment erforderlich um einerseits festzustellen, wie sich die Prozedur auf die Viabilität und Proliferation auswirkt, und andererseits, um nachfolgende Verdünnungen und Ansätze, wie zur Präparation von Zelllysate (Abschnitt 3.2.1), zu gleichen Konzentrationen einstellen zu können.

### **3.4.3 Transfektionsmethoden**

Eine mögliche Methode zur Untersuchung grundlegender molekularer Mechanismen in Zellen besteht in der Manipulation durch Transfektion. Ein verbreitetes chemisches Verfahren, die Lipofektion, ermöglicht die Einschleusung von DNA oder RNA in die Zellen mittels Bindung an oder Einbau in Liposomen, die leicht mit der Zellmembran fusionieren [102, 103].

#### **3.4.3.1 siRNA-basierte Säugerzellmanipulation**

Die RNA-Interferenz wird molekularbiologisch genutzt, indem definierte RNA-Moleküle in die Zelle eingebracht werden um die Translation spezifischer Gene planvoll zu stören und die Synthese der entsprechenden Proteine zu verhindern. Diese Methode zeigt sich als wertvolles Instrument gezielt Proteine zu depletieren um ihre Funktion zu studieren. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit zur gezielten Stilllegung von Genen assoziierter Proteine des ER-Translokons verwendet, was zur Analyse ihrer Rolle innerhalb des Organismus genutzt wird. Dieser Ansatz ermöglicht über die Depletion des Proteins mittels siRNA eine Verminderung seiner zellulären Konzentration. Hierzu wurde mit Hilfe des Reagenz HiPerFect (Qiagen), einer

Mischung von kationischen und neutralen Lipiden, eine Transfektion durchgeführt, die das Einbringen von 20-25 bp langen dsRNAs in das Zellinnere unterstützt.

Die Subkultur des Vortages (vgl. Abschnitt 3.4.1) wurde trypsinisiert und die Zellpopulation ausgezählt. Nach Aufnahme der Zellen in DMEM in geeigneter Verdünnung wurden pro 6 cm-Schale jeweils 520.000 Zellen in 5 ml Gesamtvolumen ausgesät. Eine Mischung aus 80 µl vorgewärmten OptiMEM™, 4 µg siRNA (EK 20 µM) sowie 20 µl HiPerFect, die zur Komplexbildung dient, wurde nach einer Inkubationszeit von 10 min zu den ausgesäten Zellen getropft. Die Inkubationszeit der siRNA betrug, sofern nicht anderweitig vermerkt, 96 h. Zur Komparation der Depletionseffizienz erfolgte nach 24 h ein Wechsel des Kulturmediums sowie eine erneute Behandlung zur Nachtransfektion unter Verwendung des beschriebenen vorgelegten Transfektionsansatzes. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und einem Gehalt von 5 % CO<sub>2</sub>. Je nach Fragestellung wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten weiteren Prozeduren unterzogen (Abschnitte 3.4.3.2 und 3.5) oder zur Aufarbeitung abgelöst.

Zur Verifizierung des verminderten Proteingehalts in Folge der Stilllegung des Gens wurde, nach Aufbereitung der Zelllysate, eine SDS-PAGE, gefolgt von Western Blot Analyse mit immunologischer Detektion durchgeführt (Abschnitte 3.2.1 - 3.2.5) und die Restproteinmenge des zugehörigen depletierten Gens sowie möglicher Einfluss, qualitativer und quantitativer Art, auf weitere Proteine bestimmt. Zusätzlich wurde zu jedem Experiment eine Kontroll-siRNA mitgeführt, welche keine Komplementation im humanen Genom erzielt. Der Ausschluss potentieller Sekundäreffekte individueller siRNA wurde durch Verwendung solcher Oligonukleotide ermöglicht, die komplementär an einen alternativen Bereich der gleichen mRNA binden.

### **3.4.3.2 Plasmidbasierte Säugerzellmanipulation**

Zur Erhöhung des Proteingehalts eines Substrates von Interesse wird eine Plasmidvermittelte Expression des kodierenden Gens hervorgerufen. Hierzu wurde stets eine Mischung vorbereitet, die das entsprechende Plasmid sowie ein Transfektionsreagenz enthielt, das eine gleichmäßige und effiziente Aufnahme der zirkulären DNA bei geringer Zytotoxizität ermöglicht. FuGENE® HD fungiert als Lipidtransfektionssubstrat indem es DNA komplexiert und somit die Aufnahme in die Zielzelle katalysiert. Ging der Plasmidtransfektion keine Depletion mittels siRNA voraus (Abschnitt 3.4.3.1), wurden zunächst je 1 Mio Zellen ausgesät, die vortags subkultiviert wurden (Abschnitt 3.4.1). Sie wurden in einem Gesamtvolumen von 5 ml Kulturmedium in 6 cm-Schalen aufgenommen, gut durchmischt und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium entfernt und durch 4,4 ml frischer Nährlösung ersetzt. Der Transfektionsansatz, bestehend aus 250 µl vorgewärmtem OptiMEM, 4 µg Plasmid-DNA und 16 µl FuGENE® HD, wurde in einem Reaktionsgefäß 10 min vorinkubiert und anschließend tropfenweise zu den

Kulturzellen pipettiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit, die je nach Plasmid, wie im Experiment angegeben, zwischen 16 und 48 h variiert, wurden die Zellen abgelöst, ausgezählt und standen der weiteren Verwendung zu Verfügung.

Erfolgte die Plasmidtransfektion nach einer vorherigen siRNA-Transfektion (Abschnitt 3.4.3.1), wurde der Zeitpunkt für die weitere Manipulation der bereits adhären Kulturzellen so gewählt, dass die vorgesehene Inkubationszeit zur Expression eingehalten werden konnte.

Zusätzlich können zur Stabilisierung zytosolischer Proteine, die durch Proteasomen degradiert werden, entsprechende Inhibitoren eingesetzt werden. Hierzu wurde der zytotoxische Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet, der für die letzten 8 h der Kultivierung, entsprechend nach der Plasmidtransfektion, in einer finalen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , nach Vormischung in OptiMEM, zugesetzt wurde.

Die Verwendung zusätzlicher Chemikalien bietet weitere Optionen zur Zellmanipulation. Tunicamycin dient als Inhibitor der N-Glykosylierung, zur Darstellung eines reifen Proteins ohne entsprechende posttranslationale Modifikation. Der Einsatz erfolgte mit einer Endkonzentration von 2,4  $\mu\text{M}$ . Methothrexat bewirkt die Faltung des DHFR-Anhangs entsprechender Fusionsproteine. Es wurde in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  appliziert. Beide Modifikatoren wurden ebenfalls 8 h vor der Ernte zu den Plasmid-transfizierten Zellen gegeben.

Zur Analyse eines Translokationsdefekts, nach siRNA-basierter Depletion von Sec61-assoziierten Komponenten und Plasmid-vermittelter Überexpression, wurden die Substrate hinsichtlich einer Vorläuferakkumulation untersucht. Hierzu wurde der Quotient aus den prozessierten Proteinformen und der gesamten detektierten Proteinmenge, der auch den Vorläufer mit berücksichtigt, gebildet. Die prozessierten Proteinformen umfassen alle detektierten Proteine, die keine Signalsequenz mehr tragen, aber möglicherweise posttranslational modifiziert vorliegen. Das Gesamtsignal berücksichtigt entsprechend alle prozessierten und unprozessierten detektierbaren Proteine.

$$\text{Prozessierung [\%]} = \frac{[\text{prozessierte Proteinform(en)}]}{[\text{Gesamtsignal}]}$$

Zur Ermittlung einer signifikanten Aussage wurde ein T-Test in Bezug auf die Kontrollzellen durchgeführt und im bekannten Sternesystem im entsprechenden Diagramm über dem zugehörigen Balken der depletierten Translokationskomponenten angegeben.

## 3.5 Methoden zur intrazellulären Lokalisierung von Proteinen

### 3.5.1 Präparation von semipermeabilisierten Zellen

Zur Vorbereitung der Kulturzellen auf anschließende Methoden nach Plasmid- oder siRNA-vermittelter Transfektion, kann eine Semipermeabilisierung der Zellen erforderlich sein. Diese Behandlung öffnet sukzessiv zell- oder organellumgebende Membranen zur gezielten Untersuchung verschiedener Funktionen. Hierzu wird zunächst das Tensid Digitonin eingesetzt, welches in der Lage ist permeable Zellmembranen zu erzeugen sowie Membranproteine zu solubilisieren. Die eingesetzte Konzentration beeinflusst dabei, ob nur die Plasmamembran der verwendeten Hela-Zellen oder Organellmembranen ebenfalls angegriffen werden.

### 3.5.2 Sequentielle Proteasesensitivität

Eine dienliche Methode zur Identifizierung der Lokalisation von Proteinen bietet der Einsatz von Proteinase K und der damit verbundenen Untersuchung entsprechend sensitiver Proteine. Der Zugang der Protease zum Zytosol wird durch Semipermeabilisierung der Zellen unter Zugabe von Digitonin erreicht. Der Einsatz einer genügend geringen Konzentration erhält dabei die Organellmembranen im intakten Zustand, wodurch zunächst nur der zytosolisch lokalisierten Proteine degradiert wird. Durch Zusatz von Triton X-100 als Detergenz werden verankerte Proteine aus der Zellmembranen gelöst ohne diese dabei zu denaturieren. Als Folge perforieren die Lipiddoppelschichten der Organellmembranen, wodurch die im Lumen lokalisierten Proteine dem enzymatischen Abbau durch Protease zugänglich werden.

Um dies zu realisieren und die entsprechenden Proben miteinander zu vergleichen, werden die jeweiligen Zellpopulationen digitonisiert und anschließend auf drei Ansätze aufgeteilt. Der erste enthält ausschließlich Sucrose, was der Stabilisierung der permeabilisierten Zellen durch osmotischen Druck dient. Da hier noch kein degradierendes Enzym zugegen ist, erlaubt diese Behandlung den Nachweis aller zellulären Proteine in ihrer natürlichen Form und dient damit als Kontrolle. Ein weiterer Anteil der semipermeabilisierten Zellen wird mit einer Lösung versetzt, die zusätzlich Proteinase K enthält und so den Abbau zytosolisch lokalisierter Proteine initiiert. Proteine, die durch Organellmembranen, wie das ER, geschützt sind, bleiben nach wie vor detektierbar. Im dritten Ansatz werden auch diese Phospholipiddoppelschichten durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 perforiert und somit der Weg ins Lumen des ER für die Protease eröffnet. Eine Detektion zeigt nach dieser Prozedur nur noch proteaseresistente Proteine. Durch den Vergleich dieser drei Proben wird eine lokale Zuordnung der proteasesensitiven Proteine ermöglicht.

Im Anschluss an die Zählung der kultivierten Zellen (Abschnitt 3.4.2) mit vorangegangenen Behandlungen (Abschnitt 3.4.3) wurden die gewaschenen Zellpellets (Abschnitt 3.2.1) in KHM-Puffer mit 0,88 µg /µl Digitonin vorsichtig zu einer Zellkonzentration von 40.000 Zellen/µl verdünnt. Zur Permeabilisierung wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und nachfolgend durch Zugabe von weiterem KHM-Puffer auf eine finale Konzentration von 20.000 Zellen/µl eingestellt. In 1,5 ml-Reagiergefäßen wurden jeweils 100 µl der drei nachstehend erläuterten Substratmischungen vorgelegt. Diese Mixturen wurden auf Basis von H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> angesetzt und wie folgt hergestellt:

Tabelle 6: Schema zur Herstellung der Protease-haltigen Lösungen zur sequentiellen Proteasesensitivität

			Sucrose	PK 100	PK 100 / Triton X-100
Sucrose	160	mM	✓	✓	✓
Proteinase K	100	µg/ml		✓	✓
Triton X-100	0,2	% (v/v)			✓

Die Zellsuspensionen wurden gut durchmischt und jeweils 2 Mio Zellen zu den vorgelegten Reagentien pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 0 °C, wobei die Proben nach je 10 min vorsichtig aufgeschüttelt wurden, um das Absetzen der semipermeabilisierten Zellen zu unterbinden. Durch Zugabe von 20 µl einer 200 mM PMSF-Lösung und Inkubation für 10 min bei 0 °C erfolgte die Inaktivierung der Protease. Anschließend wurden 80 µl 5-fach Lämmli zugesetzt und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Die Proben wurden kurz zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Zur Auswertung wurden Proteine mit bekannter Lokalisation, die als Marker dienen, über 12,5 % kleine Gele getrennt und nach Western Blot mittels geeigneter Antikörper gegen die entsprechenden Proteine (Tabellen 3 und 4) immunodetektiert. Die Substrate, die über Plasmidtransfektion überexprimiert wurden, wurden über die unter Abschnitt 3.2.2 angegebenen Gelsysteme getrennt. Nach immunologischer Detektion wurden Restproteinmengen der Markerproteine relativ zu ihrem Gehalt nach Behandlung mit der reinen Zuckerlösung berechnet. Die folgende Kalkulation dient als Beispiel zur Ermittlung des Restproteingehalt bzw. der Separierung eines Markerproteins nach Behandlung mit PK 100:

$$[\text{Restproteinmenge}] = \frac{[\text{Protein}_{\text{PK100}}]}{[\text{Protein}_{\text{Sucrose}}]}$$

### 3.5.3 Alkalische Carbonatextraktion

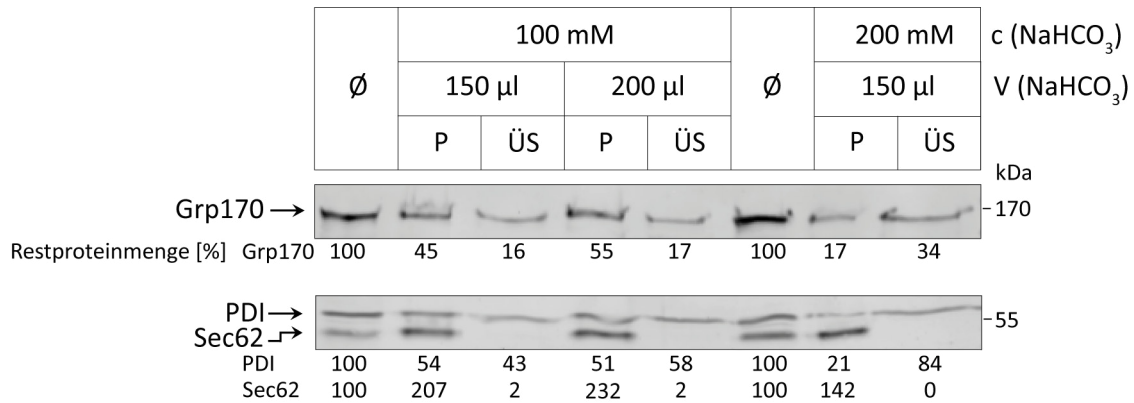
Zur Charakterisierung von Proteinen hinsichtlich ihrer Assoziation an bzw. Insertion in die Membran, bietet sich eine Behandlung mit alkalischer Carbonatlösung an. Proteine die um das ER lokalisiert sind und mit Membranproteinen des ER interagieren werden mit dieser Methode von solchen differenziert, die in die Membran inseriert sind. Nach einem gängigen Protokoll von Fujiki wird hierfür eine Salzlösung mit pH 11,5 verwendet [104]. Diese bewirkt die Dissoziation interagierender Proteinkomplexe unter Freisetzung der löslichen Proteine, welche nach der Fraktionierung im Überstand angereichert werden. Die integralen Membranproteine reichern durch die Zentrifugation der behandelten Zellen im Pellet an. Da Protein-Lipid-Wechselwirkungen von dieser Prozedur unbeeinflusst sind, bleiben Membranen somit intakt. Dazu wurden Zellen nach ihrer Ernte, gegebenenfalls nach vorangegangener Transfektion mit siRNAs oder Plasmiden, zentrifugiert. Die Behandlung mit Carbonat-Lösung erfordert eine Permeabilisierung mittels Digitonin, um den Zugang der Salzlösung in das Zellinnere und sogar das Lumen von Organellen zu ermöglichen.

Dazu wurden die kultivierten HeLa-Zellen pelletiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1 ml vorgekühltem KHM-Puffer vorsichtig resuspendiert, in eine 15 ml-Röhre überführt und mit weiteren 5 ml KHM-Puffer aufgefüllt. Zur Permeabilisierung der Plasmamembran erfolgte die Zugabe von 1,1 µl einer Digitoninlösung (40 mg/ml) je 1 Mio Zellen. Die Suspensionen wurden 5 min bei 0 °C inkubiert und sofort mit Hilfe von eiskaltem KHM-Puffer auf ein Volumen von 14 ml verdünnt. Die semipermeabilisierten Zellen wurden für 3 min bei 4 °C und 1200 rpm in der Bactifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein separates Reaktionsgefäß und mit Lysepuffer und Lämmli gemäß Abschnitt 3.2.1 behandelt. Die Zellpellets werden mit KHM-Puffer auf eine Konzentration von 40.000 Zellen/µl eingestellt. Von der Zellsuspension wurden 2 Mio Zellen in vorgekühlte Spezial-Reagiergefäße von Beckman überführt. Nach Zusatz von DNase zu einer finalen Konzentration von 0,08 µg/µl wurden die Zellen 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für einige Sekunden bei 14.000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einem Tuch vorsichtig abgesaugt. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte in einer Natriumcarbonat-Lösung, mit pH-Wert und eingesetztem Volumen nach Angabe im jeweiligen Experiment, mit anschließender Inkubation für 1 h bei 0 °C unter regelmäßigem vorsichtigem Aufschütteln der Zellen. Durch Zentrifugation, bei 68.000 rpm und 2 °C für 1 h im Vakuum und unter Verwendung des Rotors TLA 100.3 in der Ultrazentrifuge, erfolgte die Fraktionierung. Der Überstand wurde behutsam in ein frisches Reagiergefäß überführt und mit 50 µl 5-fach Lämmli versetzt. Das Membranpellet wurde umsichtig mit der Carbonatlösung gewaschen und überschüssige Flüssigkeit mit Zellstoff aufgesogen. Anschließend



wurde 200 µl 2-fach Lämmli zugegeben. Die aufbereiteten Proben wurden für 10 min auf 56 °C erhitzt, nachfolgend kurz abzentrifugiert und zur Lagerung bei -20 °C in flüssigem Stickstoff schockgefrostet.

Da die erfolgreiche Separierung und Fraktionierung der Proteine abhängig von der Konzentration und des eingesetzten Volumens ist, wurde zunächst ein Experiment mit unbehandelten HeLa-Zellen konzipiert, das diese beiden Parameter variiert.



**Abbildung 3.1:** Vergleich von Carbonatextraktionen unter verschiedenen Bedingungen. Am Tag nach der Subkultivierung, wurden HeLa-Zellen aus der Kulturflasche geerntet, pelletiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation. Die Zellpellets wurden in KHM-Puffer aufgenommen, mit weiteren 5 ml KHM-Puffer versetzt und gemäß 3.5.3 mit Digitonin permeabilisiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände in separate Reaktionsgefäße überführt und gemäß 3.2.1 behandelt. Die Zellpellets wurden mit KHM-Puffer auf 40.000 Zellen/µl eingestellt, wovon 2 Mio Zellen in vorgekühlte Beckman-Reagiergefäße überführt und mit DNase versetzt wurden. Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation und das Zellpellet wurde gewaschen. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte in 150 oder 200 µl einer 100 oder 200 mM Natriumcarbonat-Lösung mit anschließender Inkubation und Zentrifugation gemäß 3.5.3. Der Überstand wurde in ein frisches Reagiergefäß überführt und das Membranpellet mit der Carbonatlösung gewaschen und getrocknet. Die Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und inkubiert. Die Proteine wurden via SDS-PAGE (3.2.2) getrennt, mittels Western Blot auf eine Membran transferiert (3.2.3) und durch Einsatz von geeigneten Antikörpern zur immunologischen Detektion vorbereitet (Tabellen 3 und 4 und Abschnitt 3.2.4). Dargestellt Beispiele von Western Blots nach Detektion der Markerproteine PDI und Grp170 sowie Sec62 in den entsprechenden Fraktionen der permeabilisierten, unbehandelten Proben (Ø) und nach der alkalischen Extraktion im Pellet (P) bzw Überstand (ÜS). Zusätzlich sind ihre densitometrisch ermittelten Restproteinmengen, jeweils bezogen auf die unbehandelten Proben, angegeben.

In Abbildung 3.1 sind erhaltenen Signale der Markerproteine nach der Carbonatextraktion dargestellt. Dabei wurden einige Proben mit einer Konzentration von 100 mM bzw. 200 mM Carbonatlösung behandelt. Im Fall der niedrigeren Konzentration wurden zudem die Volumina zwischen 150 bzw. 200 µl variiert. Detektiert wurden die ER-luminalen, löslichen Markerproteine Grp170 und PDI sowie das integrale Membranprotein Sec62. Die quantifizierten Westernblots der unbehandelten Proben ohne Carbonat wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die folgenden Werte aus Pellet oder Überstand referenziert.

Für Grp170 ergibt sich nach Extraktion mit der niedrigeren Konzentration keine eindeutige Anreicherung im Überstand durch Einsatz eines höheren Volumens. Die höhere Konzentration von 200 mM bewirkt daegen die Detektion einer überwiegenden Proteinmenge im Überstand im Vergleich zum Pellet, was für eine

bessere Trennung spricht. Für PDI zeigen sich für die unterschiedlichen Volumina nach Extraktion mit 100 mM Carbonatlösung nur marginale Unterschiede, wohingegen für die höhere Konzentration eine deutliche Anreicherung im Überstand nachgewiesen werden kann, was eine effizientere Fraktionierung darstellt. Als integraler Bestandteil der ER-Membran gelingt es, Sec62 ausschließlich im Pellet nachzuweisen.

Die Verwendung der niedrigeren Konzentration für beide eingesetzten Volumina der Carbonatlösung reichert in diesem Beispiel einen hohen Anteil der beiden löslichen Proteine im Pellet an. Durch Erhöhung der Konzentration wird eine verbesserte Trennung erzielt. Daher wird für die weiteren Experimente mit der höheren Konzentration von 200 mM alkalisch extrahiert.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung der SR $\beta$ Depletion in HeLa-Zellen

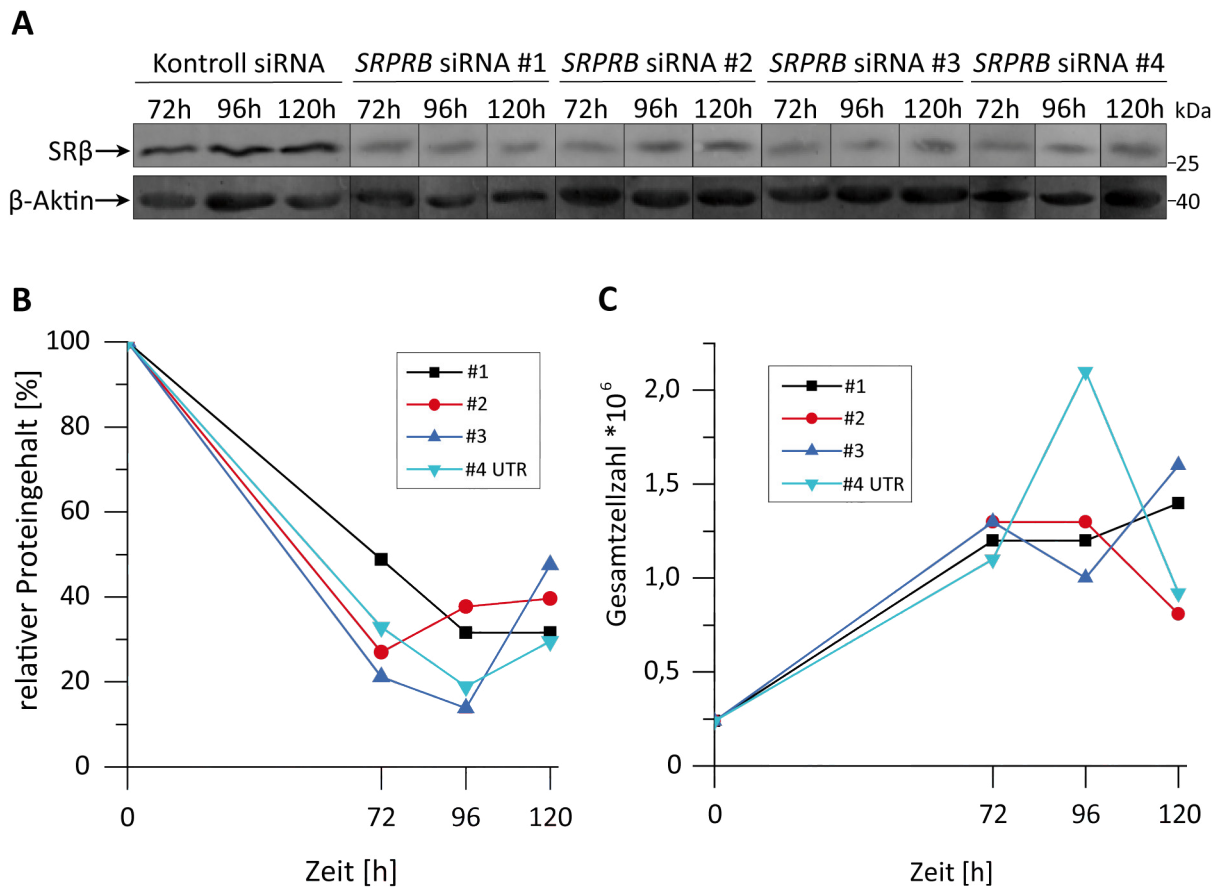
#### 4.1.1 siRNAs gegen *SRPRB* in HeLa-Zellen wurden etabliert

Der Verwendung einer siRNA geht eine Etablierung voraus, die die Bedingungen für Konzentration und Inkubationszeit optimiert. Parameter zur Bestimmung der besten Konditionen sind außerdem gegeben durch die Zellviabilität und die Effizienz der Proteinreduktion in Folge der Genstilllegung. In dieser Arbeit interessierte die Etablierung eines Modells zur Untersuchung des Einflusses der Reduktion der  $\beta$ -Untereinheit des SR-Komplex auf den ER-Import eines zu transportierenden Substrates. Nicht nur die Stilllegung des einzelnen Gens ist dabei von Interesse, sondern auch welchen Effekt die Reduktion des ganzen Komplexes auf den Proteintransport bestimmter Substrate ausübt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde, unter Beachtung der genannten Variablen, eine Kinetik zur Etablierung von siRNAs gegen das kodierende Gen für das ER-Membranprotein SR $\beta$  durchgeführt. Dazu wurden aus einer Reihe möglicher kommerziell verfügbarer, komplementärer Oligonukleotide einige Sequenzmotive ausgewählt und hinsichtlich ihres Potentials für den gewünschten Einsatz getestet.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen ausgesät (Abschnitt 3.4.3.1) und mit vier verschiedenen siRNAs in den Konzentrationen 10, 20 und 40 nM untersucht. Auf Grund eines kleineren Maßstabes im Vergleich zu Transportexperimenten wurden in diesem Fall 240.000 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Dies verringerte das eingesetzte Volumen an Medium auf 2,4 ml. Gleichzeitig verringerten sich die Volumina der vorinkubierten Transfektionslösungen zu folgenden Mengen: 100  $\mu$ l OptiMEM, 1,2  $\mu$ l (10 nM)/ 2,4  $\mu$ l (20 nM)/ 4,8  $\mu$ l (40 nM) siRNA und 12  $\mu$ l HiPerFect. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 72, 96 und 120 h mit anschließender Bestimmung der Restproteinmengen und Zellviabilität (Abschnitt 3.3).

Die Ergebnisse zur Analyse der Depletionseigenschaften verschiedener siRNAs gegen *SRPRB* sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Unter (A) ist ein exemplarischer Blot zur Ermittlung der Restproteinmengen nach vorangegangener Depletion gezeigt. Das Beispiel veranschaulicht für alle Zeitpunkte eine deutliche Reduktion der Proteinmenge bei Verwendung aller *SRPRB*-siRNAs gegenüber der Kontroll-siRNA.

In der Grafik (B) sind die relativen Restproteingehalte nach Einsatz aller getesteten siRNAs zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Zu ihrer Ermittlung wurden die Blots densitometrisch vermessen und die Proteingehalte nach den entsprechenden Depletionszeiten in den Kontrollzellen auf 100 % gesetzt. Weiterhin wurden die Signale an  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle abgeglichen. Mit Ausnahme der siRNA #2 wurde für alle getesteten Oligonukleotide eine zeitabhängige Verminderung der



**Abbildung 4.1:** Zeitlicher Verlauf der Proteinreduktion und der Gesamtzellzahl nach induzierter SRβ Depletion. Dargestellt sind die erhaltenen Daten für die Konzentration von 20 nM. 240.000 HeLa-Zellen wurden in vorgelegtem Nährmedium von 2,3 ml in 6 Well-Platten ausgesät und mit Kontroll siRNA bzw. einer der 4 gezeigten *SRPRB*-siRNAs für 72, 96 oder 120 h behandelt. Dazu wurde ein Transfektionsansatz von 100 µl OptiMEM, 2,4 µl (EK 20 nM) siRNA und 12 µl HiPerFect vor der Applikation für 10 min vorinkubiert. Zum gegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen abgelöst und ausgezählt sowie die Zellysate aufbereitet (3.2.1) und nach SDS-PAGE (3.2.2) und Western Blot (3.2.3) immunologisch dektetiert (3.2.4). (A) Western Blot zur Bestimmung des Proteingehalts von SRβ und β-Aktin nach Transfektion mit den verschiedenen *SRPRB*-siRNAs (20 nM) zu den verschiedenen Zeitpunkten. (B) Grafische Darstellung des relativen Restproteingehalts von SRβ bezogen auf β-Aktin für die getesteten siRNAs. (C) Grafische Darstellung der durch Zellzählung ermittelten Gesamtanzahl vitaler Zellen je verwendeter siRNA und Zeitpunkt.

Proteinmenge von SRβ erzielt. Während die siRNA #1 noch einen Restgehalt von 35 % zeigte, lagen die Werte für #3 und #4 unter 20 %. Die Depletionseffizienz für den Einsatz von 10 nM (hier nicht dargestellt) fiel etwas geringer aus, während die Verwendung von 40 nM ähnliche Ergebnisse wie die hier Gezeigten erbrachten. Nach 120 h stieg das Proteinlevel von SRβ wieder etwas an. Die unter (C) dargestellten Gesamtzellzahlen zeigten sich zwischen allen eingesetzten Oligonukleotiden vergleichbar und stagnierten ab 72 h Inkubationszeit.

Unter Beachtung der Restproteinmengen erscheinen die siRNAs #3 und #4 effizienter in HeLa-Zellen zu wirken als die anderen beiden getesteten Oligonukleotide. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 96 h zu 120 h brachte keinen Vorteil. Somit wurden die siRNAs #3 und #4 zur Depletion von *SRPRB* in Transportexperimenten gewählt um sie in der Konzentration 20 nM mit einer Gesamtdepletionszeit von 96 h

einzusetzen.

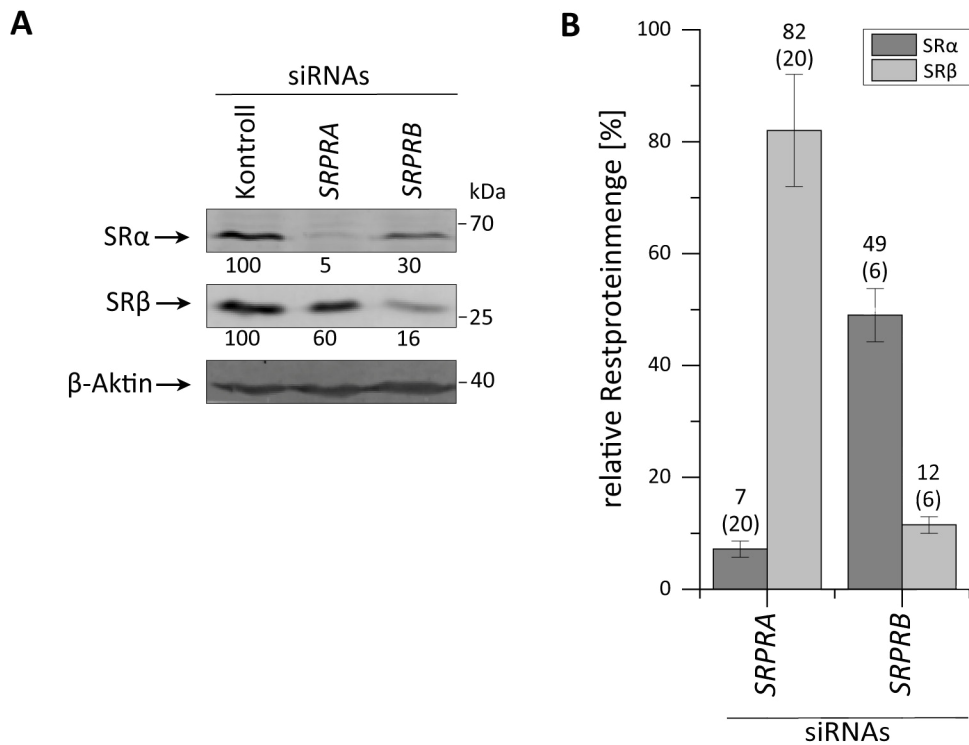
#### **4.1.2 Kombination von *SRPRB* siRNA #3 und #4 erhöht die Depletionseffizienz**

Mittels Depletion einer oder mehrerer Translokonkomponenten kann durch einen Defekt des ER-Imports festgestellt werden, welche Elemente in den Transport des jeweiligen Substrats involviert sind. Die Verwendung zweier unterschiedlicher siRNAs gegen das gleiche Zielgen in einem Transportexperiment verringert die Wahrscheinlichkeit eines unentdeckten unspezifischen Nebeneffekts. Während der Etablierung konnten zufriedenstellende Reduktionen der membranständigen Rezeptorkomponente erreicht werden. Nach mehrfachem Einsatz der *SRPRB*-siRNAs #3 und #4 in Transportversuchen wurden starke Schwankungen in den Restproteinmengen von SR $\beta$  beobachtet. Um eine konstante verringerte Proteinmenge zu erzielen, wurden die beiden siRNAs #3 und #4 in Kombination eingesetzt. Damit gelang eine stabilere Reduktion von SR $\beta$ . Sofern nicht anders angegeben, wurden zur Stilllegung von *SRPRB* daher beide siRNAs im gleichen Verhältnis eingesetzt.

#### **4.1.3 Depletion von *SRPRB* verringert den Proteingehalt von SR $\alpha$**

Ein wichtiger Transportweg zum Import ins ER von Proteinen, eröffnet sich durch die Beteiligung des SRP-Rezeptor-Komplexes, der sich aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzt und deren Anwesenheit für manche Substrate eine Notwendigkeit für ihre effiziente Prozessierung darstellt. Zur Untersuchung ihrer Involvierung wurde die Etablierung von siRNAs gegen *SRPRB* durchgeführt um die Reduktion des membranständigen SR $\beta$  sicher zu stellen (Abschnitt 4.1.1). Dabei wurde in in verschiedenen Transportexperimenten eine zusätzliche Reduktion des assoziierten, zytosolisch lokalisierten SR $\alpha$  beobachtet. Da die  $\beta$ -Untereinheit die membranverankerte Komponente darstellt ist eine Beeinflussung der Stabilität des peripheren SR $\alpha$  durch diese Interaktion denkbar. Die festgestellte Verminderung von SR $\alpha$  wies auf eine Degradation dieser Untereinheit infolge der *SRPRB*-Stilllegung hin, was im Folgenden eingehend geprüft werden sollte. Dazu wurde der Gehalt beider Untereinheiten nach Einzeldepletion von SR $\alpha$  und SR $\beta$  mittels Immunodetektion ermittelt und auf Korrelation mit der verringerten Proteinmengen untersucht.

Die Abbildung 4.2 stellt die Restproteinmengen von SR $\alpha$  und SR $\beta$  nach Stilllegung der zugehörigen Gene dar. In (A) sind exemplarische Blots mit den entsprechend ermittelten Restproteinmengen gezeigt. Zu deren Berechnung wurde das gemessene Signal zunächst mit  $\beta$ -Aktin abgeglichen und anschließend relativ zu den Kontrollzellen angegeben. Hierfür wurden nur solche Versuche mit einbezogen, deren Depletion für das entsprechende Protein einen Restgehalt von unter 20 % betrug,



**Abbildung 4.2:** Einfluss der Depletion von *SRPRA* und *SRPRB* auf die zugehörigen Restproteingehalte. In 6 cm-Schalen wurden 520.000 HeLa-Zellen, vortags subkultiviert, ausgesät, simultan mit siRNA transfiziert und für 24 h kultiviert. Die Transfektionsprozedur wurde wiederholt und die Zellpopulationen für weitere 72 h inkubiert (3.4.3.1). Nach einer Gesamtdepletionszeit von 96 h wurden die Zellen geerntet und lysiert (3.2.1). Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt (3.2.2), gefolgt von Western Blot (3.2.3). Durch Verwendung geeigneter Antikörper (Tabellen 3 und 4) wurden die Proteine immunologisch detektiert. (A) zeigt das Transfektionsschema der siRNAs mit beispielhaften Blots der untersuchten SRP-Rezeptor-Komponenten sowie das zytosolische Referenzprotein  $\beta$ -Aktin mit entsprechenden densitometrisch ermittelten Restproteilmengen. In (B) sind die mittleren Restproteilmengen von SR $\alpha$  und SR $\beta$  unter den jeweiligen Depletionsbedingungen dargestellt, wobei die Anzahl der Experimente als (n) angegeben ist.

der als Grenzwert gesetzt wurde um Proben mit ausreichend niedrigem Proteinlevel zu untersuchen und einen potentiellen Effekt beobachten zu können. Für das jeweilige Experiment wurde der entsprechende Restproteinwert der komplementären Untereinheit kalkuliert und unter Erhalt der hier gezeigten Daten gemittelt.

Die Ergebnisse zeigten, bei einer effizienten Reduktion von SR $\alpha$  nach Stilllegung von *SRPRA*, einen mittleren Restproteingehalt von 82 % für SR $\beta$ , die mit einer großen Schwankung verbunden ist. Die siRNA-vermittelte Verminderung der  $\alpha$ -Untereinheit führte zu keinem nennenswerten Verlust an SR $\beta$ . Da Letzteres als Membranprotein integriert ist und die  $\alpha$ -Komponente zytosolseitig daran bindet, scheint die fehlende Einheit zu keiner Destabilisierung der membranverankerten Untereinheit zu führen. Dagegen führt eine Verminderung an SR $\beta$  infolge entsprechender Depletion zu einem deutlichen messbaren Verlust der  $\alpha$ -Untereinheit. Der Restproteingehalt von nur noch 49 % signalisiert einen Stabilitätsverlust des funktionalen heterodimeren Komplexes auf Grund des fehlenden Interaktionspartners. In diesem Fall kann eine Abhängigkeit von SR $\alpha$  von der Membrankomponente gefolgert werden.

Durch die zusätzliche Reduktion von SR $\alpha$  simultan zum Verlust an SR $\beta$ , kann ein beobachteter Effekt in diesem Zusammenhang nicht eindeutig der Involvierung einer der Komponenten zugeordnet werden. Allenfalls ist die Wahrscheinlichkeit einer Beteiligung gering, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, sollte durch die Stilllegung von *SRPRB* kein Effekt erzielt werden. Die Betrachtung eines individuellen Effektes von SR $\beta$  bedarf in jedem Fall einer Kontrolle der assoziierten  $\alpha$ -Einheit.

## 4.2 Studien zur Translokation von Prolaktin

Das Hormon Prolaktin (PRL) ist ein gut untersuchtes sekretorisches Protein, das vielseitige Funktionen in Säugern und anderen höheren Eukaryoten und Wirbeltieren zeigt. Die reife Form im Säuger wird mit einem Molekulargewicht von 25,9 kDa angegeben und liegt als N-glykosilierte Variante von Prolaktin, auch endogen in HeLa-Zellen, vor. Das Glykoprotein wird sezerniert und kann nach der Aufreinigung mit geeigneten Methoden, wie der Fällung durch Ammoniumsulfat, nachgewiesen werden [105, 106, 107]. In Transportversuchen zum ER-Import gelang es neben dem Vorläufer und dem Glykoprotein auch die prozessierte, unglykosilierte Proteinform zu detektieren. So konnte der Anteil einer Beeinträchtigung des Transports nach Depletion von Proteinen, die an seiner Translokation beteiligt sind, festgestellt werden. In *in vitro*-Experimenten konnten Görlich und Rapoport bereits früh die erfolgreiche Translokation von PRL nur durch Anwesenheit des SRP-Systems, bestehend aus dem Erkennungspartikel und dem dimeren Rezeptorkomplex, sowie des heterotrimeren Sec61-Komplexes nachweisen [108]. Weiterhin konnte nach Depletion der  $\alpha$ -Untereinheit des heterodimeren SR-Komplexes ein Translokationsdefekt von PRL gezeigt werden, der den SRP-abhängigen Transport bestätigte. Gleichzeitig stellt eine unveränderte Translokation in Abwesenheit von Sec62 seine Involvierung als unwahrscheinlich dar [43, 109]. Welche weiteren Komponenten der Translokase an seinem ER-Import beteiligt sind, ist nicht vollständig geklärt. Zur Beantwortung der Frage nach involvierten Komponenten wird der Einfluss von SR $\beta$  sowie von Sec63 auf die Translokation von PRL untersucht.

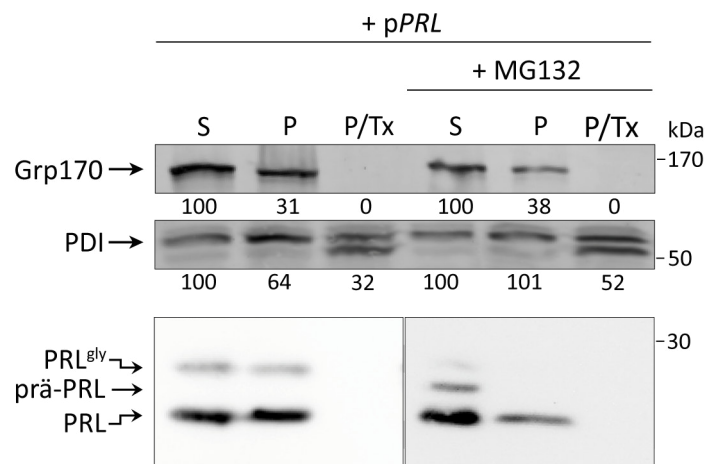
### 4.2.1 Präprolaktin liegt zytosolisch vor und die prozessierten PRL-Formen geschützt im Lumen des ER

Um das Substrat in weiteren Transportexperimenten auf die Beteiligung zusätzlicher Translokationskomponenten zu untersuchen, wurde zunächst eine Kontrolle zur eindeutigen Identifikation der detektierbaren Proteinbanden nach Plasmid-vermittelter Expression von PRL durchgeführt. Zur Lokalisation der Proteinformen wurde die Lage des unprozessierten Proteins im Zytosol, wo Präprolaktin unter physiologischen Bedingungen proteasomalem Abbau zugänglich ist, bestätigt. Nach Abspalten der

Signalsequenz und dem Import des translozierenden Proteins, liegen prozessiertes Prolaktin wie auch das zugehörige Glykoprotein, welches zum Teil sezerniert wird, geschützt vor der Protease im Lumen des ER [97]. Für folgende Studien zum ER-Import ist eine präzise Trennung von Vorläufer und reifen Proteinen unverzichtbar. Um dies zu ermöglichen und die zytosolische Degradation von Präprolaktin zu unterbinden, wurde ein Proteasominhibitor appliziert.

Zur Reproduktion des Bandenmusters und Durchführung des Experimentes wurden Zellen nach sukzessiver Permeabilisierung der Zell- bzw. Organellmembranen zur Degradation aller Proteine mit Proteinase K behandelt. Durch den Vergleich mit Proben, die zusätzlich mit Triton X-100 versetzt wurden, ist eine Differenzierung von zytosolischem Präprolaktin, welches durch MG132 stabilisiert wurde, und membrangeschützten prozessierten Proteinformen von Prolaktin möglich.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Versuchs wurde anschließend nicht nur das Protein von Interesse detektiert, sondern auch die Markerproteine Grp170 und PDI, die sich im Lumen des ER befinden. Deren Restproteingehalt erlaubt Rückschlüsse auf die Permeabilisierung der Membran sowie die sukzessive Degradation der unterschiedlich lokalisierten Proteine.



**Abbildung 4.3:** Proteaseresistenz-Assay nach Überexpression von PRL zur Identifizierung von Vorläufer und reifen Proteinformen. In 6 cm-Schalen wurden 1 Mio HeLa-Zellen einer Vorkultur vom Vortag ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Plasmidtransfektion (3.4.3.2) zur Überexpression von PRL. Die Kulturzellen inkubierten für 16 h und anschließend wurde DMSO bzw Proteasominhibitor appliziert. Nach weiteren 8 h Inkubation wurden die HeLa-Zellen abgelöst und ausgezählt. Die Zellsuspensionen wurden bei 3000 rpm für 3 Min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit KHM-Puffer und Digitonin (EK 0,88 µg/µl) auf 40.000 Zellen/µl eingestellt und für 10 Min bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde mit KHM-Puffer auf eine finale Konzentration von 20.000 Zellen/µl verdünnt. In 1,5 ml-Reagiergefäßen wurden je 100 µl S (Sucrose), P (PK 100) und P/Tx (PK 100/Triton X-100) vorgelegt und je 2 Mio Zellen zupipettiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 20 µl einer 200 mM PMSF-Lösung mit einer anschließenden Inkubation für 10 Min auf Eis. Die Ansätze wurden mit je 80 µl 5-fach Lämmli auf eine Gesamtzellzahl von 10.000 Zellen/µl verdünnt und für 10 Min auf 95 °C erhitzt. Nach der Trennung der Proteine über SDS-PAGE (3.2.2) erfolgte der Transfer auf PVDF-Membranen (3.2.3), die mit Antikörpern (Tabellen 3 und 4) gegen die Markerproteine und PRL immunologisch detektiert wurden. Gezeigt sind exemplarische Blots für PRL sowie für die ER-luminalen Proteine Grp170, BiP und PDI unter Angabe der jeweiligen Restproteinmengen.



In Abbildung 4.3 ist die sequentielle Proteasebehandlung nach Überexpression von PRL dargestellt. Zur Kontrolle wurden die Markerproteine densitometrisch erfasst und ihr Proteingehalt nach Bezug auf die Signale der Sucrose-Proben festgesetzt. Nach Berechnung der Restproteinmengen von Grp170, die durch die Proteasebehandlung reduziert wurden, zeigte sich ein Gehalt von 31 % bzw. 38 % (vgl. Spuren „P“ für Grp170 in Abb. 4.3). Durch den vollständigen Abbau nach Zusatz des Detergenz konnte die Sensitivität des Proteins gegenüber der Proteinase K sichergestellt werden. Das lumenale PDI wurde durch den Einsatz der Protease zu einem Fragment degradiert, das weiterhin immunologisch detektierbar ist. Nach Einsatz der Proteinase waren noch 64 % bzw., unter Verwendung des Proteasominhibitors, der vollständige Proteingehalt erhalten (vgl. Spuren „P“ für PDI in Abb. 4.3). Durch Zugabe des Membran-öffnenden Detergenz ist noch deutlich mehr Restprotein vorhanden im Vergleich zu Grp170, das auf Grund des deutlich höheren Molekulargewichts eine stärkere Sensitivität zum Verdau durch Protease zeigt (vgl. Spuren „P/Tx“ für Grp170 und PDI in Abb. 4.3). Auf Grund der hohen Restproteinmengen von PDI ist davon auszugehen, dass die zugegebenen Mengen an Proteinase zu gering zur Degradation sensibler Proteine war. Eine erhöhte Menge ist allerdings kritisch, da Membranen dabei möglicherweise bereits gelöst werden. Somit wäre eine Unterscheidung dieser Spuren von solchen mit Zusatz von Detergenz nicht mehr zielführend. Diesen Umstand berücksichtigend demonstrieren die Markerproteine insgesamt, auch ohne das Detergenz, zwar einen leichten Verlust, was auf eine Permeabilisierung der Membranen bereits durch die Digitonisierung hindeutet, dennoch ist der Restproteinanteil genügend hoch, um den Versuch als funktional zu bewerten und die Auswertung hinsichtlich des Proteins von Interesse fortzusetzen.

Ohne den Einsatz von MG132 ergaben sich für Prolaktin zwei detektierbare Banden, die etwa in gleichem Maße in den Spuren der Sucrose-Lösung sowie des PK 100-Ansatzes nachweisbar sind (vgl. Spuren „S“ und „P“ für PRL in Abb. 4.3). Nach der Öffnung der Membranen wurden beide Proteine vollständig abgebaut, was für ihre Sensitivität zum Verdau und ihre Lokalisation im geschützten Lumen spricht. Die reife Form von PRL besitzt durch die zusätzliche Modifikation der Glykosylierung ein größeres Molekulargewicht als unglykosyliertes PRL und kann somit der oberen Bande zugeordnet werden. Nach Zugabe des Proteasominhibitors war eine zusätzliche Bande zu detektieren (vgl. Spur „S“ + MG132 für PRL in Abb. 4.3). Diese stellt ein Protein mit einem mittleren Molekulargewicht, im Vergleich mit den beiden zuvor detektierten Banden, dar. Im Gegensatz zu den anderen beiden Proteinen, wurde dieses schon vor der Membranöffnung verdaut, was auf seine Lokalisierung im Zytosol zurückzuführen ist (vgl. Spur „P/Tx“ + MG132 für PRL in Abb. 4.3). Der Vorläufer trägt N-terminal die Signalsequenz, was eine höhere molekulare Masse gegenüber des prozessierten PRL bewirkt. In Kombination kann die mittlere Proteinbande daher dem Präprolaktin zugeordnet werden.

Somit konnte die Identität aller drei Proteinbanden sowie die Lokalisation des

Vorläufers und der reifen Prolaktinformen, wie in der Abbildung 4.3 beschriftet, bestätigt werden.

#### **4.2.2 Präprolaktin ist zum Teil in die ER-Membran inseriert**

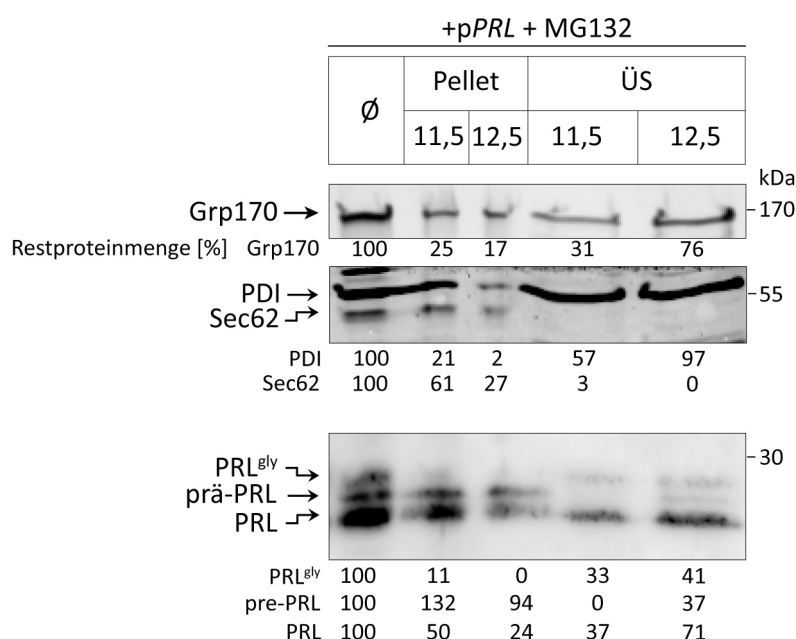
Die Translokation von Proteinen in das Lumen des ER unterscheidet sich unter anderem in den beteiligten Komponenten der Translokase und dem Prozessierungsweg, der durch diese beeinflusst wird. Weiterhin spielt die Interaktion des Vorläufers mit dem Translokase-Komplex eine entscheidende Rolle. Für manche Vorläuferproteine konnte eine partielle Insertion in die Membran während des Importprozesses gezeigt werden, wohingegen andere als lösliche Proteine, eventuell durch Assoziation an Komponenten der Translokase, prozessiert werden [97].

Zur Aufklärung des Transportmechanismus von PRL war es daher von großem Interesse für seinen Vorläufer die mögliche Membranassoziation von einer -insertion abzugrenzen. Die alkalische Carbonatextraktion eignet sich zur Beantwortung dieser Fragestellung. Der pH-Wert der verwendeten Salzlösung zur Durchführung dieser Methode beträgt 11,5 [104]. Es konnte gezeigt werden, dass dieser pH-Wert suboptimal für die effiziente Separation der SR $\alpha$ -Untereinheit vom dimeren SRP-Rezeptor-Komplex ist [48]. Daher wurde die periphere Einheit auch zunächst als membranständige Komponente vermutet [26]. Die Trennung gelang erst, nachdem für eine Carbonatlösung von pH 12,5 zur Dissoziation der Proteininteraktionen eingesetzt wurde [48]. Um auszuschließen, dass der Vorläufer von PRL einen ähnlichen Sonderfall darstellt und der Fragestellung nach einer möglichen Insertion des PRL-Vorläufers während des ER-Imports in geeigneter Weise zu begegnen, wurde der pH-Wert für diese Methode variiert.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen semipermeabilisiert, die nach entsprechender Plasmidtransfektion PRL überexprimierten. Um die Detektion des Vorläufers zu ermöglichen, wurde auch hier MG132 eingesetzt. Getestet wurde der Einfluss einer Carbonatlösung mit den pH-Werten 11,5 und 12,5 auf die Dissoziation der Protein-Protein-Wechselwirkungen. Um das Experiment hinsichtlich erfolgreicher Durchführung zu verifizieren, wurden neben dem Protein von Interesse außerdem noch Markerproteine des ER-Lumens sowie ER-Membranproteine immunologisch detektiert und ihre Restproteinmengen nach der jeweiligen Behandlung mit Natriumcarbonat relativ zu den unbehandelten Zellproben analysiert.

In Abbildung 4.4 ist der Blot des beschriebenen Experimentes dargestellt. Als ER-lumenale Markerproteine wurden Grp170 und PDI, sowie Sec62 als integrales ER-Membranprotein auf ihre Fraktionierung untersucht. Des Weiteren wurde Prolaktin immunologisch nachgewiesen. Abgebildet sind die Signale nach der Fraktionierung zu Pellet und Überstand, die mittels unterschiedlichem pH-Wert erzeugt wurden.

Für das lumenale lösliche Protein Grp170 bewirkte die Behandlung mit Carbonatlösung von pH 11,5 eine annähernde 1:1 Verteilung in Überstand und Pellet (vgl.



**Abbildung 4.4:** Variation des pH-Wertes zur alkalischen Carbonatextraktion am Beispiel von Prolaktin. Es wurden 1 Mio HeLa Zellen einer Subkultur vom Vortag in 6 cm-Schalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellpopulationen mit Plasmid zur Überexpression von PRL transfiziert (3.4.3.2), für 16 inkubiert und mit MG132 versetzt. Nach einer Gesamtgenexpressionszeit von 24 h wurden die Zellen geerntet, auf ein Endvolumen von 10 ml eingestellt und ausgezählt. Die Suspensionen wurden gemäß 3.5.3 zentrifugiert und die Zellpellets mit KHM-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden mit weiterem eisgekühltem KHM-Puffer auf 6 ml aufgefüllt und Digitonin (EK 0,88 µg/µl) zugegeben. Die Zellen wurden wie unter 3.5.3 beschrieben permeabilisiert und je 2 Mio Zellen in ein Beckman-Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen semipermeabilisierten Zellen wurden in separate Reaktionsgefäße überführt und gemäß 3.2.1 behandelt. Die Ansätze in den Beckman-Gefäßen wurden mit DNase versetzt (EK 0,08 mg/ml) und nach zehnmütiger Inkubation bei 37 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Die Restflüssigkeit wurde entfernt und das Zellpellet in 150 µl eiskalter Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung bei pH 11,5 bzw 12,5 resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 0 °C erfolgte die Ultrazentrifugation. Die Überstände wurden in ein gesondertes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das Membranpellet sorgsam mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung des entsprechenden pH-Wertes gewaschen und überschüssige Flüssigkeit aufgesogen. Beide Fraktionen wurden mit Lämmli-Puffer gemäß 3.5.3 inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (3.2.2) aufgetrennt, via Western Blot auf eine Membran transferiert (3.2.3) und immunologisch detektiert (Tabellen 3 und 4). Dargestellt ist der erhaltene Western Blot für Prolaktin sowie für die Markerproteine Grp170, PDI und Sec62 einschließlich ihrer relativen Restproteinmengen in Bezug auf die permeabilisierten Proben ohne Carbonatzusatz. Es werden die unextrahierten semipermeabilisierten Zellen (Ø), sowie die Fraktionen von Pellet und Überstand (ÜS) für die unterschiedlichen pH-Bedingungen gezeigt.

Spuren „11,5“ von Pellet und ÜS für Grp170 in Abb. 4.4). Bei Verwendung eines höheren pH-Wertes wurden 76 % der ursprünglichen Proteinmenge im Überstand angereichert (vgl. Spur „12,5“ von ÜS für Grp170 in Abb. 4.4). Somit wurde eine effizientere Trennung erreicht. Ähnliches wurde auch für PDI beobachtet, welches als weiteres lösliches Protein im Überstand zu erwarten ist. Hier war ebenfalls eine verbesserte Fraktionierung in basischerem Milieu zu verzeichnen, die 97 % des Chaperons im Überstand anreichterte (vgl. Spur „12,5“ von ÜS für PDI in Abb. 4.4). Das Membranprotein Sec62 war bei beiden pH-Werten nahezu nicht im Überstand, sondern ausschließlich im Pellet, nachweisbar.

Von großem Interesse ist die Betrachtung der Fraktionierung von Prolaktin und seiner Proteinformen unter den jeweiligen Bedingungen. Das Glykoprotein reichte sich bei beiden pH-Werten zum größeren Anteil im Überstand an (vgl. Spuren „11,5“ und „12,5“ von ÜS für PRL in Abb. 4.4), wobei durch die Verwendung der basischeren Lösung im Pellet kein Signal mehr detektierbar war (vgl. Spur „12,5“ von Pellet für PRL in Abb. 4.4). Prozessiertes Prolaktin wurde durch den höheren pH-Wert zum Großteil im Pellet abgereichert (vgl. Spur „12,5“ von Pellet für PRL in Abb. 4.4). Das Verhältnis der Verteilung nach Fraktionierung wurde für diese Proteinform umgekehrt, so dass mehr im Überstand detektiert wurde. Somit wurden beide reifen Prolaktin-Formen als lösliche Proteine bestätigt. Der Vorläufer war unter beiden pH-Wert-Bedingungen zum deutlich größeren Anteil im Pellet vorzufinden (vgl. Spuren „11,5“ und „12,5“ von Pellet für PRL in Abb. 4.4), obgleich eine erhöhte Proteinmenge nach Verwendung der Carbonatlösung mit pH 12,5 im Überstand detektiert wurde (vgl. Spur „12,5“ von ÜS für PRL in Abb. 4.4). Dennoch war auch hier noch ein deutlich höherer Anteil von Präprolaktin im Pellet zu verzeichnen und es gelang nur wenig Vorläufer im Überstand anzureichern. Nach einem Vergleich mit den Banden der reifen Proteinformen, die ein viel stärkeres Signal im Überstand der Probe mit pH 12,5 zeigen, ist zu erwarten, dass eine solche Verschiebung in der Fraktionierung auch für den Vorläufer erkennbar sein könnte. Da dieser Übergang jedoch ausblieb, wird vermutet, dass der Vorläufer nur zum geringen Teil als lösliches Protein vorliegt, welches nur an die Membran assoziiert ist, und zum größeren Anteil in diese inseriert.

#### **4.2.3 PRL zeigt einen Translokationsdefekt nach Depletion von Sec63 und SR $\alpha$**

Zum Studium des Imports von PRL ins Lumen des ER, ist die Analyse des Einflusses der Translokationsproteine von großem Interesse. Die siRNA-vermittelte Depletion gezielter Einzelkomponenten dient zur Beantwortung der Frage nach ihrer Involvement, indem die entsprechenden Elemente einzeln oder auch in Kombination verringert werden, um ihren Effekt auf den Transport von PRL zu analysieren. Die Depletion der SR-Untereinheit SR $\alpha$ , dessen Verlust nachweislich den ER-Import von PRL negativ beeinflusst, dient als Referenz einer verminderten Translokation. Dabei kann der besagte Defekt an der Akkumulierung des Vorläufers gemessen werden, dessen misslungene Translokation bei gleichzeitiger Unterdrückung der proteasomalen Degradation nachweisbar wird. Weiterhin wird Sec62, dessen Verlust keine Beeinträchtigung des ER-Imports von PRL bewirkt, als negative Referenz verwendet.

Von Interesse ist der Einfluss der Translokationskomponente Sec63 und der SR $\beta$ -Untereinheit des SR-Komplexes, sowie potentielle Synergieeffekte ihrer simultanen Depletion mit Sec62 und SR $\alpha$ . Da für PRL bereits die Beteiligung der SR $\alpha$ -Untereinheit

an der effizienten Prozessierung gezeigt wurde, stellte sich die Frage nach einer potentiell verstärkten Misstranslokation durch die Reduktion der gesamten SRP-Rezeptor-Einheit. Die Tatsache eines reduzierten ER-Imports von PRL in Abwesenheit der zytosolisch assoziierten Rezeptor-Komponente, weist auf einen SRP-abhängigen Transport des Substrates hin. Dabei ist die Frage, nach einem alternativen Ziel-führungselement oder einer direkten Bindung des SRP an SR $\beta$ , bisher noch nicht vollständig geklärt. Die bisherigen Literaturdaten deuten auf die Bildung einer Einheit des Rezeptorkomplexes hin, der nur als solcher auch funktional einen Proteintransport unterstützen kann. Nach derzeitigem Stand wird für eine fehlende Abhängigkeit von SR $\alpha$  eines Substrates zum effizienten Transport angenommen, dass in diesem Fall auch SR $\beta$  nicht für den Import benötigt wird und die Translokation unabhängig von SRP erfolgt [48]. Bisher ist keine Komponente bekannt, die effektiv mit der SR $\beta$ -Untereinheit interagieren kann um SR $\alpha$  als Targetingkomponente zu ersetzen. Durch separate Reduktion von SR $\beta$ , unabhängig von der  $\alpha$ -Untereinheit, sowie durch deren simultane Verringerung, wird die Möglichkeit eröffnet neue Erkenntnisse in Bezug auf diese Fragestellung und über ER-Importmechanismen zu gewinnen.

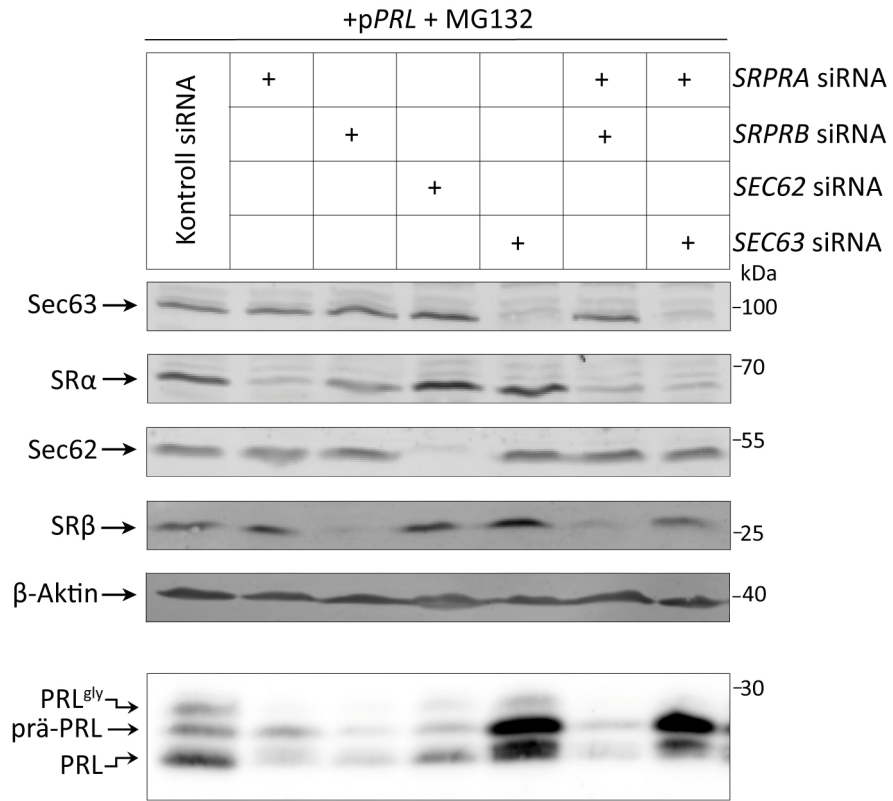
Um die Beteiligung von Einzelkomponenten vergleichen zu können und gleichzeitig additive Effekte zu untersuchen, erfolgte die Depletion der Translokation-assoziierten Proteine sowohl individuell als auch kombiniert. Um eine erfolgreiche Reduktion der membranständigen Rezeptorkomponente zu erzielen, wurden zur Depletion von SR $\beta$  zwei siRNAs in Kombination eingesetzt (Abschnitt 4.1.2). Weiterhin wurden zur Stilllegung von *SEC63* zwei verschiedene siRNAs eingesetzt, die sich gegen unterschiedliche Bereiche des Gens richten, um spezifische Nebeneffekte ausschließen zu können. Zur Verifizierung einer erfolgreichen Translokation wurden die Restproteinmengen der zugehörigen depletierten Gene bestimmt.

Die Durchführung der Analyse erfolgte durch Transfektion von Zellen mit einzelnen oder einer Kombination von mehreren siRNAs, gemäß dem Protokoll unter Abschnitt 3.4.3.1, die bis zum Erzielen einer Gesamtdepletionszeit von 96 h inkubiert wurden. Zusätzlich wurde *PRL* in den Zellen für 24 h überexprimiert und MG132 zur Inhibierung des Abbaus des Vorläufers appliziert.

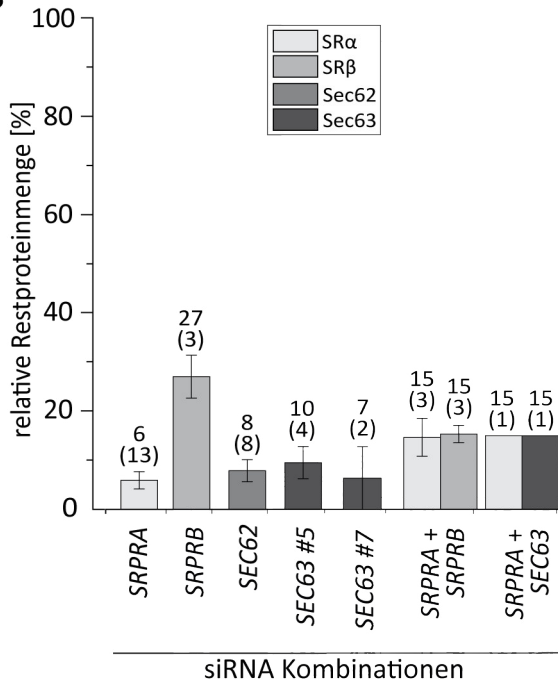
Die Effekte der Depletion von verschiedenen ER-assoziierten Translokationproteinen auf die Effizienz des ER Imports von PRL werden durch repräsentative Blots in Abbildung 4.5 (A) dargestellt. Zur Verifizierung der Depletionseffizienz wurden die densitometrisch ermittelten Werte der Proteinbanden zunächst mit dem  $\beta$ -Actin-Signal abgeglichen und anschließend die Proteinmengen unter Kontrollbedingungen auf 100 % gesetzt. Nach immunologischer Detektion ergaben die Kontrollen der reduzierten Proteingehalte für Sec63 und auch Sec62 Restproteinmengen von maximal 10 % bei Verwendung der einzelnen siRNAs. Der Gehalt von SR $\alpha$  konnte auf durchschnittlich 6 % des Ausgangswertes gesenkt werden, während für SR $\beta$  eine Reduktion auf 27 % erzielt wurde.

Die Detektion von PRL ermöglichte nach Transfektion mit Kontroll-siRNA in dem

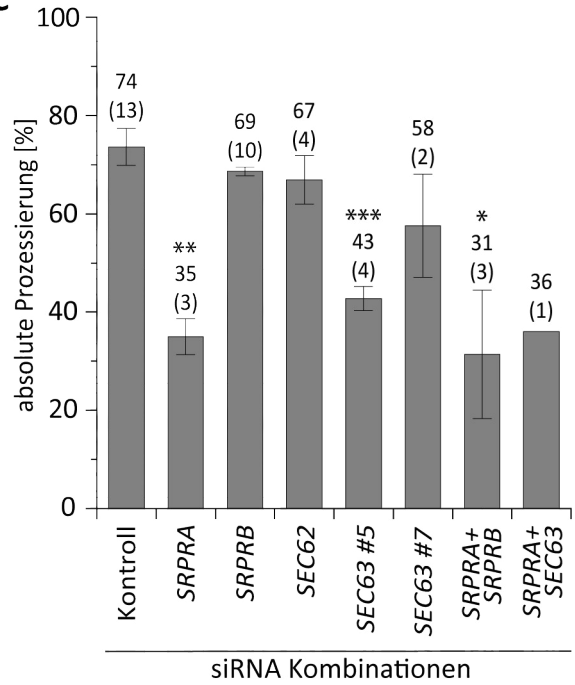
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 4.5**

**Abbildung 4.5:** Statistische Darstellung der Translokationsdefekte von PRL nach Depletion verschiedener ER-assoziiierter Translokationskomponenten. Es wurden 520.000 HeLa-Zellen, die am Vortag frisch subkultiviert wurden in 6 cm-Schalen ausgesät. Simultan erfolgte die Transfektion von einer oder mehreren siRNAs, die am Folgetag erneut appliziert wurden (3.4.3.1). Nach 48 h wurden die Kulturen zur Überexpression von PRL mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert (3.4.3.2) und für weitere 16 h inkubiert. Die Zugabe des Proteasominhibitors erfolgte 8 h vor der Ernte der Kulturzellen. Die lysierten Proben (3.2.1) wurden via SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.2) und über Western Blot Verfahren auf eine Membran transferiert (3.2.3) um mittels Antikörper (Tabellen 3 und 4) eine immunologische Detektion durchzuführen. (A) zeigt das Transfektionsschema der siRNAs sowie charakteristische Blots der untersuchten Translokationskomponenten Sec63, Sec62, die SRP-Rezeptor-Untereinheiten SR $\alpha$  und SR $\beta$  sowie das zytosolische Referenzprotein  $\beta$ -Aktin einschließlich ihrer densitometrisch ermittelten Restproteinmengen. Die Darstellung von PRL erfolgt zusätzlich mit den berechneten Werten der absoluten (abs.) und relativen (rel.) Prozessierung. (B) stellt eine Übersicht über die statistische Prozessierung von PRL nach Depletion einer oder mehrerer ER-Translokationselemente in Relation zu Kontrollbedingungen dar. Die angegebenen Werte entsprechen dem jeweiligen Mittelwert der Translokation, wobei (n) die Anzahl der Experimente und die Sterne die Stärke der Signifikanz des Effektes in Bezug auf die Kontrollzellen angibt

dargestellten charakteristischen Blot die Nachweisbarkeit der bekannten Mischpopulation. Die Berechnung der Translokationseffizienz erfolgte durch Bildung eines Quotienten aus der Summe der beiden prozessierten Proteine und der gesamten detektierten Proteinmenge. Es zeigte sich, dass unter kontrollierten Translokationsbedingungen eine effiziente Prozessierung von 74 % erreicht werden kann. In mehreren Experimenten nach gleicher Durchführung wurde mit Hilfe der ermittelten Prozessierungsraten somit eine statistische Aussage über den Einfluss der Depletion auf die Translokation von PRL erzielt. Die Depletion von SR $\alpha$  ergab eine Reduktion der Translokation auf 35 %, was einen bereits bekannten Phänotyp, eines signifikant gestörten ER-Imports von PRL, darstellt. Die verminderte Proteinmenge der membranständigen SRP-Rezeptor-Komponente führte dagegen nur zu einer Verminderung des Imports auf 69 %, was eher einer Schwankung entspricht, da es im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Effekt darstellte. Hierbei ist der Einfluss der Stilllegung von *SRPRB* auf den Proteingehalt von SR $\alpha$  zu berücksichtigen. Die Depletion bewirkte, wie bereits in Abschnitt 4.1.3, nicht nur eine deutliche Verringerung des Proteinlevels der  $\beta$ -Komponente, sondern wirkte sich auch auf die zytosolische  $\alpha$ -Einheit aus, was zu einer mittleren Reduktion auf 47 % führte (Daten nicht gezeigt). Da es sich in diesem Fall nur um einen leicht negativen Translokationseffekt handelt, wäre eine denkbarer Auslöser für dieses Phänomen die reduzierte Menge an SR $\alpha$ .

Nach der kombinierten Depletion beider Untereinheiten wurde eine ähnliche Menge von Präprolaktin transloziert, wie nach Einzeldepletion von SR $\alpha$  beobachtet wurde. Auch hier handelt es sich um einen signifikanten Effekt. Die erhobenen Daten indizieren, dass der Verlust des gesamten Rezeptorkomplexes keinen zusätzlichen negativen Effekt auf den ER-Import von PRL ausübt. Die Abwesenheit von SR $\beta$  beeinflusst den ER-Import nur sekundär durch Assoziation der  $\alpha$ -Untereinheit. Die Depletion von Sec62 ergab einen mittleren ER-Import von 67 %, was eine hohe Toleranz seiner Abwesenheit demonstriert und die bereits erhobenen Daten einer

mangelnden Beteiligung von Sec62 am ER-Import von PRL unterstützt.

Im Fall von Sec63 ist eine Differenzierung der beiden verwendeten siRNAs nötig. Die Restproteinmengen nach der Depletion zeigten ähnliche Werte, die sich aber unterschiedlich auf den ER-Import auswirkten. Die Verwendung der #5 siRNA brachte eine signifikante Verringerung des Transports von PRL, der auf 43% gesunken ist. Dieses Ergebnis deutet auf die Involvierung des Membranproteins am ER-Import von PRL hin. Zur Bestätigung dieses Effektes wurde eine zweite siRNA gegen Sec63 eingesetzt. Dieser Defekt konnte allerdings unter Verwendung der #7 siRNA (nicht im Blot dargestellt) mit einer Transportrate von 58 % nicht in dieser Intensität verifiziert werden. Allerdings wurde diese siRNA auch erst in zwei Experimenten eingesetzt, weswegen die Aussagekraft nicht ausreichend ist, um das Ergebnis als repräsentativ zu bezeichnen, und bedarf daher weiterer Studien. Die Doppeldepletion der  $\alpha$ -Untereinheit und Sec63, unter Verwendung der #5 siRNA gegen *SEC63* ergab keinen additiven Translokationsdefekt, sondern zeigte mit einem mittleren Import von 36 % eine ähnliche Effizienz der Translokation wie nach einfacher Depletion von SR $\alpha$ . Diese Beobachtung konnte allerdings erst in einem ersten Experiment gemacht werden. Zur Sicherstellung ist auch hier die Mehrfachdurchführung des Versuchs unerlässlich um eine Schwankung auszuschließen.

An Hand der erhobenen Daten konnte ein signifikanter Translokationsdefekt nach Depletion von Sec63 dargestellt werden. Zusätzlich zeigte die Postivkontrolle nach Depletion von SR $\alpha$ , den erwarteten Effekt eines reduzierten ER-Imports von PRL. Des Weiteren erzeugte der Verlust von SR $\beta$  keinen negativen Einfluss auf den ER-Import von PRL.

### 4.3 Studien zur Translokation von ERj6

Das ER-lumenale Protein ERj6 dient auf Grund seiner molekularen Funktion als Cochaperon als interessanter Kandidat zur Studie seiner Translokationsmechanismen in das ER von Säugerzellen. In diesem Zusammenhang wurden bereits erste Untersuchungen zum ER-Import von ERj6 durchgeführt. Die erhaltenen Daten weisen auf eine Beteiligung von Sec62 und Sec63 zum effizienten Transport hin, wohingegen die Abwesenheit von SR $\alpha$  die Prozessierungsrate nicht verschlechtert [97]. Um diese Erkenntnisse zu bestätigen und weitere Daten zur Aufklärung seines Transportverhaltens zu generieren, wurde ERj6 in siRNA-basierten Experimenten, zur Depletion von Sec63 und SR $\beta$ , exogen exprimiert. Gleichmaßen erfolgte die Untersuchung einer Beteiligung der membranständigen SRP-Rezeptoruntereinheit SR $\beta$  am ER-Import von ERj6. Der zu Grunde liegende Zusammenhang hierzu wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 erläutert. Neben den Einzeldepletionen, kann der kombinierte Einsatz von siRNA zur simultanen Proteinreduktion von mehreren Translokonkomponenten zusätzlich Aufschluss über das Zusammenspiel Sec61-assoziiierter Proteine zum



Transport von ERj6 geben. Insbesondere der Effekt der Reduktion des dimeren SRP-Rezeptorkomplexes auf den ER-Import stellte einen interessanten Ansatz dar.

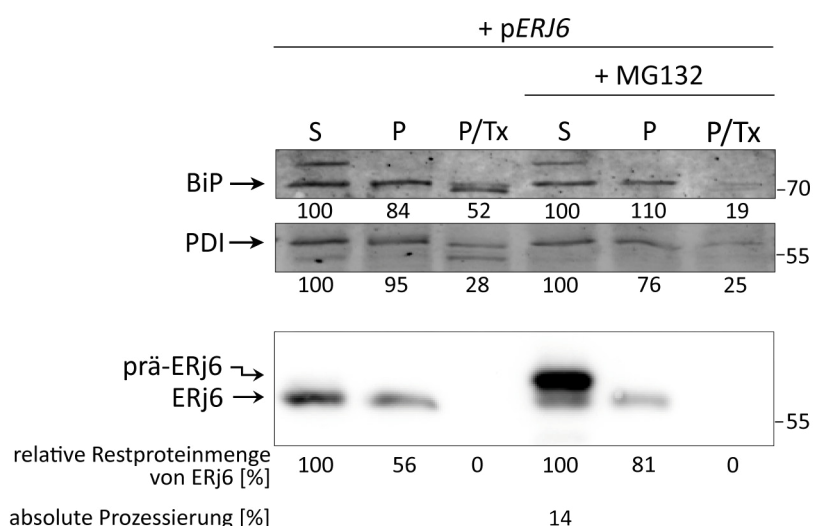
### **4.3.1 ERj6 wird unter Kontrollbedingungen ineffizient transloziert**

Zur Auswertung von Transportexperimenten an ERj6 war die eindeutige Zuordnung von Vorläufer und reifer Proteinform unverzichtbar, um durch deren Verhältnis mögliche Einflüsse auf die Prozessierung betrachten zu können. ERj6 besitzt keine Glykosilierungsstelle oder weitere bekannte posttranslationale Modifikationen, weswegen nur die beiden genannten Proteinformen detektiert wurden, die sich konstitutionell durch die N-terminale Signalsequenz unterscheiden. Um die Zuordnung der dargestellt Proteinformen des Cochaperons zu reproduzieren wurde eine Sequestrierung durchgeführt, die eine Aufklärung bezüglich ihrer Lokalisation, unter Einbezug ihrer Sensitivität gegenüber der Proteinase K, ermöglichte. Für diesen Ansatz wurde ERj6 mittels Plasmid-basierter Überexpression verstärkt in den Zellen synthetisiert und durch Zusatz von Proteasominhibitor die Nachweisbarkeit des Vorläufers erhöht. Nach der Ernte der Kulturen wurden diese, nach dem Protokoll wie unter Abschnitt 3.5.2 beschrieben, sukzessiv der Degradation in den verschiedenen Kompartimenten ausgesetzt. Somit ergaben sich Bandenmuster, die, auf Grund ihrer Detektierbarkeit in den verschieden behandelten Proben, den entsprechenden Lokalisationen zugeordnet werden können.

In Abbildung 4.6 sind charakteristische Blots des Experimentes dargestellt. Zur Auswertung wurden die densitometrisch erfassten Proteinsignale der Markerproteine für die Sucrose-Proben auf 100 % gesetzt und die verbleibenden Proteingehalte der enzymatischen Ansätze hierauf bezogen. BiP zeigte nach Zugabe der Protease nur einen schwachen Verlust bzw., in Kombination mit Proteasominhibitor, keine Reduktion (vgl. Spuren „P“ für BiP in Abb. 4.6). Die Membrangängigkeit der Protease ermöglichte eine deutliche Degradation, die sich, infolge der Berechnung der Restproteinmengen, ohne MG132 auf 52 % belief, während bei Zusatz des Proteasominhibitors nur noch 19 % zu verzeichnen waren. Dies deutete daraufhin, dass zu wenig Protease eingesetzt wurde, wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erläutert. PDI zeigte eine leichte Reduktion des Proteingehalts nach der eingeleiteten zytosolischen Degradation (vgl. Spuren „P“ für PDI in Abb. 4.6) und unterlag nach Permeabilisierung der Membranen einem sichtlich stärkeren Verdau (vgl. Spuren „P/Tx“ für PDI in Abb. 4.6).

Die beiden lumenalen Markerproteine zeigten wenig Degradation ohne Zugabe des Detergenz, welches dem Enzym erst Zugang zum ER Lumen verschafft. Die Membranen waren demnach in diesem Fall noch zum Großteil intakt, was die Untersuchung einer membrangeschützten reifen Proteinform ermöglichte.

Nach Detektion des Substratblots zeigte die Kontrollspur ohne Proteasominhibitor



**Abbildung 4.6:** Proteaseresistenz-Assay nach Überexpression von *ERJ6* zur Identifizierung von Vorläufer- und reifem Protein. In 6 cm-Schalen wurden 1 Mio HeLa-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden gemäß 3.4.3.2 mit Plasmid zur Überexpression von *ERJ6* transfiziert und inkubierten für 24 h. Bereits nach 16 h wurden DMSO bzw. MG132 appliziert und nach weiteren 8 h Inkubation wurden die HeLa-Zellen abgelöst, sowie ausgezählt. Nach dem Waschen und Zentrifugieren der Zellen (vgl. 3.2.1), wurden die Zellpellets durch Zugabe von KHM-Puffer und Digitonin permeabilisiert. Diese wurden auf eine definierte Konzentration eingestellt und je 2 Mio Zellen auf je 100 µl der Ansatzlösungen S (Sucrose), P (PK 100) und P/Tx (PK 100/Triton X-100) verteilt. Nach Zugabe von PMSF-Lösung und anschließend 5-fach Lämmli-Puffer (3.5.2) folgte die Trennung der Proteine über SDS-PAGE (3.2.2) und der Transfer auf PVDF-Membranen via Western Blot (3.2.3), die mit Antikörpern gegen die Markerproteine und *ERJ6* immunologisch detektiert wurden (Tabellen 3 und 4). Die Banden der Proteine wurden densitometrisch erfasst und der Anteil an Restprotein gegenüber der reinen Sucroselösung berechnet. Gezeigt sind die erhaltenen Blots für *ERJ6* sowie für die ER-luminalen Proteine BiP und PDI.

nur ein *ERJ6*-Derivat (vgl. Spur „S“ ohne MG132 für *ERJ6* in Abb. 4.6). Das zusätzliche Signal, das ein Protein mit höherem Molekulargewicht darstellte, wurde nur durch Unterdrückung der proteasomalen Degradation nachweisbar (vgl. Spur „S“ + MG132 für *ERJ6* in Abb. 4.6). Die reguläre Aktivität der Proteasomen erzielte einen vollständigen Abbau dieser Fraktion, die einzig in den mit Sucrose behandelten Zellpopulationen darstellbar war. Dies indiziert sein Vorliegen im Zytosol, wo das Protein dem enzymatischen Verdau durch Proteinase K, auch ohne Anwesenheit des Detergenz, unterliegt, was der Lokalisation eines unprozessierten Vorläufers entspricht. Die untere Proteinbande war in beiden Fällen ohne Detergenz unter geringem Verlust an Proteingehalt zu detektieren (vgl. Spuren „P“ für *ERj6* in Abb. 4.6). Nach Zugänglichkeit des Enzyms in das Lumen des ER war diese Bande aber ebenfalls vollständig degradiert (vgl. Spuren „P/Tx“ für *ERj6* in Abb. 4.6). Daraus kann zum Einen gefolgert werden, dass das dargestellte Protein membrangeschützt innerhalb des Lumens vorliegt und zum Anderen, dass es sensitiv gegenüber der Protease ist.

Somit kann aus diesem Versuch die Lokalisation und Zuordnung des Vorläufers sowie des reifen Proteins gegenüber der Arbeit von Schorr reproduziert werden [97].

Des Weiteren vermittelt die Prozessierungsrate von 14 % in diesem Experiment einen ersten Eindruck der schlechten Translokation von ERj6 unter Kontrollbedingungen.

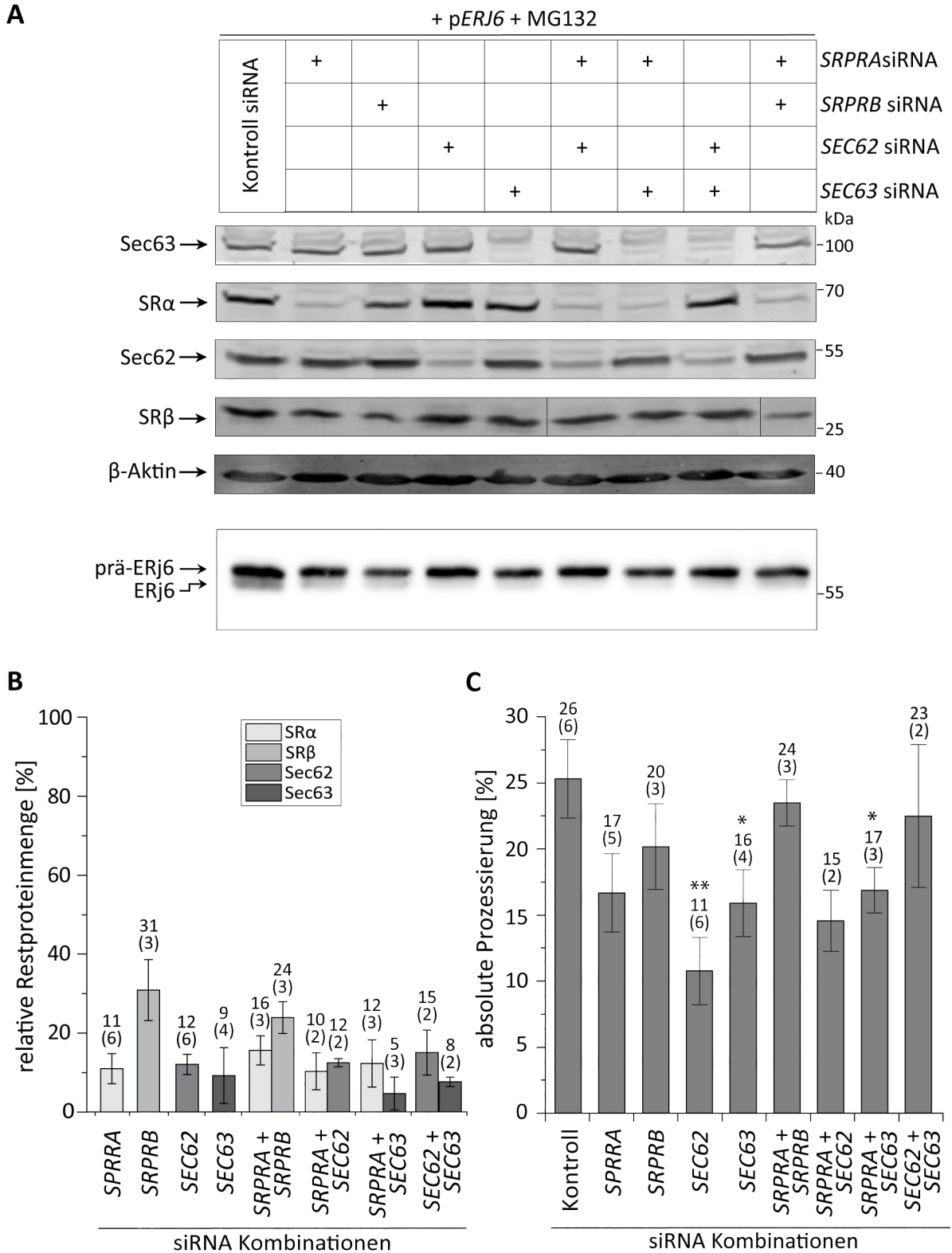
### **4.3.2 Die Translokationseffizienz von ERj6 ist nach Depletion von Sec62 und Sec63 verringert**

Das ER-lumenale J-Domänen Protein ERj6 zeigte sich nach ersten Experimenten als Sec62- und Sec63-abhängiges Transportsubstrat, da durch Reduktion dieser Proteine ein Verlust der Translokationseffizienz für ERj6 beobachtet wurde [97]. Auch konnte in der genannten Arbeit keine Beteiligung von SR $\alpha$  an der Prozessierung von ERj6 festgestellt werden. Neben Transportexperimenten zur Ermittlung von statistischer Relevanz des Einflusses dieser beiden Komponenten, stellte sich weiterhin die Frage, welche Sec61-assoziierten Elemente außerdem am Transport von ERj6 beteiligt sind und auch ob synergetische Effekte nach Mehrfachdepletion nachweisbar sind. Die Beteiligung der SR $\beta$ -Untereinheit blieb in dieser Fragestellung bisher gänzlich unberücksichtigt, woraus die Frage nach seiner Rolle innerhalb der Translokation von ERj6 resultierte. Im Konkreten wurden Sec62, Sec63, SR $\alpha$ , sowie SR $\beta$  auf ihre potentielle Rolle am ER-Import des ERj-Domänenproteins geprüft. Durch siRNA-vermittelte Depletion der zu untersuchenden assoziierten ER-Translokationproteine kann deren Einfluss während des Imports von ERj6 in das ER untersucht werden. Dabei spricht eine Reduktion des reifen Proteins oder eine Akkumulation des Vorläufers für die Beteiligung der betrachteten Komponente.

Um die Beteiligung verschiedener assoziierter ER-Translokationkomponenten zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen ausgesät und zunächst die gewünschten Proteine einzeln oder kombiniert depletiert. Anschließend wurde mit *ERJ6*-Plasmid transfiziert und die Zellen mit MG132 als Proteasominhibitor behandelt.

Die in Abbildung 4.7 gezeigten Daten, geben einen Überblick über die Depletions-Experimente nach Überexpression von *ERJ6*. In (A) wird zunächst das Schema der verwendeten siRNAs dargestellt. Darunter sind beispielhafte Blots der Translokation-assoziierten Proteine zur Berechnung der Restproteinmengen gezeigt. Die densitometrisch ermittelten Werte wurden zunächst auf die von  $\beta$ -Aktin bezogen und werden relativ zum Proteingehalt nach Verwendung der Kontroll siRNA angegeben. Unter (B) sind die entsprechenden Mittelwerte der Restproteinmengen angegeben.

Des Weiteren ist in (A) ein charakteristischer Blot für ERj6 dargestellt. Die Translokationseffizienz wurde wie in Abschnitt 3.4.3.2 erläutert berechnet. Bereits unter Kontrollbedingungen zeigte ERj6 eine schwache Prozessierung, die sich an Hand des geringen Mittelwertes von 26 % darstellt. Zur Ermittlung von potentieller Translokationsminderung sind die entsprechenden Restproteinmengen der depletierten Komponenten zu berücksichtigen. Hierbei sticht vor allem das Proteinlevel von SR $\beta$  heraus, welches immer noch bei 31 % lag. Nach Depletion des gesamten Rezeptorkomplexes kann im Durchschnitt ein Proteinrest von 24 % für SR $\beta$  erreicht



**Abbildung 4.7:** Statistische Darstellung der Translokationsdefekte von ERj6 nach Depletion verschiedener ER-assoziiierter Translokationskomponenten. Simultan zum Aussäen von 520.000, am Vortrag subkultivierter, HeLa-Zellen in 6 cm-Schalen, erfolgte die Transfektion von einer oder mehreren siRNAs, die am Folgetag erneut appliziert wurden (3.4.3.1). Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Kulturen zur Überexpression von ERj6 mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert (3.4.3.2) und für weitere 48 h kultiviert. Für die letzten 8 h wurde zusätzlich MG132

**Abbildung 4.7:** (Fortsetzung) appliziert. Im Anschluss an die Ernte der Zellen folgte deren Lyse (3.2.1), sowie die Trennung mittels SDS-PAGE (3.2.2), gefolgt von Western Blot (3.2.3). Durch Verwendung geeigneter Antikörper (Tabellen 3 und 4) wurden die Proteine immunologisch detektiert (3.2.4). (A) zeigt das Transfektionsschema der siRNAs sowie beispielhafte Blots der untersuchten Translokationskomponenten Sec63, Sec62, SR $\alpha$  und SR $\beta$  sowie das zytosolische Referenzprotein  $\beta$ -Aktin. In (B) sind die durchschnittlichen relativen Restproteinmengen der depletierten Sec61-assoziierten Proteine dargestellt. (C) stellt eine Übersicht über die Prozessierung von ERj6 nach Depletion einer oder mehrerer ER-Translokationselemente in Relation zur Verwendung von Kontroll-siRNA dar. Die angegebenen Werte entsprechen dem jeweiligen Mittelwert der Translokation, wobei (n) die Anzahl der in diese Statistik einfließenden Experimente darstellt. Die Sterne geben die Stärke der Signifikanz des Effektes in Bezug auf die Kontrollzellen an.

werden. Eine Involvierung der membranständigen Rezeptorkomponente war daher schlecht nachweisbar, da unklar ist, ob die Proteinmenge genügend reduziert ist, um einen Transportdefekt zu provozieren. Für alle anderen Proteine konnte durch die entsprechende Depletion eine Verminderung der Translokationseffizienz auf maximal 16 % erreicht werden. Die Daten ergaben unter den vorliegenden Bedingungen keinen signifikant negativen Einfluss auf den ER-Import von ERj6 in Abwesenheit des SRP-Rezeptorkomplexes oder seiner individuellen Untereinheiten, wobei nach Depletion der einzelnen Komponenten jeweils eine leichte Verminderung der Translokation von ERj6 detektiert wurde. Diese war im Fall von SR $\alpha$  etwas stärker. Der Effekt nach Reduktion von SR $\beta$  ist möglicherweise auf seinen Einfluss zur Minderung des SR $\alpha$ -Gehaltes zurückzuführen.

Die Abwesenheit von Sec62 bewirkte eine signifikante Reduktion der Prozessierungsrate von ERj6 auf nur noch 11 %. Diese Daten sind konform mit den Beobachtungen von Stefan Schorr und können nun statistisch belegt werden [97]. In Kombination mit einem reduziertem Proteinlevel der SR $\alpha$ -Untereinheit zeigte die Prozessierung ebenfalls eine Beeinträchtigung der Translokation, die jedoch einen weniger starken Effekt bewirkte. Es sei angemerkt, dass die Doppeldepletion dieser Kombination erst zweimal durchgeführt wurde. Der Verlust von Sec63 zeigte einen vergleichbaren Prozessierungswert zu SR $\alpha$ , unterlag aber weniger Schwankungen, woraus ein signifikanter Translokationsdefekt resultierte. Die kombinierte Depletion der SR $\alpha$ -Untereinheit und von Sec63 zeigte ein vergleichbares Transportverhalten im Vergleich zu ihren Einzelreduktionen. Die Feststellung eines Einflusses beider Komponenten ist daher nicht zweifellos möglich. Erste Erkenntnisse nach Doppeldepletion von Sec62 und Sec63 zeigten entgegen der einzelnen Reduktionen keinen verringerten Transport für ERj6, sondern scheinen diesen durch kompensierende Effekte aufrecht zu erhalten.

Die erhobenen Daten bestätigen eine Funktion von Sec62 zum effizienten ER-Import von ERj6. Die Abwesenheit von Sec63 zeigte eine leichte, aber signifikante Beeinträchtigung der Translokation des Cochaperons, im Gegensatz zu SR $\alpha$  welches einen ähnlichen Effekt ohne Signifikanz hervorrief. Damit scheint die Beteiligung von Sec63 sehr wahrscheinlich, während sie für SR $\alpha$  nicht eindeutig festgestellt werden

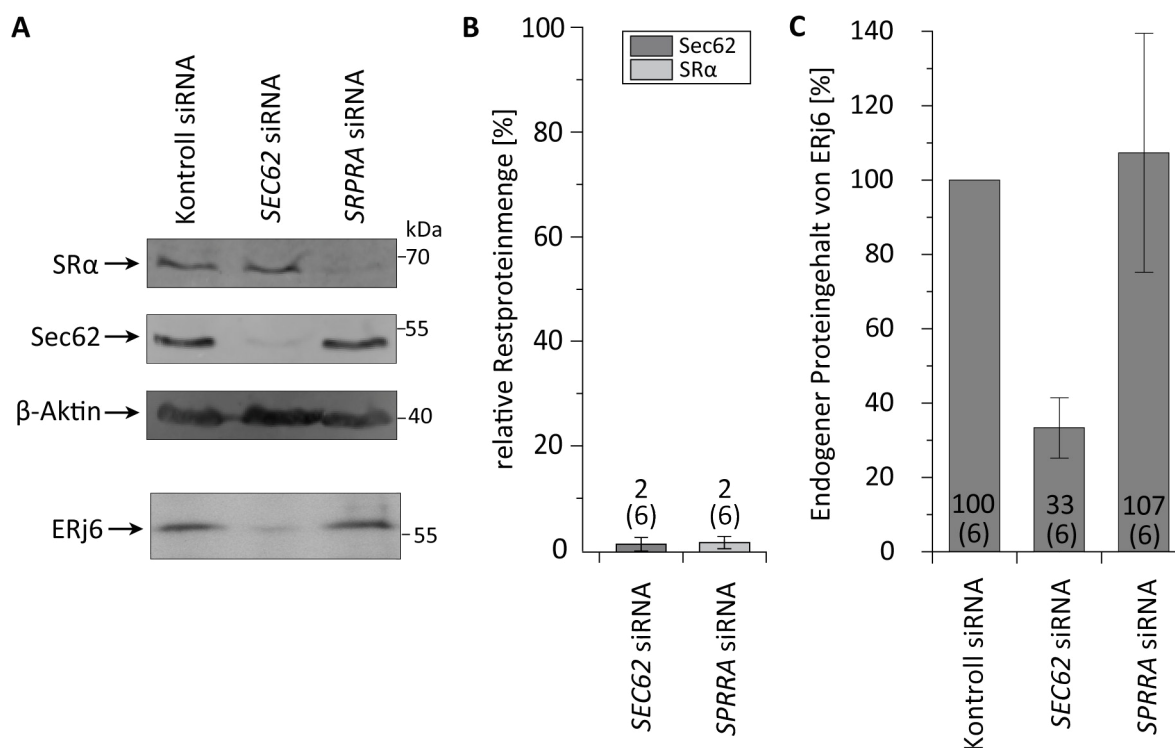
kann. Ein Einfluss auf die Prozessierung des Substrates infolge einer Verminderung von SR $\beta$  kann nicht nachgewiesen werden.

### **4.3.3 Der endogene ERj6-Gehalt ist nach Depletion von Sec62 verringert**

In unbehandelten HeLa-Zellen liegt ERj6 als lumenales ER-Protein endogen vor. Am ER-Import von exogen exprimierten ERj6 ist nachweislich die ER-assoziierte Translokonzusammensetzung Sec62 involviert (Abschnitt 4.3.2). Es liegen bislang keine Daten vor, welchen Einfluss dessen Verringerung der Proteinmenge auf das endogen synthetisierte ERj6 nimmt. Diese Analyse kann zur weiteren Aufklärung des Prozessierungsmechanismus beitragen, insbesondere da hierbei auf die zusätzliche Belastung der Zellen durch Plasmidtransfektion verzichtet wird und damit die Ermittlung des physiologischen ERj6-Gehaltes unter weniger artifiziellen Bedingungen ermöglicht. In dieser Arbeit wurde daher mit Hilfe von siRNA-basierter Depletion untersucht, welchen Effekt die Reduktion von Sec62 auf den endogenen Proteingehalt von ERj6 hat. Als Vergleichsmöglichkeit wurde der ERj6-Gehalt auch durch Einsatz einer siRNA gegen *SRPRA* überprüft, welche, wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, die Prozessierung von ERj6 nicht beeinträchtigt (Abschnitt 4.3.2).

Abbildung 4.8 stellt eine Übersicht zum Restproteingehalt von endogenem ERj6 dar. In (A) sind charakteristische Blots für die verbleibenden Proteinmengen der entsprechenden depletierten Proteine sowie für ERj6 gezeigt. Zur Analyse der Depletionseffizienz wurden die mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen als Referenz verwendet und der zugehörige Wert auf 100 % festgesetzt. Zusätzlich wurden die Proteinmengen mit dem Signal von  $\beta$ -Aktin der jeweiligen Spur abgeglichen. Sowohl für SR $\alpha$  als auch für Sec62 lag der Restproteingehalt nahezu bei 0, was damit eine fast vollständige Reduktion der Proteine darstellt. Auch für ERj6 wurde der ermittelte Proteingehalt in den Kontrollzellen als Referenz für die depletierten Populationen verwendet. Demzufolge war bei hohem Verlust von Sec62 nur noch ein ERj6-Gehalt von 33 % gegenüber den Kontrollbedingungen zu verzeichnen. Nicht nur durch Akkumulation des Vorläufers nach artifiziell verstärkter Synthese von ERj6 war eine Beteiligung von Sec62 am Importprozess nachweisbar (Abschnitt 4.3.2), sondern auch durch Betrachtung seines natürlichen Grundgehaltes.

ERj6 wies nach Reduktion von Sec62 einen deutlich verminderten Gehalt auf, als zusätzliche Bestätigung der Involvierung des Translokonzusammensetzung in den ER-Import von ERj6. In den *SRPRA*-depletierten Zellen hingegen war der Gehalt an ERj6 nahezu unverändert. Eine Verminderung an SR $\alpha$  wurde zur Prozessierung des luminalen Proteins problemlos toleriert, was die, in den vorherigen Experimenten (Abschnitt 4.3.2) bestätigte, Erkenntnis der untergeordneten Rolle von SR $\alpha$  am effizienten ER-Import von ERj6 unterstreicht.

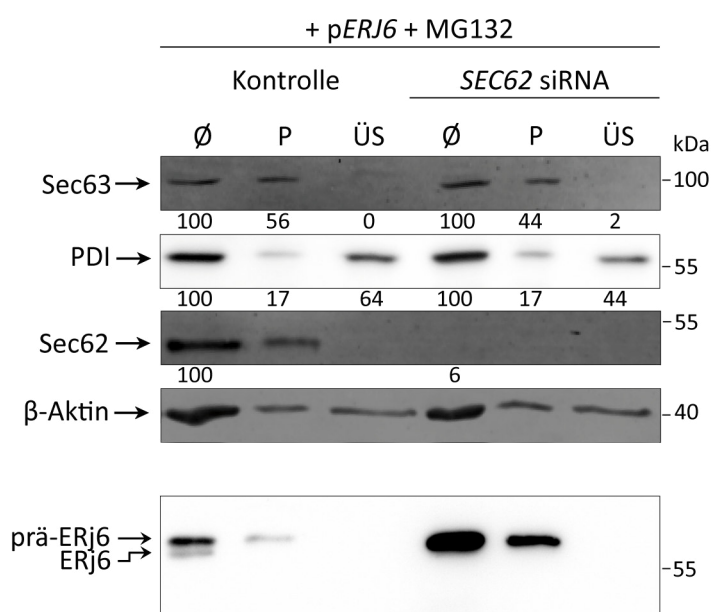


**Abbildung 4.8:** Statistische Darstellung des Effektes einer Depletion von *SEC62* und *SRPRA* auf den endogenen ERj6-Gehalt. Die Zellen wurden gemäß des Protokolls 3.4.3.1 ausgesät und mit siRNA transfiziert. Nach einer Gesamtgendepletionszeit von 96 h wurden die Zellpopulationen geerntet und lysiert (3.2.1). Anschließend wurden die denaturierten Proteine gelektrophoretisch getrennt (3.2.2) und via Western Blot (3.2.3) auf eine Membran übertragen. Mittels Antikörper wurde über immunologische Detektion (Tabellen 3 und 4) der Restproteingehalt von Sec62, SRα und ERj6 bestimmt. (A) zeigt einen repräsentativen Blot nach Detektion von SRα, Sec62, β-Aktin und endogen synthetisiertem ERj6. In (B) sind die mittleren Restproteinmengen von Sec62 und SRα der Versuchsreihen dargestellt. (C) gibt eine Übersicht über den mittleren Restproteingehalt von ERj6 nach Depletion von *SEC62* und *SRPRA*.

#### 4.3.4 Der Vorläufer von ERj6 ist in die Membran inseriert

Die lumenalen ERj-Proteine ERj3 und ERj6 zeigen viele gemeinsame Eigenschaften, darunter die Fähigkeit an den Sec61-Komplex zu assoziieren, Die Beteiligung an der Kanalschließung und auch strukturelle Merkmale, wie das HPD-Leitmotiv ihrer J-Domäne, die ihre Funktion als Cochaperon ermöglicht [60, 85, 88]. Für Ersteres wurde nach Depletion von Sec62 eine Insertion des Vorläufers in die Membran, während seines Transports in das Lumen des ER, gezeigt [97]. Die Lokalisation des Vorläufers von ERj6 während seiner Translokation ist zur Aufklärung seines Importmechanismus von großem Interesse. Um zu prüfen ob der zugehörige Vorläufer nur an die Membran assoziiert ist oder, wie im Fall von ERj3, sogar inseriert vorliegt, wurde die Methode der alkalischen Carbonatextraktion gewählt. Des Weiteren wurde zusätzlich eine Population mit reduziertem Sec62-Gehalt untersucht. Die Beteiligung von Sec62 zum effizienteren Import von ERj6 konnte in den Abschnitten 4.3.2 und 4.3.3 demonstriert werden. Daher erfolgte eine Untersuchung, ob die Lokalisation des Vorläufer sich nach dem Verlust der beteiligten Sec61-assoziierten Komponente gegenüber den Kontrollzellen verändert. Wie bereits in Abschnitt 3.5.3 besprochen, eignet sich die

Methode zur Dissoziation von membranassoziierten Komponenten, wodurch diese über Fraktionierung von integrierten Membranproteinen separiert und identifiziert werden können [104]. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen ausgesät und, nach Transfektion von siRNA gegen *SEC62*, durch Plasmid-getriebene Überexpression eine erhöhte Synthese von ERj6 ausgelöst. Die geernteten Zellen wurden alkalisch extrahiert um die Assoziationen zwischen Proteinen zu lösen und diese so von integralen Proteinen unterscheiden zu können.



**Abbildung 4.9:** Alkalische Carbonatextraktion von HeLa-Zellen nach *ERJ6*-Überexpression und *SEC62*-Depletion. Gemäß dem Protokoll zur Transfektion von siRNA (3.4.3.1) wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit entsprechender siRNA appliziert. Nach wiederholter siRNA-Transfektion und Ablauf von insgesamt 48 h wurden die Zellpopulationen mit Plasmid zur Überexpression von *ERJ6* transfiziert (3.4.3.2) sowie nach 16-stündiger Inkubation mit MG132 versetzt. Nach einer Gesamtgenexpressionszeit von 24 h bzw. einer Depletionszeit von 96 h wurden die Kulturen geerntet und mit PBS gewaschen, sowie zentrifugiert (vgl. 3.2.1). Die Zellpellets wurden in KHM-Puffer resuspendiert, sowie mit Digitonin semipermeabilisiert. Die Ansätze wurden nach Zentrifugation auf eine Zellkonzentration von 40.000 Zellen/ $\mu$ l eingestellt und je 2 Mio Zellen in ein Beckman-Reaktionsgefäß überführt, mit DNase versetzt und inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung bei pH 11,5 extrahiert, nach der Inkubationszeit ultrazentrifugiert und der Überstand vom Pellet separiert. Beide Proben wurden mit entsprechendem Lämmli-Puffer versetzt und unter Hitze inkubiert. Die übrigen semipermeabilisierten Zellen ohne Extraktion, wurden erst mit Lysepuffer aufgeschlossen und anschließend mit 5-fach Lämmli-Puffer erhitzt (3.5.3). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.2), via Western Blot auf eine Membran transferiert (3.2.3) und immunologisch, unter Verwendung der entsprechenden Antikörper (Tabellen 3 und 4), detektiert. Gezeigt ist der erhaltene Western Blot der Markerproteine Sec63, PDI, Sec62 und  $\beta$ -Aktin einschließlich ihrer relativen Restproteinmengen in Bezug auf die permeabilisierten Proben ohne Carbonatzusatz, sowie der Western Blot für ERj6. Es sind die verschiedenen Fraktionen der unextrahierten semipermeabilisierten Zellen ( $\emptyset$ ), der Zellpellets (P) sowie der Überstände (ÜS) aufgetragen.

In Abbildung 4.9 sind die erhaltenen Blotdaten der Markerproteine und des Substrats ERj6 dargestellt. Als Kontrollproteine fungierten PDI, ein lösliches ER-lumenales Protein, sowie Sec63 als integrales Membranprotein. Überprüft wurde außerdem die Effizienz der *SEC62*-Depletion an Hand der Restproteinmenge. Zur Berechnung der Proteingehalte wurden die gemessenen Werte für die unextrahierten



Proben zunächst auf 100 % gesetzt und die Auftrennung zwischen Pellet und Überstand relativ dazu angegeben.

Nach Separation von PDI, befand sich dieses zum Großteil im Überstand, während sich nur noch ein geringer Anteil im Pellet nachweisen ließen (vgl. Spuren „P“ und „ÜS“ für PDI in Abb. 4.9). Die Anreicherung des löslichen Proteins im Überstand kann somit zur Kontrolle als ausreichend angesehen werden. Das Membranprotein Sec63 war dagegen im Überstand nahezu nicht nachweisbar, im Pellet aber deutlich detektierbar (vgl. Spuren „P“ und „ÜS“ für Sec63 in Abb. 4.9). Nach der Semipermeabilisierung ergaben die Summen der jeweiligen Proteine aus den Fraktionen deutlich weniger als 100 %, was auf ihre teilweise Degradation hinweist. Dieser Umstand ist bei der Auswertung des Substratblots zu berücksichtigen.

Zur Bestimmung der Depletionseffizienz von Sec62 wurde dessen Signal zunächst auf  $\beta$ -Aktin bezogen und der Proteingehalt aus dem Lysat der Kontrollzellen mit den siRNA-behandelten Zellen verglichen. Hier ergab sich eine Restproteinmenge von 6 %, was einer effizienten Reduktion des Proteins und damit einer hohen Effektivität der Stilllegung entspricht (vgl. Spuren „Ø“ von SEC62 siRNA für Sec62 in Abb. 4.9).

Nach der alkalischen Carbonatextraktion von ERj6 wurde das in Abbildung 4.9 gezeigte Bandenmuster detektiert. Die erste Spur zeigt die Überexpression von ERj6 ohne vorangegangene Depletion und ohne Zusatz der Carbonatlösung zur Extraktion. Es wurden die beiden bereits bekannten Proteinbanden detektiert, die den Vorläufer und das prozessierte Protein repräsentieren. Das Signal des Vorläufers ist dabei deutlich stärker als das der prozessierten Form, was die bereits bekannte ineffiziente Translokation indiziert (vgl. Abschnitt 4.3.2). Nach der Carbonatextraktion war, wie auch bei den Markerproteinen, eine klare Reduktion der Gesamtproteinmenge zu verzeichnen. Während noch ein Rest an Vorläufer im Pellet detektierbar war, konnte die reife Form weder im Pellet noch im Überstand gefunden werden. Zu erwarten wäre das Signal im Überstand, da es sich bei ERj6 bekanntermaßen um ein lösliches ER-luminales Protein handelt (Abschnitt 2.3.4). Während der Prozessierung wird die Signalsequenz abgespalten. Im gezeigten Experiment ist der Vorläufer nach der Extraktion in verringertem Maße im Pellet nachweisbar, was darauf verweist, dass ERj6 während des Importprozesses nicht als lösliches Protein vorliegt. Nach der Reduktion der Sec62-Proteinmenge war kein reifes Protein mehr, aber simultan ein deutlich verstärktes Signal des Vorläufers unter Kontrollbedingungen, detektierbar, was als dessen Akkumulation interpretiert werden kann und mit den bekannten Resultaten eines Sec62-abhängigen Transports übereinstimmt. Zu beachten blieb auch die schlechte Trennung von Vorläufer und prozessierter Form, die eine Detektion des reifen Proteins unter der prominenten Vorläuferbande erschwert. Prä-ERj6 war als ausgeprägte Proteinbande im Pellet wiederzufinden, während keinerlei Substrat im Überstand nachgewiesen werden konnte. Die Reduktion von Sec62 bewirkte daher keine Veränderung bezüglich der Separierung von ERj6.

Nach diesen Ergebnissen liegt der Vorläufer sowohl unter Kontrollbedingungen,

als auch nach der Depletion nicht als lösliches Protein vor, sondern möglicherweise als integraler Bestandteil der ER-Membran.

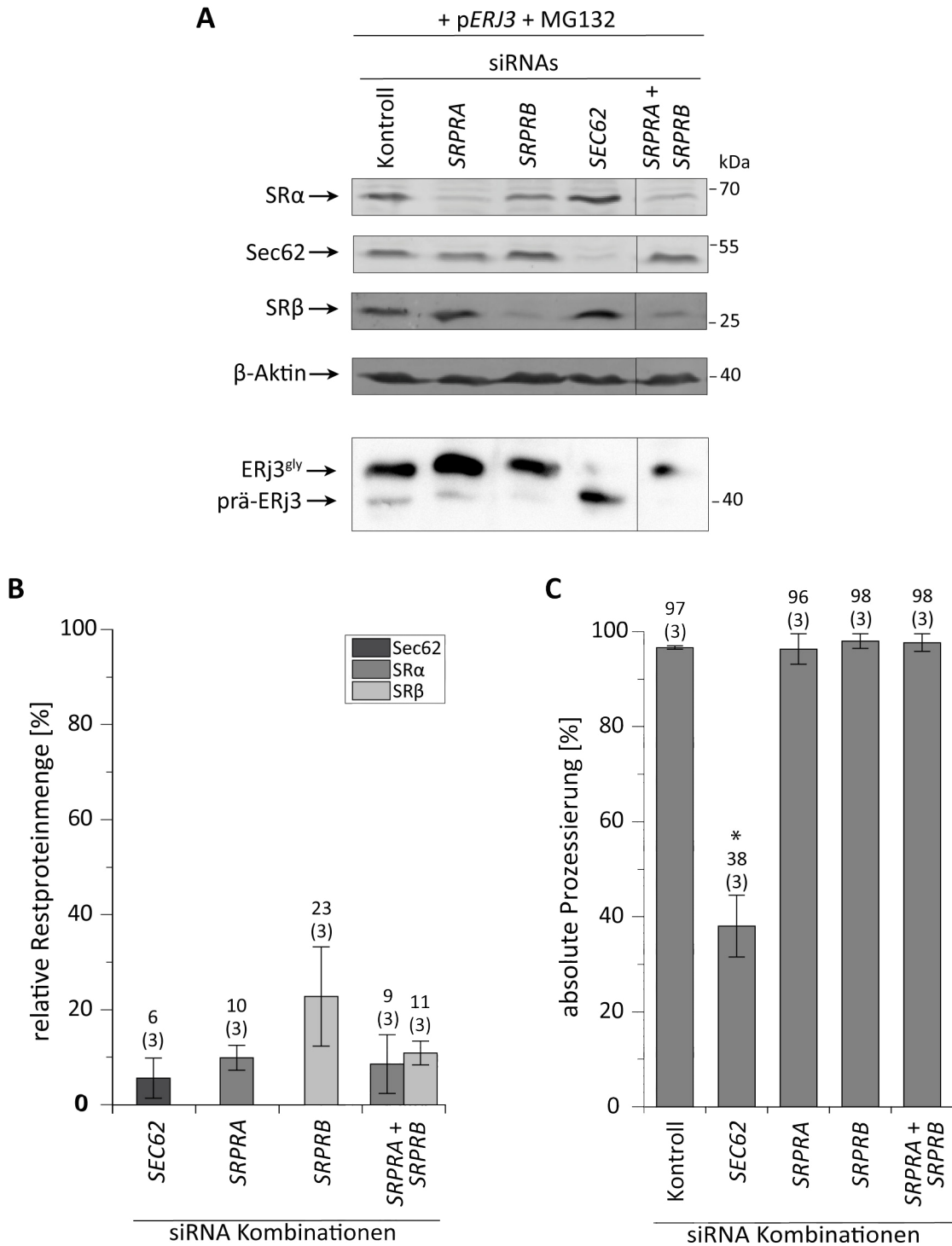
## 4.4 Studien zur Translokation von ERj3

In früheren Arbeiten wurde ERj3 ausführlich untersucht, um sein Translokationsverhalten zu studieren und charakterisieren. Es ist bekannt als Sec62- und Sec63-abhängiges Substrat für seinen effizienten ER-Import und dient in diesem Zusammenhang als Modellprotein in Transportstudien. Ebenso war ein synergetischer Transportdefekt nach simultaner Depletion beider integraler ER-Membranproteine nachweisbar. Gleichzeitig wurde das Cochaperon als SRP-unabhängiges Substrat identifiziert, was durch die Depletion von *SRPRA* ohne nennenswerten Effekt auf die Translokation von ERj3 gezeigt wurde [97]. Bisher liegen keine Daten einer Studie vor, die sich mit der Depletion von *SRPRB* oder gar des ganzen SRP-Rezeptorkomplexes und einem potentiellen Einfluss auf die Prozessierung von ERj3 beschäftigt. Um dies zu analysieren und den Mechanismus zum ER-Import des Cochaperons, ergänzend zu den bekannten Daten, weiter zu charakterisieren, wurde die Translokation des Substrates nach Reduktion der membranständigen SR $\beta$ -Einheit untersucht.

### 4.4.1 Die Depletion des heterodimeren SR-Komplex erzeugt keinen Translokationsdefekt von ERj3

Die Prozessierung von ERj3 zeigt keinen Translokationsdefekt in Abwesenheit der  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptor-Komplexes als Indiz für einen SR $\alpha$ -unabhängigen Transportmechanismus [97]. Die Untersuchung eines ergänzenden Einflusses der zweiten Komponente des Rezeptor-Komplex ist bis dato nicht bekannt. Um diese Frage zu klären wurde eine siRNA-vermittelte Stilllegung von *SRPRB*, sowohl als Einfach- wie auch als Doppeldepletion mit der SR $\alpha$ -Untereinheit durchgeführt, um den gesamten SRP-Rezeptor-Komplex zu reduzieren. Dazu wurde die Verwendung von siRNAs mit Plasmid-getriebener Überexpression von *ERJ3* kombiniert. Zur Kontrolle einer potentiell verminderten Translokation von ERj3, wurde auch eine Reduktion von Sec62 induziert.

Die Charakterisierung des Bandenmusters von ERj3 wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Unter anderem konnte, durch Tunicamycin-basierte Experimente die N-Glykosylierung von ERj3 nachgewiesen werden, sowie die Demaskierung einer, unter Kontrollbedingungen nicht detektierbaren, reifen Proteinform, die keinerlei posttranslationale Modifikation zeigt. Im Gegensatz dazu kann das Signal des Vorläufers in Zellen ohne vorherige Stilllegung in geringem Maße detektiert werden [97].



**Abbildung 4.10:** Statistische Übersicht der Translokationsdefekte von ERj3 nach Depletion der SRP-Rezeptor-Untereinheiten. 520.000 HeLa-Zellen einer Subkultur vom Vortrag wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und zeitgleich mit einer oder mehreren siRNAs transfiziert. Nach 24 h wurde die Transfektionsprozedur wiederholt und die Kulturzellen für weitere 48 h inkubiert (3.4.3.1). Anschließend wurde das entsprechenden Plasmid zur Überexpression von ERj3 transfiziert (3.4.3.2). Nach 16-stündiger Kultivierung wurde MG132 appliziert und weitere 8 h später folgte die Ernte der Zellen. Die zentrifugierten Zellpellets wurden lysiert (3.2.1) und die Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.2) aufgetrennt, gefolgt von Western Blot (3.2.3) und immunologischer Detektion (3.2.4) durch den Einsatz geeigneter Antikörper (Tabellen 3 und 4). (A) zeigt die verwendeten siRNA-Kombinationen sowie beispielhafte Blots der untersuchten Translokation-

**Abbildung 4.10:** (Fortsetzung) Komponenten  $SR\alpha + \beta$ , Sec62 sowie  $\beta$ -Aktin und ERj3. In (B) sind die mittleren Restproteinmengen von  $SR\alpha + \beta$  unter den jeweiligen Depletionsbedingungen dargestellt, wobei die Anzahl der Experimente als (n) angegeben ist. (C) stellt eine Übersicht der absoluten Prozessierung von ERj3 nach Einzel- oder Doppeldepletion von *SRPRA* und *SRPRB* im Vergleich zur Verwendung von Kontroll-siRNA bzw. *SEC62*-Depletion dar. (n) gibt die Anzahl der in diese Statistik einfließenden Experimente an und der Stern kennzeichnet die Stärke der Signifikanz eines Effektes gegenüber den Kontrollzellen.

In Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse nach Depletion der Rezeptor-Untereinheiten, sowie Überexpression von *ERJ3* in repräsentativen Blots und entsprechenden Grafiken dargestellt. Die Kontrollproteine, zur Überprüfung des Restproteingehalts, der Aufschluss über den Erfolg der Depletion gibt, ist in (A) dargestellt. Die jeweiligen detektierten Proteinmengen wurden als relative Werte in Bezug auf die Kontrollzellen berechnet und zusätzlich mit dem  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen. Als Kontrolle ist hier auch eine Depletion von Sec62 mit aufgenommen, dessen vermindernder Einfluss auf die Translokation von ERj3 bereits gezeigt wurde [97]. Die Sec62-Depletion dient als Modellbeispiel, wie sich die Verringerung einer involvierten Komponente am ER-Import für das getestete Substrat auswirken kann.

Die exemplarischen Blots dienen als anschauliches Beispiel für die in (B) gezeigte Grafik, die den Mittelwert der Restproteinmengen in den durchgeführten Experimenten zusammenfasst. Daraus ist eine deutliche Reduktion von  $SR\alpha$  nach seiner Depletion ersichtlich, die einen Mittelwert von 10 % Restprotein erreichte. Die Proteinreduktion von  $SR\beta$  zeigte sich nicht ganz so effizient, was sich in einer Restproteinmenge von 23 % im Mittel niederschlug. Die Doppeldepletion zur Verminderung des gesamten SRP-Rezeptor-Komplexes erzielte für beide beteiligten Proteine niedrigere Restproteinmengen von 9 % bzw. 11 %. Dieses Phänomen, der zusätzlichen Reduktion von  $SR\beta$  nach Doppeldepletion mit  $SR\alpha$ , im Vergleich zur Einzeldepletion von  $SR\beta$  konnte bereits mehrfach beobachtet werden (Abschnitt 4.1.3).

In (A) befindet sich unterhalb der Blots der Kontrollproteine auch ein aussagekräftiges Exempel des Substrates. Zur Berechnung der Prozessierung wurde die glykosilierte Proteinform auf das Gesamtsignal bezogen. Der Blot repräsentiert und unterstützt die unter (C) angegebenen gemittelten Prozessierungsraten nach Depletion der SR-Untereinheiten. Die mangelnde Detektierbarkeit des Vorläufers unter Kontrollbedingungen und trotz Inhibition der proteasomalen Degradation, demonstriert die hohe Effizienz des ER-Imports, die sich durch die mittlere absolute Prozessierung von 97 % in der Abbildung 4.10 klar herausstellte. Als Kontrolle, wie die Abwesenheit einer involvierten Translokationskomponente in Form einer verminderten Prozessierung wirken kann, wurde auch eine Sec62-Depletion durchgeführt, die eine Reduktion des Transports von ERj3 auf 38 % bewirkte. Nach Verringerung der Komponenten oder des ganzen dimeren SR-Komplexes zeigte sich eine vergleichbare Translokation von ERj3 wie unter Kontrollbedingungen. Verglichen mit der Prozes-

sierung nach Reduktion von Sec62 ist keinerlei Beeinträchtigung des ERj3-Imports durch die Depletion der Proteine des Rezeptor-Komplexes ersichtlich.

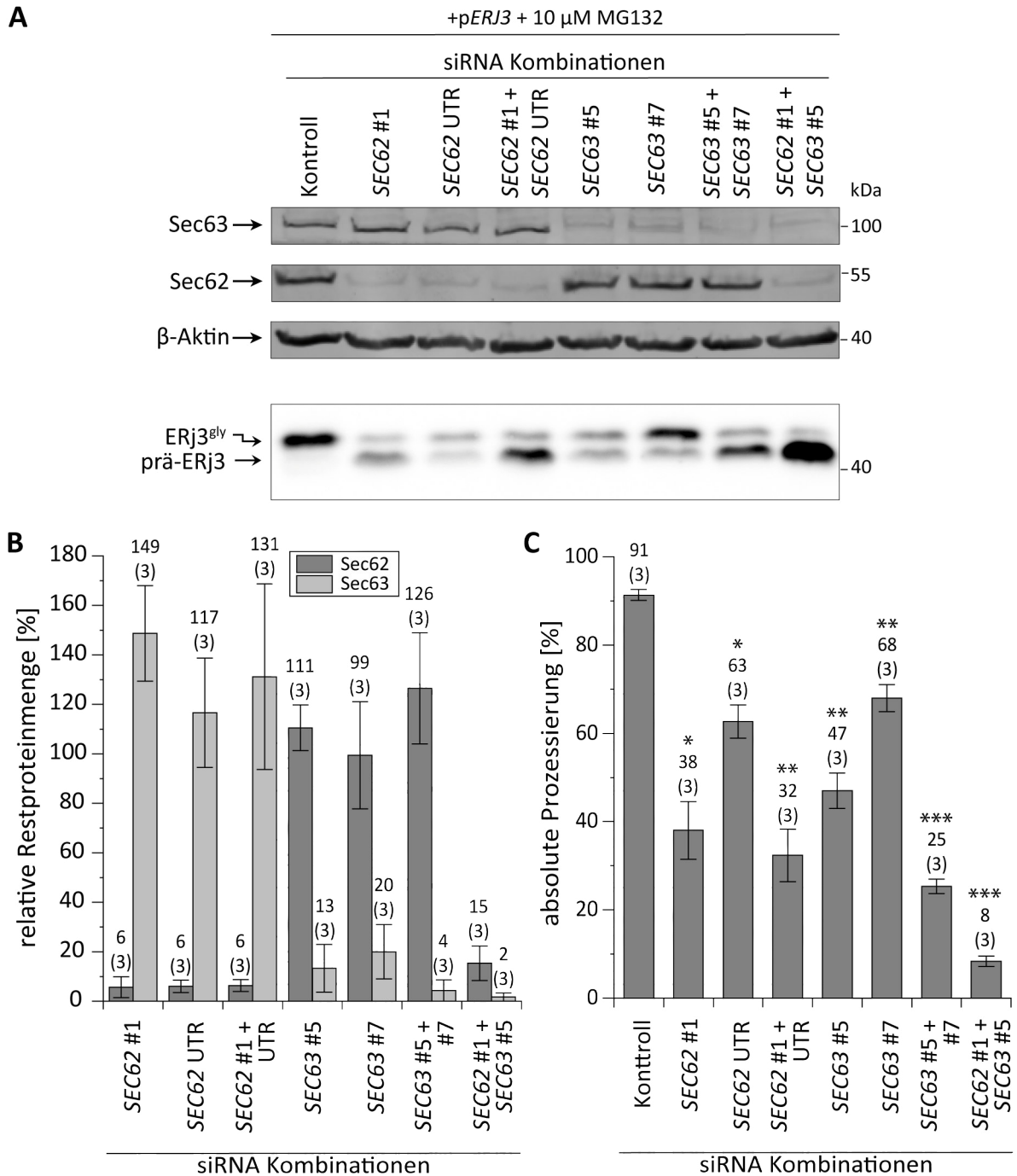
Nicht nur die Reduktion von SR $\alpha$ , sondern auch von SR $\beta$  werden hinsichtlich der Translokation gänzlich toleriert. Somit kann durch diese Arbeit gezeigt werden, dass die Reduktion des SR-Komplex keinen Effekt auf die Effizienz des ER-Imports von ERj3 ausübt, womit eine SRP-unabhängige Translokation als wahrscheinlich gilt.

#### **4.4.2 Der Einsatz zweier verschiedener siRNAs gegen SEC63 erzeugt einen additiven Transportdefekt von ERj3**

Für ERj3 konnte in vorangegangenen Arbeiten mittels siRNA-basierter Depletion und anschließender exogener Expression die Beteiligung von Sec62 und Sec63 am ER-Import nachgewiesen werden. Daher eignet sich das Substrat zur Untersuchung von siRNA-spezifischen Effekten durch Verwendung von zwei siRNAs, die gegen das gleiche Gen gerichtet sind. Dabei stand die Analyse eines potentiell verstärkenden Einflusses auf die Depletion sowie auf Translokationseffekte im Vordergrund. Ein möglicher additiver Effekt der Kombinationsdepletion wurde an Hand von Sec62 und Sec63 sowie ERj3 als Transportsubstrat untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und nach den bekannten Protokollen nach Einfach- und Mehrfachdepletion untersucht.

In Teil (A) der Abbildung 4.11 sind repräsentative Blots gezeigt, die die Restproteinmengen nach Verwendung der jeweiligen siRNA darstellen. Dabei wurden die densitometrisch ermittelten Werte auf die jeweiligen Kontrollzellen bezogen und somit relativ dazu angegeben. Jede Spur wurde zudem mit dem entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Signal abgeglichen. Gegen SEC62 und SEC63 wurden jeweils zwei verschiedenen siRNAs eingesetzt, die zunächst einzeln und schließlich kombiniert getestet wurden. Zusätzlich wurden die siRNAs #1 gegen SEC62 und #5 gegen SEC63 kombiniert eingesetzt um deren additiven Effekt auf die Verminderung der Translokation von ERj3 zu reproduzieren. Diese Kombination diente gleichzeitig als Vergleich zu den Einzel- und Mehrfachdepletionskombinationen. Der dokumentierte Blot von ERj3 ist eine beispielhafte Darstellung der veränderten Transportverhältnisse, die in der Abbildung 4.11 (C), über mehrere Experimente gemittelt, präsentiert werden.

Die mittleren Restproteinmengen nach Einsatz der jeweiligen siRNAs ist in (B) dargestellt. Diese Übersicht zeigte einen durchschnittlichen Proteingehalt von 6 % für alle Depletionsansätze, die rein gegen SEC62 durchgeführt wurden. Der Kombinationsansatz einschließlich der Depletion von Sec63 zeigte eine höhere Restproteinmenge, die bei 15 % lag. Der Gehalt von Sec63 unterschied sich je nach verwendeter siRNA. Die siRNA #5 zeigte einen mittleren Restproteingehalt von 13 %, während #7 geringfügig höher bei 20 % lag. Die Kombination beider siRNAs führte zu einer Reduktion von Sec63 auf nur noch 4 %. Die Doppeldepletion mit Sec62 ergab eine Restproteinmenge von nur noch 2 %.



**Abbildung 4.11:** Statistische Übersicht der Translokationsdefekte von ERj3 nach Kombinationsdepletion von *SEC62* und *SEC63*. Simultan zum Aussäen von 520.000, am Vortrag subkultivierter, HeLa-Zellen in 6 cm- Schalen, erfolgte die Transfektion von einer oder mehreren siRNAs. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Transfektionsprozedur wiederholt und die Zellpopulationen für weitere 24 h kultiviert (3.4.3.1). Anschließend erfolgte die Überexpression von *ERJ3* durch Transfektion des entsprechenden Plasmids (3.4.3.2) gefolgt von weiteren 24 h Inkubationszeit. Für die letzten 8 h wurde MG132 appliziert woran die Ernte der Zellen, sowie deren Lyse (3.2.1), angeschlossen wurde. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (3.2.2) getrennt und via Western Blot auf eine Membran transferiert (3.2.3). Durch Verwendung geeigneter Antikörper (Tabellen 3 und 4) wurden die Proteine immunologisch detektiert (3.2.4). (A) zeigt die verwendeten siRNA-Kombinationen sowie beispielhafte Blots der untersuchten Translokationkomponenten Sec63, Sec62 sowie  $\beta$ -Aktin. In (B) sind die mittleren Restproteinmengen von Sec62 und Sec63 unter den jeweiligen Depletionsbedingungen dargestellt, wobei die Anzahl der Experimente als (n) angegeben ist. (C) stellt eine Übersicht der mittleren Prozessierung von ERj3 nach Depletion von *SEC62* oder *SEC63* in Relation zur Verwendung von Kontroll-siRNA dar. (n) gibt die Anzahl der in diese Statistik einfließenden Experimente an. Die Sterne geben die Stärke der Signifikanz eines Effektes in Bezug auf die Kontrollzellen an.

In (C) ist eine statistische Darstellung der Prozessierungsraten von ERj3 nach den entsprechenden Depletionen dargestellt. Die Kontrolle gibt die bekannte hohe Translokationseffizienz von ERj3 mit 91 % wieder [97]. Die Verringerung von Sec62 durch siRNA #1 demonstriert die signifikante Reduktion der Translokation von ERj3, die nur noch 38 % betrug. Da die UTR siRNA einen weniger ausgeprägten Effekt auf die Prozessierung des Substrates ausübte als die zuvor dargestellte siRNA, wobei die Restproteinmengen gleich waren, scheint hier ein spezifischer Nebeneffekt die Translokation zu beeinflussen. Die Kombination beider siRNAs führte wiederum zum gleichen Gehalt an Sec62 und zeigte einen vergleichbaren Prozessierungswert wie die Einzeldepletion der siRNA #1.

Ebenso führten die verschiedenen siRNAs gegen Sec63 zu unterschiedlichen Prozessierungsraten von ERj3. Während die siRNA #5 mit einem Wert von 47 % eine Reduktion der Translokation um die Hälfte bewirkte, war für den Einsatz der zweiten siRNA nur noch eine Minderung auf 68 % erzielt. Die Kombination beider Oligonukleotide verringerte die Transporteffizienz zusätzlich auf nur noch 25 %, was fast der Hälfte der siRNA #5 entsprach. Diese Ergebnisse decken sich mit den erzielten Restproteinmengen von Sec63, die die gleiche Tendenz andeuten. In diesem Fall korreliert der verminderte Proteingehalt mit dem verursachten Translokationsdefekt. Zusätzlich konnte der additive Transportdefekt nach Doppeldepletion von Sec62 und Sec63 gegenüber der Arbeit von Schorr reproduziert werden [97].

Interessanterweise ist die Wahl der siRNA, die im Vergleich mit einer solchen, die gegen die identische mRNA gleiche Level an verbleibender Proteinmenge bewirkt, zur Beobachtung eines Einflusses auf die Proteintranslokation entscheidend. Die statistische Auswertung lieferte bei Einsatz der SEC62-siRNAs unterschiedliche hohe Verluste an prozessiertem ERj3, während die erzielten Restproteinmengen identisch waren. Ein synergetischer Effekt zur Verminderung der Prozessierung des Substrates durch Kombinationsdepletion von Sec62 konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind nicht konform mit der Beobachtung nach Depletion von Sec63, die einen Translokationsdefekt in Abhängigkeit der Restproteinmenge verursachte. Zusätzlich konnte der Proteingehalt von Sec63 weiter vermindert werden, indem beide siRNAs simultan appliziert wurden. Für Sec62 konnte keine weitere Reduktion durch Kombinationsdepletion erreicht werden, weswegen vermutlich kein zusätzlicher Transportdefekt dokumentiert werden konnte.

Augenscheinlich reichen kleine Mengen der Translokationskomponenten um einen Teil des Transportdefektes zumindest teilweise zu kompensieren. Es ist gelungen in diesem Experiment einen synergetischen Effekt zur weiteren Reduktion der Proteinmenge sowie zur Verringerung der Prozessierungseffizienz des Transportsubstrates zu erzeugen, indem zwei siRNAs gegen die gleiche mRNA kombiniert wurden.

## 4.5 Untersuchung von Transportsubstraten als DHFR-Fusionsproteine

In humanen Zellen spielt das Enzym Dihydrofolatreduktase (DHFR) eine unverzichtbare Rolle zur Aktivierung von Vitaminen, deren Wirkung essentiell zum Erhalt funktionaler Zellen ist [110]. Durch den Folsäure-Antagonisten Methothrexat (MTX), welcher auch zur Therapie von verschiedenen Krankheiten eingesetzt wird [111, 112], gelingt die Inhibierung der Translokation von DHFR durch Bindung an das nativ gefaltete Protein. Diese Eigenschaft kann molekularbiologisch genutzt werden, indem das Enzym über rekombinante Genexpression C-terminal an ein Protein von Interesse fusioniert wird, was in dieser Arbeit zum Studium des ER-Imports des kleinen Vorläuferproteins Apelin und des Cochaperons ERj3 dient. Durch Einsatz der Fusionsproteine in Kombination mit MTX wurde ein potentieller posttranslatinaler Transportmechanismus der Substrate untersucht.

Posttranslational transportierte Substrate liegen vollständig synthetisiert vor, bevor der Prozessierungsprozess einsetzt. Durch Zugabe von MTX verändert sich die Konformation von DHFR, woran aber nur dann gebunden werden kann, wenn der C-Terminus des Fusionsproteins bereits vollständig synthetisiert wurde. Dadurch wird eine raumgreifende Struktur angenommen, die den Durchtritt durch das Translokon verhindert [113]. Durch Untersuchung von Apelin-DHFR und ERj3-DHFR mit MTX kann somit, bei inhibierter Translokation, ihr potentiell posttranslationales Transportverhalten erkannt werden.

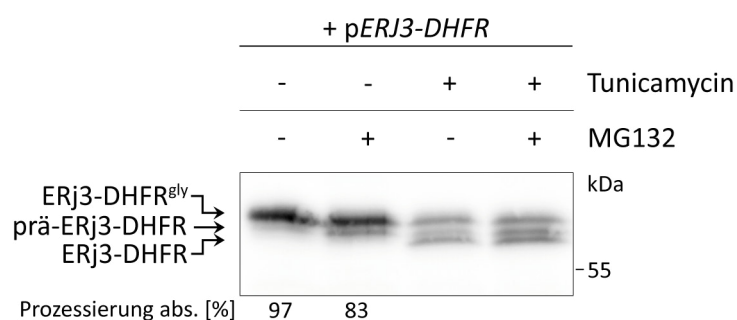
### 4.5.1 Das unglykoslierte prozessierte ERj3-DHFR ist unter Kontrollbedingungen nicht detektierbar

Zur Untersuchung des Transportprozesses von ERj3-DHFR, ist eine Charakterisierung seines Bandenmusters unerlässlich, um durch das Verhältnis von Vorläufer zu reifem Protein die Prozessierung zu quantifizieren.

Das wildtypische Substrat besitzt eine N-Glykosilierungsstelle, die durch Fusion mit DHFR weiter erhalten bleibt. Das Fusionsprotein ERj3-DHFR besitzt eine Molekularmasse von 62,2 kDa. Um das Bandenmuster zweifelsfrei identifizieren zu können, wurden Plasmid-transfizierte Zellen mit Tunicamycin, zur Hemmung der N-Glykosilierung, in Kombination mit MG132, zur Stabilisierung des Vorläufers, behandelt.

In Abbildung 4.12 ist der Western Blot nach Tunicamycin- und MG132-Behandlung gezeigt. In den ersten beiden Spuren ist noch kein Tunicamycin enthalten, weshalb die Modifikationen durch N-Glykosilierungen erfasst werden konnten. In der linken Spur waren die Proteasomen gleichzeitig noch aktiv. Neben einer intensiven Bande, die unter diesen Bedingungen nachweisbar war, wurde darunterliegend ein weiteres





**Abbildung 4.12:** Charakterisierung der detektierbaren Proteinformen von ERj3-DHFR. In 6 cm-Schalen wurden 1 Mio HeLa-Zellen, die am Vortag frisch kultiviert wurden, ausgesät. Die Zellen wurden gemäß dem Protokoll in Abschnitt 3.4.3.2 am darauffolgenden Tag mit Plasmid zur Überexpression von ERj3-DHFR transfiziert und inkubierten für 24 h. Nach 16 h wurden DMSO bzw Proteasominhibitor sowie Tunicamycin appliziert. Im Anschluss an deren Inkubation für 8 h, wurden die HeLa-Zellen abgelöst und ausgezählt. Nach dem Waschen und Zentrifugieren der Zellen, wurden die Zellpellets lysiert (3.2.1) und mittels SDS-PAGE (3.2.2) getrennt. Die Proteine wurden via Western Blot auf eine Membran transferiert (3.2.3) um diese mit geeignetem Antikörper immunologisch zu detektieren (Tabellen 3 und 4). Gezeigt ist der erhaltene Blot, der das Bandenmuster von ERj3-DHFR nach entsprechender Behandlung wiedergibt unter Angabe der Prozessierungsraten ohne Tunicamycin

sehr schwaches Signal verzeichnet. Durch Inhibition der proteasomalen Degradation gelang es dieses schwache Signal deutlich zu steigern, was auf ein zytosolisch lokalisiertes Protein, wie den unprozessierten Vorläufer, hindeutet. Die erste und dritte Spur unterscheiden sich präparativ im Zusatz von Tunicamycin, was eine weitere Bande, von geringerem Molekulargewicht als die beiden bereits Gezeigten, erscheinen ließ und gleichzeitig eine Abschwächung der obersten Bande bewirkte. Der Zusatz beider Reagenzien führte zur Detektierbarkeit des Signals aller drei hier auftretenden Proteine.

Auf Grund dieses Musters kann die oberste Bande einer modifizierten Proteinform mit N-Glykosylierung zugeordnet werden, die durch die Inhibition der posttranslationalen Modifikation mittels Tunicamycin in reduzierter Intensität detektierbar wurde. Simultan trat durch diese Behandlung die unterste Bande zum Vorschein, die mit dem geringsten Molekulargewicht dem prozessierten, aber unglykosylierten ERj3-DHFR entspricht. Die mittlere Bande war insbesondere nach Inhibition der proteasomalen Deradation nachweisbar, was sie als Vorläufer identifizierte. Nach dieser Zurordnung ist die Ermittlung des Verhältnisses zwischen Vorläufer und glykosilierter Proteinform möglich. Demnach nimmt das Glykoprotein bei aktivem proteasomalen Abbau 97 % des Gesamtsignals ein. Nach Applikation von MG132 wurde eine Translokationsrate von 83 % festgestellt.

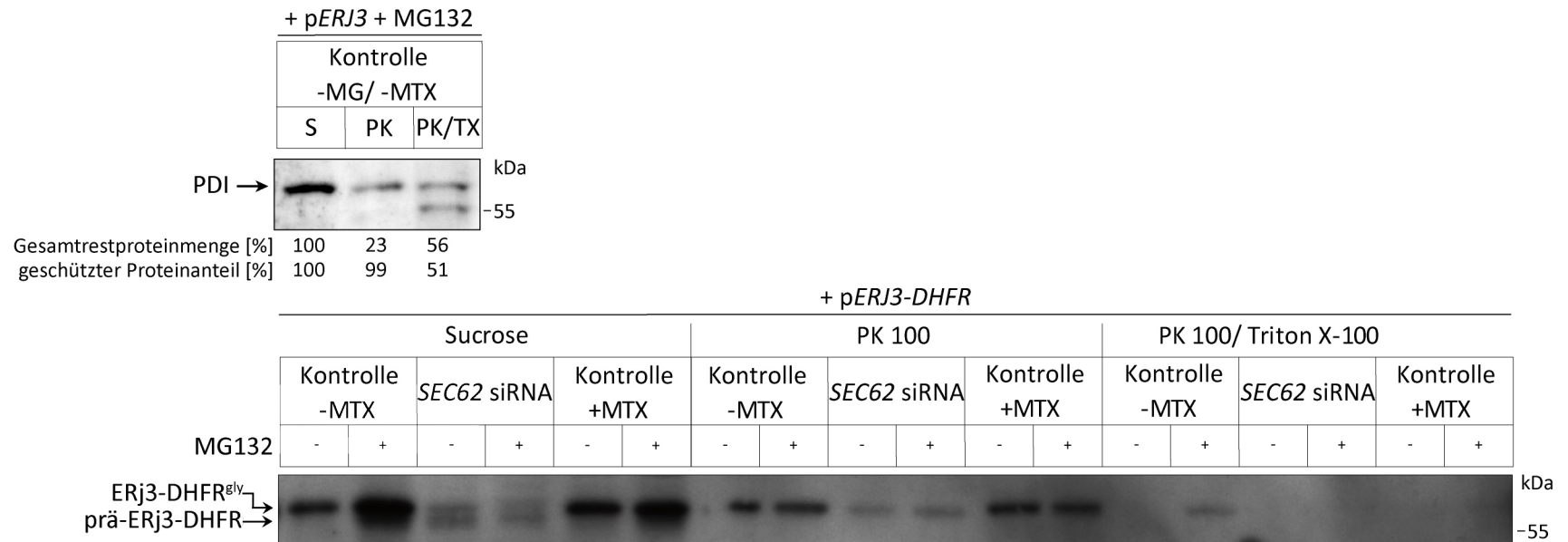
ERj3-DHFR zeigt, ähnlich dem wildtypischen ERj3, eine effiziente Translokation und nicht detektierbares, unglykosiliertes ERj3-DHFR unter physiologischen Bedingungen. Dabei können alle drei detektierbaren Banden den auftretenden Formen des Fusionsproteins eindeutig identifiziert werden.

### **4.5.2 Der Transport von ERj3-DHFR ist abhängig von Sec62 und verläuft cotranslational**

Die Sec61-assoziierten Membranproteine Sec62 und Sec63 wurden als beteiligte Translokationselemente am ER-Import von ERj3 nachgewiesen [97]. In Hefen konnte die Involvierung der Homologe als zusammenwirkender Komplex am posttranslationalen Transport charakterisiert werden. In Säugern ist dieser Zusammenhang nicht vollständig geklärt, da diese Komponenten auch am cotranslationalen Transport beteiligt sind [52, 61]. Daher wurde ERj3 als DHFR-Fusionsprotein untersucht, um seinen Transport als co- oder posttranslational zu identifizieren.

Des Weiteren ergab sich die Frage, ob diese Modifikation durch DHFR den Transport des wildtypischen Substrates beeinflusst. Die weitere Untersuchung mit MTX wäre damit hinfällig, da keine Erkenntnis über das Protein von Interesse in unverfälschter Weise gewonnen werden kann. Um dies zu prüfen, wurde das Transportverhalten des Fusionsprotein nach Depletion von Sec62, welches am Transport des ERj3 Substrates beteiligt ist, untersucht und mit der Prozessierung des Wildtypischen verglichen.

Dazu wurde zunächst Sec62 depletiert und anschließend das ERj3-DHFR-Fusionsprotein mittels Plasmid-getriebener Überexpression verstärkt synthetisiert. Nach Zugabe von MTX wird die Einnahme einer veränderten Konformation des DHFR-Anteils induziert, was bewirkt, dass im Falle eines posttranslationalen Imports dieser gehemmt wird. Hierzu wurde MTX, gegebenenfalls in Kombination mit MG132 oder DMSO, zur Kontrolle, in vorgewärmtem OptiMEM vorgemischt und in einer Endkonzentration von 25  $\mu$ M zu den Zellen gegeben.



**Abbildung 4.13:** Proteaseresistenz-Versuch nach Überexpression von *ERJ3-DHFR* mit MTX-Behandlung oder nach Depletion von *SEC62* zur Lokalisation von Vorläufer- und reifen Proteinformen und zur Identifizierung eines Translokationsdefekts. Gemäß des Protokolls unter 3.4.3.1 wurden Zellen ausgesät und mit siRNA transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen erneut transfiziert und für weitere 48 h kultiviert. Anschließend wurde das Plasmid gemäß 3.4.3.2 zugegeben und für weitere 16 h inkubiert. Für die letzten 8 h wurden die Zellen mit DMSO, MG132, MTX oder einer Kombination behandelt und anschließend geerntet. Die Zellsuspensionen wurden ausgezählt, gewaschen und permeabilisiert (3.5.2). Nach Einstellen der Zellkonzentration wurden die semipermeabilisierten Populationen zu je 2 Mio Zellen entweder mit Sucrose (S), PK 100 (PK) oder PK 100/ Triton X-100 (PK/TX) inkubiert. Nachfolgend wurden die Ansätze mit PMSF inkubiert und nach Zugabe von Lämmli-Puffer erhitzt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt (3.2.2) und nach dem Western Blot (3.2.3) immunologisch detektiert (Tabellen 3 und 4). Dargestellt sind ein exemplarischer Blot des lumenalen Markerproteins PDI mit den entsprechenden Restproteinmengen und die Blotdaten des Substrates.

In der Abbildung 4.13 sind die Daten des durchgeführten Experimentes gezeigt. Die berechneten Werte von PDI im gezeigten Experiment beziehen sich zum Einen auf den Gesamtproteinanteil, der auch die proteaseresistente Spaltform nach Degradation durch Proteinase K berücksichtigt. Zum Anderen wurde das Verhältnis zwischen der nativen und der fragmentierten Form von PDI berechnet. Im ersten Fall wurden die Werte mit denen der Probe nach Sucrose-Behandlung abgeglichen, die auf 100 % gesetzt wurde. In Abwesenheit des Detergenz war der geschützte Proteinanteil unverändert, was am Verhältnis von 99 % für PDI zu erkennen ist. Dem gegenüber steht die Fragmentierung von PDI nach Öffnung der Membranen wodurch nur noch ein Restproteingehalt von 51 % des ungespaltenen PDI detektierbar war.

Der Substratblot zeigt die Bandensignale der verschiedenen Ansätze von Sucrose, Proteinase K und zusätzlich dem Detergenz. Dabei wurden Populationen mit Kontroll-siRNA bzw. *SEC62*-siRNA manipuliert und im ersten Fall durch Zusatz von MTX unterschieden. Für alle Fraktionen wurde je eine Probe mit MG132 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Eine Quantifizierung war hier auf Grund der schlechten Trennung nicht möglich, weshalb nur qualitative Aussagen getroffen werden können, die optisch eindeutig erkennbar sind. Daher kann auch keine Berechnung der Restproteinmengen oder des geschützten Proteinanteils berechnet werden, da der zytosolische Vorläufer zwangsläufig mit einbezogen werden müsste, aber nach Zusatz von Protease der Degradation zugänglich ist und damit verdaut wird.

Die Sucrose-Ansätze unter Kontrollbedingungen zeigten das aus Abschnitt 4.5.1 bekannte Bandenmuster, wonach der Vorläufer erst durch Inhibierung der proteasomalen Degradation zu detektieren ist (vgl. „+“ und „-“ Spuren Kontrolle -MTX Sucrose für ERj3-DHFR in Abb. 4.13). Das Verhältnis zwischen Vorläufer und Glykoprotein war nur schwer erkennbar, aber die glykosilierte Proteinform scheint einen höheren Anteil darzustellen, übereinstimmend mit den Daten des vorangegangenen Abschnitts 4.5.1, der eine klarere Trennung bei einer Prozessierungsrate von 83 % wiedergab. Nach Depletion von Sec62 war die Gesamtproteinmenge sichtlich reduziert. Des Weiteren war eine Veränderung im Verhältnis zwischen Vorläufer und reifem Protein zu beobachten (vgl. Spuren „+“ und „-“ von *SEC62* siRNA Sucrose für ERj3-DHFR in Abb. 4.13). Die Relation des dominierenden Glykoproteins verschob sich zu Gunsten des Vorläufers, so dass beide Proteinformen mit ähnlich starkem Signal detektiert werden konnten. Diese Beobachtung demonstriert einen Verlust an Translokationseffizienz von ERj3-DHFR infolge der verringerten Sec62-Proteinmenge. Das Bandenmuster nach Zusatz von MTX war vergleichbar mit den detektierten Banden unter Kontrollbedingungen (vgl. Spuren „+“ und „-“ von Kontrolle +MTX Sucrose für ERj3-DHFR in Abb. 4.13). Hier war keine Veränderung des Verhältnis der beiden Proteinformen zu erkennen. Die Prozessierung von ERj3-DHFR war nicht beeinflusst von MTX, wodurch die Aussage getroffen werden kann, dass die Translokation von ERj3-DHFR über einen cotranslationalen Weg verläuft. Die Zugabe von Proteinase K veränderte das Bandenmuster aller Ansätze in gleicher Form (vgl.

Spuren „PK100“ für ERj3-DHFR in Abb. 4.13). Die untere Bande war nicht mehr zu detektieren, wohingegen das Glykoprotein in leicht verringerter Proteinmenge präsent war. Diese Daten sind konsistent verglichen mit dem geschützten Proteinanteil von PDI. Nach Zusatz des Detergenz waren auch ERj3-DHFR-Signale bis hin zum gänzlichen Verlust verringert (vgl. Spuren „PK100/Triton X-100“ für ERj3-DHFR in Abb. 4.13). Dies indiziert die Degradation des Glykoproteins nach Zugänglichkeit der Protease in das Lumen der Organellen.

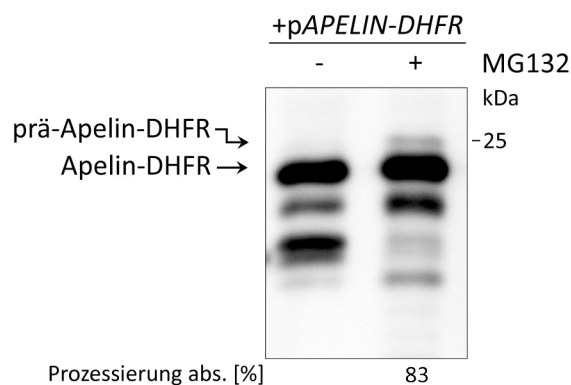
Die Proteasebehandlung unterstützte die Zuordnung des Proteinbandenmusters aus Abschnitt 4.5.1 und brachte die zusätzliche Information zur Lokalisierung der Proteinformen. Der Vorläufer ist demnach nur im Zytosol präsent, während das reife Protein geschützt, vermutlich im ER Lumen, vorliegt.

Zusammengefasst kann aus den erhobenen Daten die Beteiligung von Sec62 an der verringerten Prozessierung von ERj3-DHFR nachgewiesen werden. Weiterhin zeigt die Behandlung mit MTX keine modifizierte Translokation, was einen cotranslationalen Transport des Substrates indiziert.

### **4.5.3 Apelin-DHFR wird unter Kontrollbedingungen effizient transportiert**

Zum Einsatz von Apelin-DHFR als Transportsubstrat, ist die Zuordnung des Bandenmusters zur Identifizierung des Vorläufers nötig. So kann eine potentielle Verringerung des Transports an Hand des Verhältnisses zum reifen Protein ermittelt werden. Humanes Apelin besitzt ein Molekulargewicht von 8,6 kDa, welches sich nach Fusion mit DHFR auf etwa 30,2 kDa erhöht. Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und mit Plasmid zur Expression des Substrates transfiziert. Zusätzlich wurde Proteasominhibitor zugesetzt um den Vorläufer zu stabilisieren und seine Detektierbarkeit zu ermöglichen.

In Abbildung 4.14 ist der erhaltene Blot nach Expression von *APELIN-DHFR* unter Zusatz des Proteasominhibitors dargestellt. Die Blotsignale des Substrats sind auf einer Höhe knapp unterhalb der 25 kDa-Marke zu verzeichnen. Durch die Verwendung des Proteasominhibitors gelang es in der zweiten Spur eine Bande zusätzlich zu visualisieren, welche ohne den Inhibitor offenbar durch proteasomalen Abbau vollständig degradiert wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich, wie in der Abbildung markiert, bei der obersten Bande um den zytosolisch lokalisierten Vorläufer handelt, während die darunter befindliche Bande der translozierten, reifen Proteinform zuzuordnen ist. Zusätzlich vermittelt die Abbildung 4.14 einen ersten Eindruck der hohen Translokationseffizienz von Apelin-DHFR unter Kontrollbedingungen.

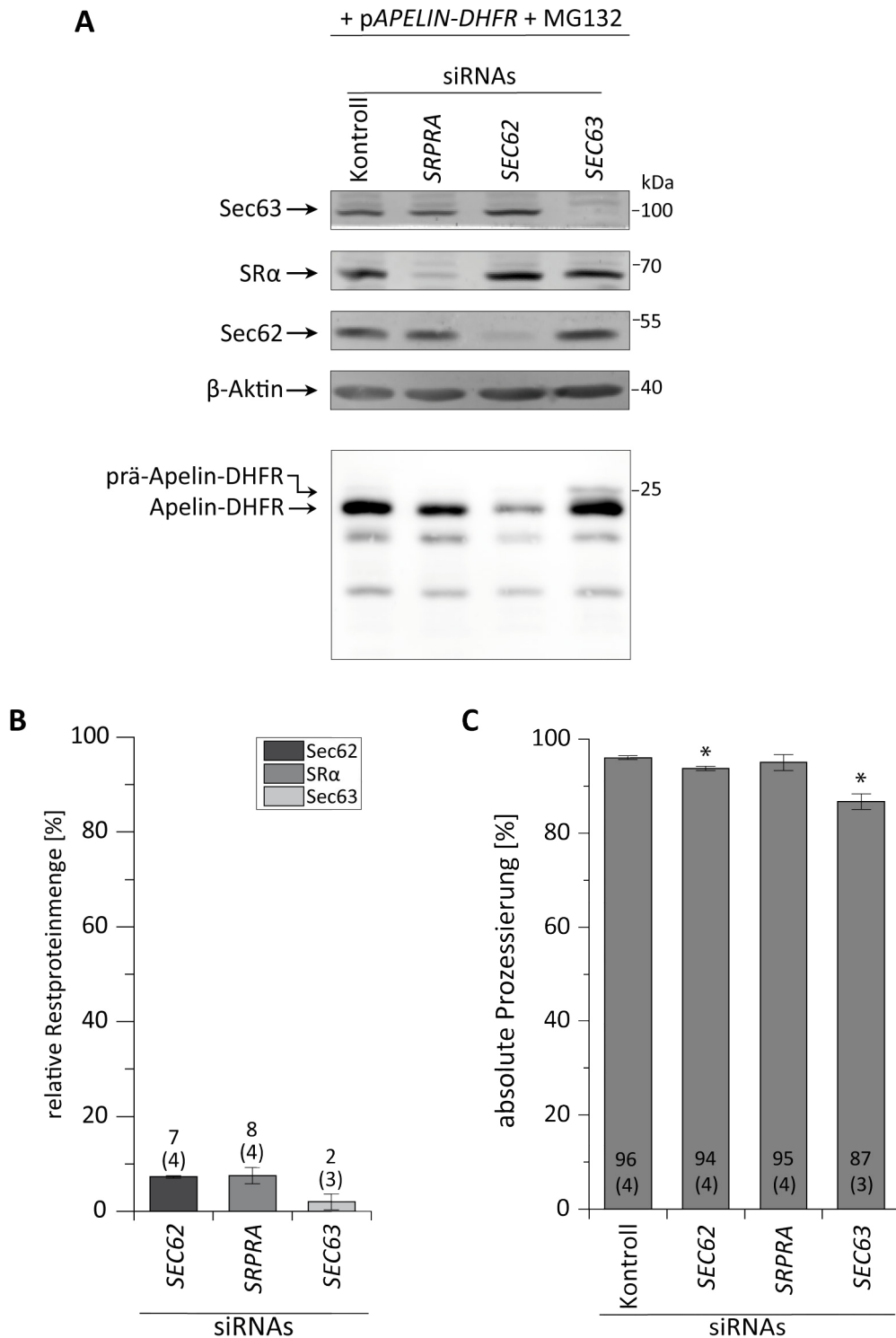


**Abbildung 4.14:** Etablierung der Detektion von Apelin-DHFR mit MG132. In 6cm-Schalen wurden 1 Mio HeLa-Zellen ausgesät, die am Vortag subkultiviert wurden. Nach 24 h folgte die Plasmidtransfektion (3.4.3.2) und die Zellen wurden für weitere 8 h kultiviert. Anschließend wurde den Zellen für 8 h MG132 oder DMSO appliziert. Nach einer Gesamtgenexpressionszeit von 16 h wurden die Zellen geerntet, ausgezählt und zu Zelllysaten aufgearbeitet (3.2.1). Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (3.2.2), gefolgt von der Durchführung eines Western Blots (3.2.3) und anschließender immunologischer Detektion (3.2.4) mittels Antikörper (Tabellen 3 und 4). Gezeigt ist der Blot des durchgeführten Experiments.

#### 4.5.4 Die Depletion von Sec63 vermindert die Translokation von Apelin-DHFR

In intakten Zellen fällt die Detektion von wildtypischem Apelin nach Plasmid-basierter Expression im kombinierten Einsatz von siRNA-Oligonukleotiden schwer. Die Signale nach Western Blot sind inkonsistent und oftmals schlecht detektierbar. Daher liegen zu seinem Transportverhalten diesbezüglich keine verwertbaren Daten vor. Nach *in vitro*-Experimenten zeigt sich das Protein als Substrat eines posttranslationalen Transportes [28]. Um das Substrat auch für Experimente in lebenden Zellen zugänglich zu machen, wurde es als rekombinantes DHFR-Konstrukt eingesetzt. Erste Studien über involvierte Translokationskomponenten wurden mit einem siRNA-basierten Ansatz durchgeführt, indem eine Stilllegung von *SEC62*, *SEC63* und *SRPRA* in HeLa-Zellen mit Plasmid-vermittelter Expression kombiniert wurde. Um die Proteasomen zu hemmen, wurde gleichzeitig MG132 appliziert.

Abbildung 4.15 stellt die erhaltenen Daten des Depletionsexperimente dar. In (A) sind beispielhafte Blots der entsprechenden stillgelegten Gene zur Kontrolle der erfolgreichen Depletion ihrer Produkte gezeigt. Die erhaltenen Signale wurden zunächst auf das zytosolische Referenzprotein  $\beta$ -Aktin bezogen und anschließend zur Kontroll-siRNA-Spur referenziert. Eine Übersicht über die gemessenen mittleren Restproteinmengen in den durchgeführten Versuchen ist in (B) dargestellt. Die Depletion von Sec62 bewirkte eine Proteinreduktion auf 7 %.  $SR\alpha$  zeigte eine Verminderung des Proteingehaltes auf nur noch 8 %, während für Sec63 ein Restproteinsignal von 2 % zu verzeichnen war.



**Abbildung 4.15:** Statistische Darstellung der Translokationsdefekte von Apelin-DHFR nach Depletion verschiedener ER-assoziiierter Translokationskomponenten. Simultan zum Aussäen von 520.000, am Vortrag subkultivierter, HeLa-Zellen in 6 cm-Schalen, erfolgte die Transfektion von einer oder mehreren siRNAs. Nach 24-stündiger Inkubation wurde eine weitere siRNA-Transfektion durchgeführt (3.4.3.1) und die Zellen für weitere 32 h kultiviert. Anschließend wurde zur Überexpression von Apelin-DHFR das entsprechende Plasmid transfiziert (3.4.3.2) und für weitere 16 h inkubiert. Für die letzten 8 h wurde

**Abbildung 4.15:** (Fortsetzung) zusätzlich MG132 appliziert. Im Anschluss an die Ernte der Zellen wurden diese lysiert (3.2.1), sowie mittels SDS-PAGE (3.2.2) getrennt, gefolgt von einem Western Blot (3.2.3). Durch Verwendung geeigneter Antikörper (Tabelle 3 und 4) wurden die Proteine immunologisch detektiert (3.2.4). In (A) ist das Transfektionsschema der siRNAs sowie beispielhafte Blots von Sec62, Sec63, SR $\alpha$ ,  $\beta$ -Aktin sowie von Apelin-DHFR dargestellt. In (B) sind die mittleren Restproteinmengen von SR $\alpha$ , Sec62 und Sec63 unter den jeweiligen Depletionsbedingungen dargestellt, wobei die Anzahl der Experimente als (n) angegeben ist. (C) zeigt eine Übersicht über die Prozessierung von Apelin-DHFR nach Depletion der jeweiligen ER-Translokonelemente im Vergleich zur Verwendung von Kontroll-siRNA. Die angegebenen Werte entsprechen dem jeweiligen Mittelwert der Translokation, wobei (n) die Anzahl der in diese Statistik einfließenden Experimente darstellt. Die Stärke der Signifikanz des Effektes gegenüber Kontrollzellen ist durch Sterne dargestellt.

Unterhalb der Kontrollen in (A) sind die erhaltenen Signale von Apelin-DHFR dargestellt. Die Immunodetektion zeigte die reife Bande in starker Intensität sowie den nur schwach nachweisbaren Vorläufer. Bei Verwendung der Kontroll-siRNA war eine absolute Prozessierung von 96 % zu verzeichnen, was den bereits angesprochenen effizienten Transport aus Abbildung 4.14 widerspiegelt. Eine statistische Darstellung der reproduzierten Experimente kann der Grafik in (C) entnommen werden. Aus dieser ist eine Prozessierung von 94 % nach Verminderung von Sec62 zu lesen, was den Berechnungen zu Folge einer signifikanten Verminderung entspricht. Allerdings war der Transportverlust so minimal, dass die Abwesenheit von Sec62 kaum einen Effekt auf die Prozessierung des Substrates hat. Wurde eine siRNA gegen *SRPRA* eingesetzt, verminderte sich der Import weiterhin nur wenig. Die Depletion von Sec63 war einzig in der Lage ein sichtbares Signal für den Vorläufer zu erzeugen, wie auch dem Blot entnommen werden kann. Der Verlust an Transport war immer noch sehr gering und belief sich auf 87 %. Wie für Sec62 handelt es sich bei dieser Veränderung der Prozessierungsrate um einen signifikanten Effekt. Der Transportverlust war zwar sehr schwach, dennoch reproduzierbar nachweisbar. Es ist daher nicht auszuschließen dass Sec63 am Transport des Substrates beteiligt ist, wobei seine Abwesenheit offenbar teilweise kompensiert werden konnte.

Für keine der getesteten Komponenten kann durch ihrer Reduktion eine erhebliche Verminderung der Prozessierung von Apelin-DHFR detektiert werden, wobei Sec63 den stärksten Effekt ausübt. Damit ist eine Beteiligung der Komponenten am ER-Import des Substrates nicht eindeutig nachweisbar.

## 4.6 Studien zur Translokation von Sil1

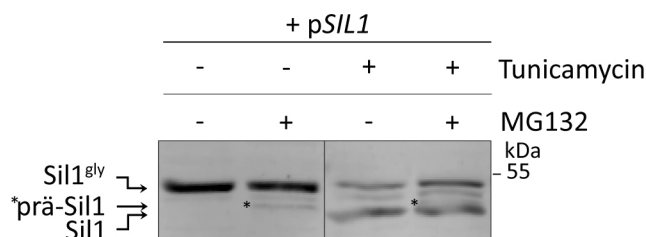
Als ER-luminales Protein und funktionaler Nukleotidaustauschfaktor, stellt Sil1 einen bedeutenden Bestandteil zur Erhaltung von Zellfunktionen dar. An Hand von Massenspektrometriedaten von Patientenzellen mit erniedrigtem TRAP $\gamma$ - und  $\delta$ -Gehalt wurde eine Verringerung des endogenen Sil1-Gehaltes nachgewiesen. Dieses Phänomen konnte durch Western Blots zur Darstellung von endogenem Sil1-Gehalt nach Depletion der  $\beta$ -Untereinheit des TRAP-Komplexes ebenfalls beobachtet werden



(Johanna Dudek, Persönliche Mitteilung). Die Depletion von TRAP $\beta$  führt zur Instabilisierung des gesamten TRAP-Komplexes [114]. Daher stellte sich die Frage, ob der Sec61-assoziierte Komplex an der Translokation von Sil1 in das Lumen des ER beteiligt ist. Weiterhin wurde innerhalb dieser Arbeit die Frage bearbeitet, ob Sil1 ein Sec63- oder SRP-abhängig transportiertes Substrat darstellt.

#### 4.6.1 Unter Kontrollbedingungen ist das unglykosilierte reife Sil1 nicht darstellbar

Da Sil1 in Transportexperimenten in das Lumen des ER untersucht wurde, ist die Nachweisbarkeit des Vorläufers relevant. Um das Bandenmuster des Glykoproteins literaturgemäß reproduzieren zu können [68] und damit der Analyse zu eröffnen, bot sich eine Behandlung der Plasmid-transfizierten Zellen mit Tunicamycin an. Erwartungsgemäß wurden die N-Glykolisierungen so unterdrückt, was sich im Bandenmuster nach Auftrennung mittels SDS-PAGE als verkürztes Protein widerpiegelte. Zur Realisierung dieses Experiments wurden HeLa-Zellen, nach einer Transfektion des Plasmids zur Überexpression und damit vermehrten Synthese von Sil1, mit Tunicamycin und Proteasominhibitor behandelt, um die unterschiedlichen Banden zuzuordnen.



**Abbildung 4.16:** Identifizierung des Bandenmusters von Sil1 mittels Tunicamycin. 1 Mio HeLa-Zellen, vortags frisch kultiviert, wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und das Plasmid transfiziert (3.4.3.2). Nach 16-stündiger Inkubation wurden DMSO bzw. MG132 sowie Tunicamycin appliziert. Nach weiteren 8 h Kultivierung und einer Gesamtgenexpressionszeit von 24 h, wurden die HeLa-Zellen abgelöst und ausgezählt. Die Zellen wurden gewaschen und zentrifugiert, sowie anschließend lysiert (3.2.1). Die Trennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (3.2.2), gefolgt von Western Blot (3.2.3) und immunologischer Detektion (3 und 4) mittels Antikörper. Gezeigt ist das erhaltene Bandenmuster nach Western Blot von Sil1 nach entsprechender Behandlung. Zur besseren Übersicht wurden die Banden von prä-Sil1 mit einem \* gekennzeichnet.

Im gezeigten Experiment in Abbildung 4.16 war in den ersten beiden Spuren noch kein Tunicamycin zugegen, weswegen N-Glykosilierungen erfasst werden konnten. Ohne MG132 war nur eine Bande detektierbar. Im direkten Vergleich des Größenmarkers zeigte sich unter Bedingungen des proteasomalen Abbaus eine einzige prominente Bande auf Höhe der 55 kDa-Marke. Die Zugabe des Proteasominhibitors bewirkte die Detektierbarkeit eines zusätzlichen Signals unterhalb der vorher gezeigten Bande, die damit ein Protein von geringerer molekularer Masse darstellte. Nach

Vergleich zwischen der ersten und dritten Spur, die die mit Tunicamycin behandelte Population darstellt, wurde ein hoher Verlust der oberen Bande zu Gunsten eines deutlich kleineren Proteins sichtbar. In gleichzeitiger Anwesenheit von MG132 und Tunicamycin erschien auf gleicher Höhe wie in der zweiten Spur, in geringer Intensität ein zusätzliches Signal.

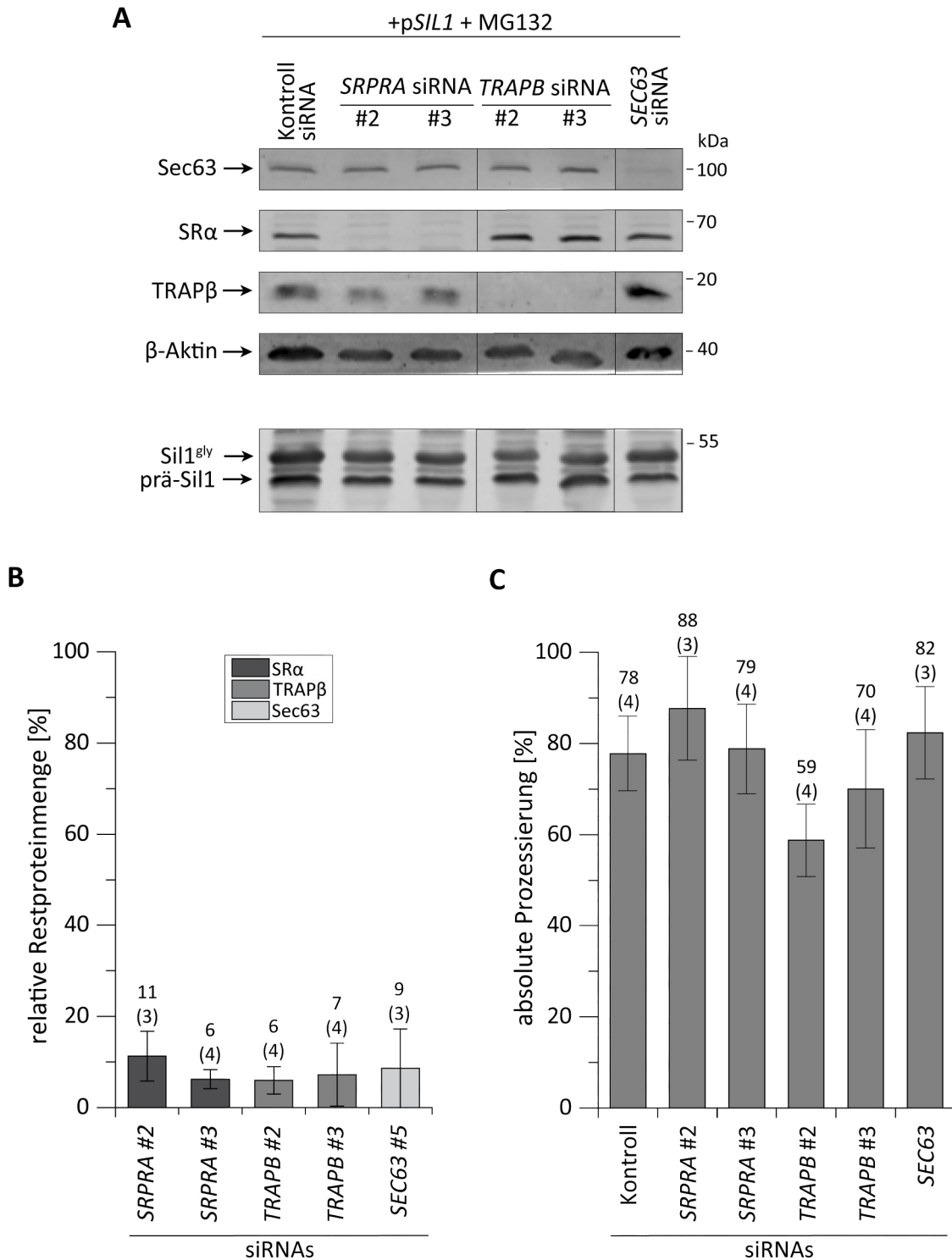
Demnach können für Sil1 drei Banden zugeordnet werden, wobei die oberste Bande in allen Proben nachweisbar war und durch Zugabe an Tunicamycin an Intensität verlor. Auf Grund des höchsten Molekulargewichts und des Signalverlustes nach Inhibierung der N-Glykosylierung, repräsentiert diese Bande das Glykoprotein. Der verringerte, aber nicht vollständige Verlust an Intensität spricht für eine unvollständige Wirkung von Tunicamycin. Dennoch wurde durch die Applikation ein weiteres Signal hervorgerufen. Diese Analogie stellt die unterste Bande als unglykosyliertes, aber prozessiertes Sil1 dar. Dicht darüber war eine Bande nur nach Inhibition der proteasomalen Degradation nachweisbar, welcher Umstand, unter Berücksichtigung des Molekulargewichts, auf den Vorläufer schließen lässt. Somit konnte das bekannte Bandenmuster reproduziert werden [68]. Dabei ist das unglykosylierte prozessierte Sil1 unter Kontrollbedingungen nicht detektierbar.

#### **4.6.2 Die Verminderung von TRAP $\beta$ reduziert die Translokationseffizienz von Sil1**

Nach den Ergebnissen der massenspektrometrischen Untersuchungen mit den erhaltenen Resultaten hinsichtlich verringertem Proteingehalt von Sil1 nach Reduktion zweier Untereinheiten des TRAP-Komplexes (Johanna Dudek, persönliche Mitteilung), stellte sich die Frage der Rolle dieses Oligomers am ER-Import von Sil1. Diese Fragestellung kann auf Proteinebene mit entsprechend konzeptionierten Stilllegungs-Experimenten, unter Berücksichtigung einer Veränderung der Verhältnisse der verschiedenen Sil1-Proteinformen, studiert werden. Die Zuordnung des Bandenmusters ermöglichte den Einsatz von Sil1 in siRNA-basierten Experimenten zur Beantwortung der Frage nach seiner Abhängigkeit von TRAP $\beta$ , sowie von SR $\alpha$  und Sec63.

Dazu wurden HeLa-Zellen zunächst mit siRNA und anschließend mit *SIL1*-Plasmid zur Überexpression transfiziert und mit MG132 behandelt. Sowohl für TRAP $\beta$  als auch für SR $\alpha$  wurden jeweils zwei siRNAs eingesetzt, um unspezifische Nebeneffekte einer siRNA ausschließen zu können.

In Abbildung 4.17 sind in (A) unter dem Depletionsschema exemplarische Blots zur Kontrolle der Restproteinmengen von Sec63, SR $\alpha$  und TRAP $\beta$ , nach deren Reduktion durch entsprechende siRNA-Applikation, sowie dem zytosolischen Referenzprotein  $\beta$ -Aktin dargestellt. Die zugehörigen Werte wurden densitometrisch ermittelt und nach Abgleich mit dem Signal von  $\beta$ -Aktin wurde die Kontrollspur auf 100 % sowie die Restproteinmengen relativ dazu gesetzt. Die gemittelten Werte über



**Abbildung 4.17:** Statistische Darstellung der Translokationsdefekte von Sil1 nach Depletion verschiedener ER-assoziiierter Translokationskomponenten. Simultan zum Aussäen von 520.000, am Vortrag subkulturierter, HeLa-Zellen in 6 cm-Schalen, erfolgte die Transfektion von einer oder mehreren siRNAs, die am Folgetag wiederholt wurde (3.4.3.1). Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Kulturen zur Überexpression von Sil1 mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert (3.4.3.2) und für weitere 24 h kultiviert. Für die letzten 8 h wurde zusätzlich MG132 appliziert. Im Anschluss an die Ernte der Zellen folgte deren Lyse (3.2.1), sowie die Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.2), gefolgt von Western Blot (3.2.3). Durch Verwendung geeigneter Antikörper

**Abbildung 4.17:** (Fortsetzung) (Tabellen 3 und 4) wurden die Proteine immunologisch detektiert (3.2.4). In (A) ist das Transfektionsschema der siRNAs sowie beispielhafte Blots der untersuchten Translokationselemente Sec63, SR $\alpha$ , TRAP $\beta$  sowie  $\beta$ -Aktin dargestellt. (B) zeigt eine grafische Darstellung der relativen Restproteinmengen der Translokationselemente nach der Depletion ihrer entsprechenden Gene. (C) stellt eine Übersicht über die Prozessierung von Sil1 nach Depletion der ER-Translokationselemente im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen dar. Es sind jeweiligen mittleren Prozessierungsraten angegeben, wobei (n) die Anzahl der Experimente darstellt.

mehrere Experimente sind in der statistischen Grafik unter (B) dargestellt. Die Restproteinmengen beliefen sich im Mittel auf maximal 11 %, was einer hohen Depletionseffizienz entspricht.

Zu Veranschaulichung der Translokation von Sil1, ist unter (A) ein Substratblot gezeigt, der die Prozessierung darstellt. Die Daten wurden durch Bildung des Quotienten der prozessierten Proteinmenge und des gesamten detektierten Signals der Sil1-Proteinbanden erhalten. Die Translokation von Sil1 unter Kontrollbedingungen betrug 78 % und lag damit im mittleren Bereich, verglichen mit bereits getesteten Substraten. Unter Kontrollbedingungen war die reife, unglykosylierte Form von Sil1, welches es in Abbildung 4.16 detektiert werden konnte, nicht nachweisbar. Zur Sicherstellung dieser Beobachtung und um die Zuordnung der Banden zu erleichtern, wurden auf das Polyacrylamidgel zusätzlich die entsprechenden Proben aus dem vorangegangenen Abschnitt 4.6.1 mit aufgetragen. Diese sind in dem dargestellten Blot nicht gezeigt.

Die absoluten Prozessierungsraten stellen repräsentative Werte dar, die der statistischen Darstellung unter (C) entnommen werden können. Diese liefern die entsprechenden Mittelwerte der wiederholten Experimente. Die Depletion von SR $\alpha$ , unter separater Verwendung beider siRNAs, zeigte ähnliche Prozessierungsraten wie unter Kontrollbedingungen. Die siRNA #2 zeigte eine leicht erhöhte Translokation, was eine Schwankung darstellt. Die Reduktion der  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptor-Komplexes wurde von Sil1 toleriert, unabhängig davon welche der beiden siRNAs verwendet wurde. Somit konnte eine Involvierung dieser Targeting-Komponente am Transportprozess von Sil1 und gleichsam ein SRP-abhängiger Transport nicht festgestellt werden.

Die Reduktion von TRAP $\beta$  unter Verwendung der #2 siRNA erzeugte einen Verlust an transportiertem Substrat um 20 %. Mit diesem Ergebnis entsteht der Eindruck einer Beteiligung von TRAP $\beta$  am ER-Import von Sil1. Im Unterschied dazu zeigte die Verringerung von TRAP $\beta$  durch die siRNA #3 nur eine Minderung der Translokation auf 70 %. Jedoch stellten sich beide Ergebnisse als nicht signifikant dar. Dennoch war in beiden Fällen eine geringe Verminderung des ER-Imports zu verzeichnen, wodurch die Frage nach einer Beteiligung des TRAP-Komplexes zur Translokation von Sil1 nicht vollständig geklärt werden konnte. Die Abwesenheit von TRAP $\beta$  scheint die Effizienz der Translokation von Sil1 zu beeinträchtigen. Ebenso wie für SR $\alpha$ , war die Reduktion von Sec63 nicht im Stande die Prozessierungsraten des

Substrates zu beeinflussen, weshalb seine Beteiligung am ER-Import des Substrates nicht festgestellt werden kann.

Die erhobenen Daten deuten auf eine Beteiligung von TRAP $\beta$  am ER-Import von Sil1 hin, was durch den geringen Verlust an transportiertem Substrat erkennbar ist. Diese Minderung konnte offenbar durch bisher nicht erfasste Mechanismen teilweise kompensiert werden, was den hier gezeigten Translokationsverlust zur Folge hatte. Gleichzeitig zeigte die Abwesenheit von SR $\alpha$  und Sec63 keine Veränderung der Transportraten. Dies lässt auf einen potentiell SRP- sowie Sec63-unabhängigen Transport vermuten.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Der SR-Komplex unterstützt die Translokation von PRL, aber offenbar nicht von ERj3

Während der cotranslationalen Translokation von Proteinen in das ER stellt das Zusammenspiel aus SRP und seinem dimeren Rezeptorkomplex eine zentrale Rolle dar. Nach der Bindung von SRP an den Komplex aus Ribosom und naszierender Kette ("ribosome-nascent chain complex"; RNC) über die Signalsequenz des Polypeptids, erfolgt im nächsten Schritt die Bindung des SRP-RNC-Komplex an den SRP-Rezeptor, der sich als heterodimerer Komplex aus der peripheren  $\alpha$ -Untereinheit und dem Translokon-assoziierten SR $\beta$  zusammensetzt und den SRP-RNC-Komplex zielgerichtet zur ER-Membran führt [26, 115, 116]. Einige Daten belegen die Inhibierung einer Translokation von Substraten, die diesen Transportweg nutzen, durch Verringerung oder Deletion von SR $\alpha$  oder beteiligten Untereinheiten des SRP [43, 117, 118, 119]. In beiden Fällen schlägt die Bindung aus des SRP-RNC-Komplex an die Rezeptoreinheit fehl, was einen ineffizienten ER-Import des Substrates zur Folge hat. Ein so verursachter Translokationsdefekt dient als hinreichendes Kriterium zur Notwendigkeit eines intakten SRP-Systems. Da die Möglichkeit kompensierender Effekte bei Abwesenheit einer der Komponenten besteht, wodurch der Transport weiterhin aufrecht erhalten wird, ist dieses Merkmal nicht ausreichend für den Ausschluss eines Substrates, diesen Weg nutzen zu können. Um potentiell SRP-unabhängige Substrate dahingehend zusätzlich abgrenzen zu können, erfolgte innerhalb dieser Arbeit die Depletion von SR $\beta$  sowie des ganzen SR-Komplexes in intakten Zellen. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode zur erfolgreichen Depletion von SR $\beta$  mittels siRNA Transfektion etabliert (Abschnitt 4.1.1). Die Daten zeigten, dass die Verwendung der *SRPRB*-siRNA nicht nur den Gehalt der membranständigen  $\beta$ -Komponente reduziert, sondern simultan den von SR $\alpha$  verringert (Abschnitt 4.1.3). Der Komplex des SR basiert auf einer Interaktion der peripheren  $\alpha$ -Untereinheit mit der membranverankerten  $\beta$ -Komponente. Daher ist eine Destabilisierung von SR $\alpha$  durch die fehlende  $\beta$ -Untereinheit denkbar, was die Reduktion von beiden Proteinen nach Stilllegung von *SRPRB* erklären kann.

Die Untersuchung der Translokation von PRL in Abhängigkeit von SRP wurde bereits mehrfach durch *in vitro*-Methoden, wie auch in intakten Zellen, untersucht. Dabei wurde erkannt, dass der Translokationsweg über SRP für das Substrat eine zentrale Rolle spielt [43, 44, 96, 120]. Theis zeigte mittels *in vitro*-Experimenten in Abwesenheit von SR $\alpha$  eine Reduktion des Transport von PRL, was Schorr in intakten Zellen bestätigte [97, 109].

In der vorliegenden Arbeit wurde die zuvor etablierte Methode zunächst ein-

gesetzt, um den Transport des Substrats PRL zu untersuchen. Dabei wurden die Komponenten des SR-Komplex separat wie auch kombiniert depletiert. Dies diente als Kontrolle, dass bei einem SRP-abhängig transportiertem Substrat des cotranslationalen Transports auch tatsächlich ein Translokationsdefekt nach Depletion des SR-Komplexes erkennbar war. In Abwesenheit von SR $\alpha$  wurde eine signifikante Reduktion der Translokationseffizienz detektiert (Abb. 4.5). Die Beteiligung der peripheren  $\alpha$ -Untereinheit des SR-Komplex wurde in ersten Experimenten auch auf sekretorischer Ebene gezeigt, indem das Nährmedium während der Ernte separat abgenommen und mittels Ammoniumsulfatfällung untersucht wurde (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis von PRL im Zellüberstand gelang nicht konsistent in den Kontrollproben, weshalb die Daten bislang nicht reproduzierbar vorliegen und nur eine Tendenz diskutiert werden kann. Der Zellüberstand zeigte eine verminderte Menge an sezerniertem PRL gegenüber den Kontrollzellen, was die vorherigen Ergebnisse eines defizienten Transports in Abwesenheit von SR $\alpha$  untermauert. Die Anwendung dieses experimentellen Modells führt nach Depletion der  $\alpha$ -Untereinheit zu einem Translokationsdefekt des Kontrollsubstrats, womit es zur Untersuchung weiterer Transportsubstrate angewendet werden kann.

In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss von SR $\beta$  mittels Depletion untersucht, wobei keine Verringerung des Transportes von PRL nachgewiesen werden konnte. Weder konnte eine Beeinträchtigung des Transportprozesses nach Depletion von SR $\beta$  nachgewiesen werden, noch eine zusätzliche Verringerung der Effizienz in Abwesenheit des gesamten Rezeptorkomplexes (Abb. 4.5). Da die Rezeptorkomponenten als Einheit betrachtet werden, stellt sich die Frage, wieso ein verringerter Gehalt der  $\beta$ -Untereinheit die Translokation nicht beeinträchtigt, wohingegen die Abwesenheit von SR $\alpha$  einen Defekt hervorruft. Diese Beobachtung war auf Grund der hohen Restproteinmengen nicht überraschend (Abb. 4.5). Die Reduktion der  $\beta$ -Untereinheit erreichte nur einen mittleren Restproteingehalt von 27 % in den betrachteten Transportexperimenten (Abb. 4.5). Eine entsprechende Kombination zweier siRNAs gegen *SRPRB* erreichte nur eine geringe Verbesserung des Depletionseffekts (Abschnitt 4.1.2), während in einem anderen Fall, zur Depletion von Sec63, die Verwendung von zwei siRNAs zu einer deutlichen Verbesserung führte, was sich dort auch phänotypisch auswirkte (Abb. 4.11). Aus der Literatur geht hervor, dass die membranständige Untereinheit gegenüber der peripheren Komponente im zweifachen molaren Verhältnis vorliegt und die Bildung eines funktionalen SRP-Rezeptors in GTP-Abhängigkeit durch SR $\beta$  reguliert wird [47, 121]. Daher ist die Depletion möglicherweise nicht ausreichend, um einen Effekt auf die Translokation zu verursachen oder die Bildung eines stabilen SR-Komplexes entsprechend zu verhindern. Die Vermutung liegt nahe, dass genügend SR $\beta$  zur Verfügung steht um mit der  $\alpha$ -Untereinheit eine ausreichende Anzahl an funktionalen Komplexen zu bilden und damit den ER-Import von PRL aufrecht zu erhalten. Es wurde nach Depletion von SR $\beta$  ein zusätzlicher Effekt der Minderung von SR $\alpha$  beobachtet, wobei die Restproteinmengen der peripheren

Untereinheit 49 % betragen. Die Transportexperimente zeigten einen Restgehalt von 6 % von SR $\alpha$  und erzeugten einen Translokationsdefekt hinsichtlich PRL. Daher ist davon auszugehen, dass die Limitierung zur Detektion eines entsprechenden Effektes zwischen 6 % und 49 % Restgehalt an SR $\alpha$  liegt. Eine Regulation der Proteinmengen anderer, in dieser Arbeit untersuchter, Translokationselemente durch Minderung des SR $\beta$ -Gehaltes konnte nicht beobachtet werden.

Eine direkte SR $\beta$ -Abhängigkeit des Transports von PRL wurde somit hier nicht nachgewiesen. Jedoch gestaltet sich die Interpretation der Experimente sowie deren Vergleich auf Grund der größeren Restproteinmengen und Schwankungen im Gehalt von SR $\beta$ , und daraus resultierend von SR $\alpha$ , schwierig. Dennoch konnte die bekannte Abhängigkeit von SR $\alpha$  bestätigt werden, nicht aber von SR $\beta$ . PRL fungierte in dieser Arbeit daher als SRP-abhängiges Kontrollprotein, das zum Vergleich der Translokation weiterer Substrate diente. Somit dient das Stilllegungs-Modell dazu SR $\alpha$ -abhängig transportierte Substrate zu identifizieren. Eine generelle Aussage über eine SRP-Rezeptor- oder SR $\beta$ -Abhängigkeit ist jedoch nicht möglich.

Auch für ERj3 wurde in dieser Arbeit der Einfluss des SR-Komplex auf seinen ER-Import getestet. Unter den Depletionsbedingungen zur Verringerung der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheit des SR-Komplex ist keinerlei Einfluss der Komponenten auf die Prozessierung des Substrates festzustellen (Abb. 4.10). Durch das verwendete Stilllegungs-Modell kann zur SR $\beta$ -Abhängigkeit des Transports von ERj3 keine Aussage gemacht werden. Eine Abhängigkeit von SR $\alpha$  wird als unwahrscheinlich erachtet. Diese These wird von ähnlichen Beobachtungen von Schorr gestützt, der ebenfalls keine SR $\alpha$ -Abhängigkeit festgestellt hat [97]. Interessanterweise wurde für ERj3 mittels *in vitro*-Analysen ein Translokationsdefekt in Abwesenheit von SR $\alpha$  beobachtet [109]. Dieser Effekt wird in der angegebenen Arbeit allerdings auch nur als Ausweichroute angenommen, da der bevorzugte Transportweg nicht zur Verfügung stehe. Des Weiteren beobachtete Theis einen endogenen ERj3-Gehalt in intakten Zellen, der unbeeinflusst von einer Depletion von SR $\alpha$  blieb. Zusätzlich beschrieb sie nach entsprechender Depletion eine unveränderte Menge an ERj3 gegenüber den Kontrollzellen trotz induziertem ER-Stress, welches als UPR reguliertes Substrat bekannt ist [91]. Die in dieser Arbeit generierten Daten stehen im Einklang mit Ergebnissen aus den Vorarbeiten, was die These einer SRP-unabhängigen Biogenese von ERj3 in intakten Zellen bekräftigt.

Die Limitierung der Transportexperimente zeigt sich in der schwierigen Reduktion von SR $\beta$  nach entsprechender siRNA-Transfektion. Die Etablierung der Methode zur Depletion der SR-Untereinheit zeigte zunächst stabile Restproteingehalte unter 20 %. Diese wurde ohne Zusatz einer Plasmid-vermittelten Expression durchgeführt, welche für die Transportexperimente der Substrate aber notwendig ist. Die Kombination beider Methoden kann hier zu einer Beeinflussung des Systems führen, die sich dann negativ auf die Funktionalität der siRNA auswirkt. Zur Absicherung der Interpretation eines SR $\beta$ - bzw. SRP-unabhängigen oder -abhängigen Transportes von



ERj3 und PRL, könnte in weiterführenden Experimenten diese Fragestellung unter Einbezug des CRISPR-Systems betrachtet werden. Zum Einsatz dieser Methode ist unerlässlich zu prüfen, ob eine Deletion des SR-Komplex oder der  $\beta$ -Untereinheit in der verwendeten Zelllinie letal ist. Aus der Literatur sind hierzu keine Daten bekannt. Der Einsatz von RNA-Interferenz zur Verringerung der Proteingehalte ist, wie deutlich dargestellt, limitiert. Die Verwendung einer CRISPR-vermittelten Genrepression (CRISPR = Clustered regularly interspaced plindromic repeats) ermöglicht die Züchtung einer stabilen Zelllinie, die anstelle eines Herunterregulierens einen echten „knock-out“ erzeugt. Dabei wird ein Doppelstrangbruch bewirkt, der durch einen DNA-Reparatur-Mechanismus, sogenanntes nicht-homologes „end joining“, eine Deletion erzeugt [122, 123]. Mit Hilfe eines solchen Systems könnte die getrennte Betrachtung von SR $\beta$  und SR $\alpha$  sowie ihrer Beteiligung während des Substrattransportes beobachtet werden. Diese Methode eröffnet die Möglichkeit den Rezeptorkomplex effizient zu löschen und das Verhalten der potentiell abhängigen und nicht-abhängigen Substrate zu untersuchen, sowie Hinweise auf alternative Translokationswege zu sammeln. Eine Interaktion der  $\beta$ -Untereinheit mit anderen Membranproteinen ist nicht auszuschließen, da seine Funktion nicht an die Integration seines N-terminalen Membranankers geknüpft ist, sondern eine Rekrutierung des SRP-RNC zur ER-Membran auch erfolgt, wenn es nicht membrangebunden vorliegt [121, 124]. Um entsprechende Interaktionspartner zu identifizieren bieten sich mit Methoden wie Quervernetzungsstudien, Proteomanalysen oder siRNA-Screening-Untersuchungen.

## **5.2 Sec63 unterstützt den SRP-abhängigen Transport von PRL**

Die Resttranslokation von PRL in Abwesenheit von SR $\alpha$  deutet auf eine zusätzliche Komponente oder einen alternativen Translokationsweg hin. In der vorliegenden Arbeit wurden daher fortsetzender Depletionsexperimente, zur Ermittlung eines SRP-unabhängigen Transportweges oder weiteren Translokation-assoziiierter Proteinen zur Unterstützung der SRP-abhängigen Transports von PRL, durchgeführt.

Das sekretorische Protein PRL ist als cotranslationales und SRP-abhängig transportiertes Substrat bekannt. Weiterhin wurde der Einfluss von Sec62 untersucht, dessen Beteiligung am ER-Import nicht nachgewiesen werden konnte [43, 96, 108, 109]. Der SR-Komplex ist zentraler Bestandteil zum Transport von PRL, dennoch wurde in Abwesenheit der  $\alpha$ -Untereinheit eine Resttranslokation von 35 % detektiert (Abschnitt 5.1). Dies deutet auf kompensierende Effekte und alternative Translokationswege hin, die bislang in intakten Zellen nicht bekannt sind. Daher wurde das Substrat in Transportexperimenten auf einen Sec63-abhängigen Transport getestet, um Aufschluss über dessen potentielle Beteiligung zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals in intakten Zellen eine Minderung der

Translokation von PRL in Abwesenheit von Sec63 darzustellen (Abb. 4.5). Bei Mangel an Sec63 wurde ein Verlust an transportiertem Substrat von 31 % gegenüber den Kontrollzellen verzeichnet. In einem ersten Experiment mit zusätzlicher Stilllegung von *SRPRA* wurde eine ähnliche Prozessierungsrate festgestellt, wie nach dessen Einzeldepletion. Die Verwendung einer zweiten siRNA für Sec63 erzeugte ebenfalls einen Verlust an Translokationseffizienz, der mit 18 % Verminderung gegenüber den Kontrollzellen etwas geringer war. Ein additiver Effekt nach Depletion von Sec63 zusammen mit SR $\alpha$  wurde nicht beobachtet. Auf Grund der verminderten Prozessierung von PRL in Abwesenheit von Sec63 wird dessen Beteiligung am ER-Import des Substrates gefolgert. Im Einklang mit dieser Theorie konnte Theis in durchgeführten *in vitro*-Ansätzen einen moderaten Effekt von Sec63 auf den ER-Import von PRL nachweisen [109]. Sec63 wurde auch als involviertes Translokase-Element in cotranslationalen Transporten von Substraten charakterisiert [21, 23, 52, 125]. Daher ist seine Unterstützung des SRP-abhängigen cotranslationalen Transportweges durch Sec63 denkbar. In einigen Sec63-abhängigen Substraten wie, PreproCecropinA oder Prionprotein, wurden vergleichbare Muster ihrer Signalsequenzen identifiziert, die sich durch kurze, apolare und ungeladene Sequenzen darstellen [52]. Diese Merkmale weist das Signalpeptid von PRL nicht auf. Mit Hilfe seiner Signalsequenz gelingt dem Substrat eine effiziente Bindung an SRP und ebenso die Öffnung des Kanals [18]. Zudem zeigt Sec63 vielfältige Funktionen, weshalb seine Unterstützung des ER-Imports von PRL sich von der Beteiligung zur Translokation von Substrate mit differenzierter Signalsequenz unterscheiden kann. Weiterhin spielt auch die reife Domäne eine Rolle während der Translokation [18], weshalb eine abweichende Signalsequenz kein Kriterium ist, nicht Sec63-abhängig transportiert zu werden.

Der Effekt einer signifikanten Reduktion wurde nur für die #5 siRNA beobachtet, während für die zweite siRNA, keine Signifikanz trotz Verminderung festzustellen war. Die Beobachtung ist auf Grund der ähnlichen Restproteinmengen an Sec63 von 10 % bzw. 7 % nicht erklärbar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen spezifischen Nebeneffekt einer siRNA. Die Doppeldepletion beider Komponenten in einem ersten Experiment, erzielten einen vergleichbaren Translokationsdefekt, wie nach ihrer separaten Translationsminderung (Abb. 4.5). Daher stellt sich die Frage nach dem Zusammenspiel der beiden Proteine. Hierfür sind zwei Modelle denkbar, die Sec63 als alternativen Translokationspartner oder als unterstützenden Komponente im SRP-abhängigen Transport darstellen. Im Fall des alternativen Transportweges, der nicht zur Unterstützung von SR $\alpha$  interagiert, wäre nach Doppeldepletion zusammen mit SR $\alpha$  aber ein additiver Translokationsdefekt zu erwarten, der hier nicht beobachtet werden konnte (Abb. 4.5). Dabei wäre aber vorausgesetzt, dass kein weiterer bisher unentdeckter, SRP-unabhängiger Translokationsweg zur Verfügung steht. Wahrscheinlicher ist ein simultanes Zusammenwirken von Sec63 und SR $\alpha$  um einen effizienten Transport von PRL zu gewährleisten. Fehlt nur eine der Komponenten, ist die Effizienz des Substrattransportes verringert. Somit wird die

These einer Translokation von PRL durch einen SRP-abhängigen Weg gestützt und um eine Beteiligung von Sec63 innerhalb des cotranslationalen Weges erweitert. Zur Festigung dieser These und zur Bestätigung eines ausbleibenden additiven Effektes ist eine Reproduktion der Ergebnisse nach Doppeldepletion und des beobachteten Effektes notwendig.

Weiterführende Untersuchungen zur Klärung, ob beide Komponenten als gemeinsame Operatoren an diesem Prozess beteiligt sind, könnten durch Quervernetzungsexperimente unter entsprechenden Depletionsbedingungen erfolgen. Dieses Verfahren kann Aufschluss geben, welche Komponenten während des Importprozesses an das Substrat gebunden sind und somit deren simultane Beteiligung bestätigen. Darüber hinaus bietet der Einsatz einer *SEC63*-cDNA die Möglichkeit zur Absicherung eines spezifischen Effektes der verringerten Translokation in Abwesenheit von Sec63, indem dieser kompensiert wird [52, 59, 60]. Eine sinnvolle Weiterführung der Experimente besteht in Studien zur Funktion von Sec63 während des ER-Imports von PRL. Eine Möglichkeit besteht in der Untersuchung, ob Sec63 durch Interaktion mit seiner J-Domäne zur Rekrutierung von BiP an diesem Prozess beteiligt ist. Hierfür steht die Sec63 Mutante *SEC63<sup>H132Q</sup>* zur Verfügung, welche auf Grund eines fehlerhaften HPD-Motivs eine nicht funktionale J-Domäne besitzt [76, 126]. Bei erfolgreicher Rettung des Translokationsdefektes und gleichzeitigem Fehlschlagen dieser Kompensation durch die Mutante, wäre zunächst die Spezifität des Translokationsverlustes durch Abwesenheit von Sec63 bestätigt und weiterhin die Beteiligung der J-Domäne, welche durch Rekrutierung von BiP die Öffnung des Translokationskanals katalysiert [18]. Weiterhin wäre dahingehend auch die Untersuchung eines Einflusses von BiP auf die Translokation von PRL in intakten Zellen lohnenswert.

### **5.3 ERj6 folgt einer SRP-abhängigen und einer SRP-unabhängigen Transportroute in das ER**

Zur Aufklärung des Mechanismus zum ER-Import von ERj6, wurde die Translokation des Substrates nach Depletion einiger Translokation-assoziiierter Proteine untersucht. Die Verringerung von SR $\alpha$  bedingt einen leichten Verlust des Transports von ERj6 (Abb. 4.7). Die Reduktion von SR $\beta$ , mit einer Restproteinmenge von durchschnittlich 31 %, zeigte nur eine geringe Minderung der Prozessierungsrate, die aber nicht signifikant ist (Abschnitt 5.1). Dem Resultat zur Stilllegung von *SRPRA* gegenüber, steht die Beobachtung einer Kompensation der Translokationsminderung nach Depletion des gesamten SR-Komplexes im Vergleich mit ihrer separaten Stilllegung (Abb. 4.7). Die Reduktion von Sec62 erzielte einen stärkeren Translokationsdefekt als nach Minderung von Sec63. Letzterer Effekt war vergleichbar mit dem von SR $\alpha$ . Die Kombinationen der Depletion mit SR $\alpha$  führte im Fall von Sec62 und Sec63 zu einer ähnlichen Verringerung der Prozessierung von ERj6 wie in Abwesenheit von

SR $\alpha$  allein. Obwohl Sec62, Sec63 und SR $\alpha$  den Transport von ERj6 zu beeinflussen scheinen, wurde kein additiver Effekt durch ihre kombinierte Stilllegung erfasst. Interessanterweise war nach gemeinsamer Stilllegung von *SEC62* und *SEC63* eine ähnliche Kompensation des Translokationsdefektes zu beobachten, wie nach Depletion des SR-Komplexes.

In neueren Arbeiten konnte Schorr erste Beobachtungen einer Beteiligung von Sec62 und Sec63 am Translokationsprozess von ERj6 darstellen [97]. Beide Komponenten besitzen Funktionen um den Transport eines SRP-abhängigen Substrates zu unterstützen oder sogar zu ersetzen. So fungiert Sec62 ebenso wie SRP als Signalsequenzrezeptor sowie als Bindungsstelle für Ribosomen [12, 24, 27]. Über die J-Domäne rekrutiert Sec63 das Hsp70 BiP zum Translokationskanal und ist so an der Regulation des Öffnungsmechanismus beteiligt, welche Funktion auch für Sec62 vermutet wird [52, 54].

Erste Experimente zur Erforschung des Transportverhaltens von ERj6 ergaben teilweise abweichende Ergebnissen [97]. Diese zeigten sich durch eine Verringerung der Translokationseffizienz von ERj6 nach Depletion von SR $\alpha$ , die zuvor nicht detektiert wurde. Entgegen der Daten von Schorr [97], zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass SR $\alpha$  durchaus am ER-Import des Substrates beteiligt zu sein scheint, weswegen ein SRP-abhängiger Transportweg einen potentiellen Anteil am ER-Import von ERj6 hat. Auf Grund der Größe des Proteins, sowie der Hydrophobizität seiner Signalsequenz, die von 31 Aminosäuren 15 hydrophobe Reste aufweist, stimmt die Beobachtung eines SRP-abhängigen Transportes mit neueren Arbeiten überein, die Kriterien für große Proteine, mit einer Aminosäuresequenz größer als 160, aufstellen und deren Tendenz zur Translokation mit Hilfe von SRP darlegen [21]. Diese Kriterien sind jedoch nicht ausreichend für die Klassifizierung eines Proteins zur Abhängigkeit von Translokaselementen, da für ERj3, welches auf Grund seiner langen Signalsequenz gleichermaßen kategorisiert wird, kein SRP-abhängiger Transport nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 5.1). Es zeigten sich weitere Faktoren, die für einen SR $\alpha$ -abhängigen Transport von ERj6 sprechen. So wurde eine Tendenz zum Anstieg von SR $\alpha$  nach Depletion von Sec62 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für einen Regulationsmechanismus der beiden Komponenten. So könnte durch den Verlust von Sec62 die Translokation verstärkt über einen SRP-abhängigen Weg verlaufen. Interessanterweise wurde eine umgekehrte Regulation, die einen Anstieg von Sec62 in Abwesenheit von SR $\alpha$  bewirkt, nicht beobachtet. Möglicherweise spielt Sec62 eine größere Rolle zum ER-Import von ERj6, wofür auch die stärkere Verminderung der Prozessierungsrate nach Sec62-Depletion gegenüber der von SR $\alpha$  spricht. Demnach stellt sich die Translokation über die SR-Komponente als ineffizienter dar, woraus, zur Erhöhung der Transporteffizienz, die vermehrte Synthese von SR $\alpha$  resultiert. Aus der Literatur sind solche Regulationsmechanismen bekannt, die zur Reaktion der Zelle auf eine fehlerhafte Funktion, wie z.B. bei ER-Stress durch die UPR, dienen. Hierzu konnte beispielsweise ein Anstieg der Chaperone ERj3

und ERj6 als Antwort auf ER-Stress festgestellt werden [15, 127]. Weiterhin wurde nach Reduktion von Sec61 $\alpha$  eine vermehrte Menge der Untereinheiten des SRP-Rezeptors gezeigt [52]. Entsprechend wurde, wie in dieser Arbeit auch, bereits in früheren Veröffentlichungen eine Erhöhung des SR $\alpha$ -Gehaltes infolge einer Verringerung von Sec62 festgestellt [109]. Die Daten führen zu der Annahme einer Umstellung des Translokationsweges, im Fall einer nicht ausreichend vorhandenen oder funktionalen Translokation-assoziierten Komponente, die den ER-Import eines Substrates unterstützt.

Wie auch für das SRP-abhängig transportierte Kontrollprotein PRL wurde eine Beteiligung von SR $\beta$  zum ER-Import von ERj6 nicht nachgewiesen. Hingegen wird eine Beteiligung von SR $\alpha$  am ER-Import als wahrscheinlich erachtet. Folglich kann ERj6 auch zum Teil eine SRP-abhängige Transportroute nutzen. Eine mögliche Interpretation dieser Resultate besteht in der Annahme von zwei parallel laufenden Translokationswegen. Der Erste verläuft über einen SRP-unabhängigen Weg unter Beteiligung von Sec62 und Sec63. Ist eine dieser beiden Komponenten zusammen mit SR $\alpha$  reduziert, verringert sich die Translokation von ERj6 nicht weiter gegenüber der Einzeldepletion. In Abwesenheit beider Komponenten kann dieser Anteil kompensiert werden, möglicherweise durch den SR-Komplex, welcher Weg den zweiten, SRP-abhängigen Transport darstellt. Unabhängig davon, welcher der zwei Wege beide involvierte Komponenten entbehrt, erfolgt eine Umstellung auf den alternativen Transportweg, was den ursprünglichen Translokationslevel erklärt. Fehlt nur eine beteiligte Translokation-assoziierte Komponente eines Weges wird eine Umstellung nicht vollzogen. Diese Resultate sind nachvollziehbar im Hinblick auf die Funktionen der akzessorischen Komponenten. Möglicherweise dient die Option der parallelen Transportwege über einen SRP-abhängigen und -unabhängigen Weg zur Sicherstellung des Transports von ERj6, falls einer der beiden Wege inhibiert ist. Besonders auf Grund der Funktionalität von ERj6 im ER Lumen stellt sich diese Interpretation als vorteilhaften Mechanismus dar.

In erster Linie hängt die Translokation von der Signalsequenz, seiner Länge, der reifen Domäne oder den physikalischen Eigenschaften ab [18, 21]. Des Weiteren scheint eine Substrat-spezifische Affinität zu bestehen, welcher Transportweg bevorzugt gewählt wird, der bei unzureichender Verfügbarkeit des favorisierten Weges durch einen Alternativen ersetzt werden kann. Die Abgrenzung mancher Proteine welchen Translokationsweg zum effizienten ER-Import genutzt wird, ist nicht immer eindeutig und spricht für die These, dass diese sowohl SRP-abhängig als auch -unabhängig transportiert werden können [21, 23].

## 5.4 Die Vorstufen von PRL und ERj6 sind inseriert in die ER-Membran

Die Aufklärung der Mechanismen zur Translokation von sekretorischen Proteinen in das Lumen des ER bedingt neben der Kenntnis über die Beteiligung von Translokaselementen außerdem die Untersuchung der Vorstufenproteine und ihres Verhaltens während des Transportprozesses. Zur Lokalisierung der Vorläufer von PRL und ERj6 innerhalb dieses Prozesses, wurde daher eine Carbonatextraktion mit beiden Substraten durchgeführt. Im Fall von ERj6 wurde zusätzlich der Einfluss von Sec62 auf die Lokalisierung untersucht, indem die entsprechende Komponente depletiert wurde. Für beide Substrate wurde eine Anreicherung des Vorläufers im Pellet festgestellt, was auf seine teilweise Insertion in die ER-Membran während des Transportprozesses hinweist (Abb. 4.4 und 4.9). Ein möglicher Beitrag von Sec63 während des ER-Imports von PRL lässt sich durch die Betrachtung dieses Experimentes formulieren. Proteine, deren Signalsequenz als Signalanker erkannt wird, werden in die ER-Membran integriert, wobei die Kriterien, unter anderem durch die Beschaffenheit des Carboxyterminus, der Länge und Hydrophobizität, noch nicht vollständig verstanden sind [128]. Dabei inserieren Signalankerproteine nach einem ähnlichen Mechanismus wie Membranproteine vom Typ II. Sie werden „head-on“ in den Kanal eingebracht und erreichen ihre Konfiguration  $N_{in} - C_{out}$  durch Invertierung. Dieser Prozess wird vermittelt durch Ribosomen die mit Sec62 oder Sec63 interagieren [129, 130]. Somit könnte durch Beteiligung von Sec63 eine mögliche Insertion des Vorläufers in die ER-Membran erklärt werden. Dabei ist für das Substrat ein ähnlicher Mechanismus zur Insertion mit dem Kopf voraus denkbar, wie für Signalankerproteine.

Nach Carbonatextraktion von ERj6 war unter Kontrollbedingungen ebenfalls eine Insertion des Vorläufers in die ER-Membran festzustellen (Abb. 4.9). In Abwesenheit von Sec62 ist im Vergleich dazu eine stärkere Vorläuferakkumulation im Pellet zu verzeichnen, was für eine vermehrte Insertion von ERj6 in die ER-Membran spricht. Diese Ergebnisse ermöglichen Rückschlüsse auf potentielle Funktionen von Sec62 während der Translokation von ERj6.

Die Translokation-assoziierte Komponente zeigt Potential zur Beteiligung an der Regulation des Öffnungsmechanismus der Translokationspore [10, 52, 54, 131]. Weiterhin wurde Sec62 in Hefe-Modellsystemen während der Translokation als zielführend zur ER-Membran charakterisiert, was durch seine Bindungsfähigkeit an den ribosomalen Tunnel in Säugern in Einklang mit einer potentiell vergleichbaren Funktion in dieser Klasse von Lebewesen steht [27, 30]. Diese Eigenschaft stellt sich als vorteilhaft heraus unter dem Aspekt, dass Ribosomen bereits während der Initiation der Translation an die ER-Membran gebunden sein können, was einen alternativen SRP-unabhängigen Translokationsweg ermöglicht [132, 133]. Die Signalsequenzerkennung kann bei diesem Mechanismus übersprungen werden und durch die Erkennung der für das

Signalpeptid kodierenden Region einer mRNA ersetzt werden [134]. Aus der Literatur ist das Membranprotein außerdem als beteiligtes Element an der Insertion von Transmembranproteinen und als regulierender Faktor für deren Orientierung bekannt [19]. Dabei erfolgt die Insertion der Membranproteine unter Kontrolle von Sec62 präferiert in der Orientierung  $N_{in} - C_{out}$ , auch bekannt als Typ II. Die ribosomale Interaktion mit Sec62 wird mutmaßlich zur erfolgreichen Inversion nach Einbringen des Proteins in den Kanal benötigt [130]. In Abwesenheit von Sec62 scheitert diese Inversion und führt zur fehlerhaften Orientierung in die Membran, wobei die vorübergehende Transmembrandomäne als Stop-Transfer-Sequenz agiert und damit nicht in das Lumen des ER importiert wird [128, 135].

Welche funktionale Rolle spielt Sec62 nun während der Translokation von ERj6? Die Funktion von Sec62 zur Erkennung der Signalregion des Substrates auf mRNA-Ebene wäre eine Möglichkeit. Weiterhin besteht die Option als Signalsequenzrezeptor zu agieren, was durch seine Eigenschaft Ribosomen zu binden, auf Grund der resultierenden räumlichen Nähe, möglich erscheint. Nach Erkennung der naszierenden Kette wäre somit ein Szenario vorstellbar, in welchem Sec62 das Ribosom oder direkt an die Signalsequenz in einem cotranslationalen Prozess bindet und zielgerichtet zur ER-Membran dirigiert [27, 136]. Dieser These gegenüber steht die überraschende Beobachtung der Lokalisation des Vorläufers, auch in Abwesenheit von Sec62, als zytosolseitig verankertes Protein in der ER-Membran (Abb. 4.9). Im Fall dieser Funktion von Sec62 wäre eine geschwächte Insertion des Vorläufers zu erwarten, da die Zielführung scheiterte. Diese Beobachtung spricht außerdem auch dagegen, dass Sec62 die Kanalöffnung reguliert. So stellt sich Sec62 als Komponente dar, die nicht in die früheste Phase der Translokation involviert ist. Auf Grund der Größe und der mäßig hydrophoben Signalsequenz wäre eine Erkennung von ERj6 als Signalankerprotein unter Kontrolle von Sec62 denkbar. Wird das Substrat als Membranprotein erkannt, was eine generell schlechte Translokation zur Folge hat, verhilft Sec62 zur korrekten Orientierung, wodurch zumindest ein Teil des Substrates importiert werden kann. In Abwesenheit der akzessorischen Komponente fehlt diese zur Regulation der Orientierung, was eine zusätzlich verminderte Translokation zur Folge hat, da ERj6 in der Membran verankert bleibt. Als Signalsequenzrezeptor könnte Sec62 zur Prävention der Erkennung von ERj6 als Signalankerprotein agieren, was zusätzlich gegen diese Funktion spricht. Davon ausgehend, dass die ribosomale Interaktion mit Sec62 zur Translokation von ERj6 gefordert ist, wäre mit einem solchen Modell die verstärkte Detektion des Vorläufers in der Membran während der Abwesenheit von Sec62 erklärbar. Aber auch unter Kontrollbedingungen zeigt ERj6 eine schwache Translokation, die sich durch das Modell der „head-on“-Insertion erklären lässt. Neben den Funktionen als lumenales Protein [86, 95], besitzt ERj6 auch im Zytosol funktionale Bedeutung unter anderem als regulierender Faktor der UPR-Maschinerie [89, 137, 138]. Durch die Funktion in beiden Kompartimenten ist daher eine noch unbekannt funktionale Wirkung als ER-Membranprotein denkbar,

was eine Erklärung zur schlechten Translokationseffizienz sowie zur Insertion des Vorläufers bietet.

Der Einsatz des Proteasominhibitors kann, durch einen verringerten Transport wegen beschränkter Bindungskapazitäten der beteiligten Translokaseelemente, zu einer unnatürlich hohen Anreicherung des Vorläufers im Zytosol führen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Beobachtung der Fraktionierung im Pellet für ERj6 und PRL durch ihre Aggregation resultiert. Für beide Substrate stellen sich Sec62 bzw. Sec63 als mögliche funktionale Komponenten zur Membraninsertion ihrer Vorläufer dar. Für beide Vorstufenproteine wurde die gleiche Lokalisation während ihrer Translokation gezeigt. Dabei bleibt offen, ob dies einen funktionellen Hintergrund hat oder in Zusammenhang mit der Gemeinsamkeit steht, dass Sec63 und SR $\alpha$ , für ERj6 zusätzlich auch Sec62, an ihrem ER-Import beteiligt sind. Beide Vorstufenproteine werden, trotz ihrer unterschiedlichen Signalsequenzen, offenbar zum gleichen Ort transportiert und unterliegen womöglich ähnlichen Mechanismen, die den Vorläufer mit dem Kopf voraus zunächst in die Membran inserieren. Zur Untersuchung dieses Prozesses wäre eine sinnvolle Fortführung von Versuchen die alkalische Carbonatextraktion nachfolgend zur Depletion von Sec63 für beide Substrate.

## 5.5 ERj3-DHFR wird cotranslational transportiert

Zur Untersuchung des Translokationsweges von ERj3 und der beteiligten Translokaseelemente zu seiner Biogenese, wurde das Substrat in dieser Arbeit auf die Beteiligung des SR-Komplexes überprüft (Abschnitt 5.1). Die Ergebnisse deuteten auf einen SRP-unabhängigen Transport hin. Die experimentellen Daten zu ERj3 aus Vorarbeiten legen die Beteiligung von Sec63 und Sec62 zum effizienten ER-Import dar [97].

In weiteren Experimenten interessierte nun die Identifizierung eines co- oder posttranslationalen Transportweges von ERj3. Das Fusionsprotein ERj3-DHFR diene als Option diese Frage in intakten Zellen zu klären. Wird das Protein posttranslational transportiert, liegt auch der C-Terminus vollständig synthetisiert vor, der nach Faltung durch Bindung von MTX am ER-Import gehindert wird. Dies schlägt sich in einer potentiell verringerten Translokationseffizienz nieder. Weiterhin wurde das Fusionsprotein auf Sec62-abhängigen Transport in intakten Zellen untersucht. Für ERj3 ist diese Abhängigkeit bekannt. Durch den zusätzlichen DHFR-Anteil besteht die Möglichkeit des Verlustes dieser Abhängigkeit.

In Abwesenheit von Sec62 wurde ein verringerter Transport an ERj3-DHFR festgestellt (Abb. 4.13). Weiterhin waren nach der Behandlung mit MTX keine erkennbaren Unterschiede im Translokationsverhalten des Substrates im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nachweisbar. Aus diesen Resultaten ergibt sich zunächst ein



Sec62-abhängiger Transport von ERj3-DHFR. Im Vergleich mit wildtypischem ERj3 stellt dies eine Gemeinsamkeit zum Transport des Fusionsproteins dar. Dies wird als erster Hinweis gedeutet, dass der zusätzliche DHFR-Anteil hinsichtlich Sec62 keine Änderung im Transportverhalten bedingt. Die ausbleibende Veränderung des Transportverhaltens nach Behandlung mit MTX, deutet daraufhin, dass dieses nicht an den DHFR-Anteil bindet. Da DHFR nur komplett synthetisiert und gefaltet durch MTX gebunden werden kann [139], führt diese Beobachtung zur Annahme eines cotranslationalen Transportes von ERj3-DHFR.

Um die Resultate auf das wildtypische ERj3 zu übertragen, bleibt zu beachten, dass der Anteil von ERj3 des Fusionsproteins *per se* dazu führen kann, dass eine Faltung von DHFR verhindert wird. Die Möglichkeit zur Bindung von freiem DHFR und auch nach Fusion mit anderen Proteinen konnte durch entsprechende Versuche gezeigt werden. Dennoch ist diese Gegebenheit nach Verknüpfung mit anderen Proteinen nicht zwingend, da verschiedene Domänen den Transportweg und auch die Beteiligung der akzessorischen Elemente beeinflussen [16, 18, 51]. Während in Hefe Substrate, die den Sec62/Sec63-Komplex zum Transport nutzen, hauptsächlich posttranslational in das ER importiert werden, wurde seltener ein Zusammenhang mit möglichem cotranslationalem Transport und Involvierung von Sec63 festgestellt als in Säugern [61, 125]. Darüber hinaus kann das Hefe-Homologe von Sec62 nicht mit Ribosomen interagieren, was gegenüber Säugern die Wahrscheinlichkeit einer Beobachtung des Transports von Substraten während der Translation, unter Einbezug von Sec62, vermindert [27, 140]. Weiterhin ist zu beachten, dass die Unterscheidung eines co- oder posttranslationalen Weges in Säugern nicht ausschließlich durch ihre beteiligten Translokaseelemente ermittelt werden kann. Sowohl SRP als auch Sec62 und Sec63 können an beiden Prozessen eine zentrale Rolle übernehmen [20, 29, 52]. Denkbar ist auch eine Abschirmung des Fusionsproteins durch Chaperone nach dessen Synthese, was eine potentielle Interaktion mit MTX unterbindet und einen Erhalt der translokationskompetenten Faltung von DHFR ermöglicht. Dies führte zu der verfälschten Annahme eines cotranslationalen Transportes. Daher ist ein direkter Schluss, dass ERj3 über einen cotranslationalen Weg in das ER importiert wird, nicht zweifellos möglich.

Für einen posttranslationalen Transport von ERj3 spricht die Beobachtung von Ast *et al.* nach Einsatz des Inhibitors ZMPSTE (Zink-Metalloprotease gegen Ste24) in Verbindung mit einem GFP-Konstrukt von ERj3, welches zusätzliche Glykosilierungsstellen enthielt. Der Inhibitor wurde dabei genutzt um Sec61 zu verstopfen und einen Abbau von Substraten zu beobachten, welcher durch fehlerhaften und unvollständigen Transport zu Stande kommt. Dabei lag ERj3 teilweise glykosiliert vor, was nur zu beobachten ist, wenn ERj3 zumindest anteilig posttranslational und SRP-unabhängig transportiert wird. Dies deutet auch auf die Unabhängigkeit des Substrattransports von SRP hin, da anderfalls die Translation und Translokation so eng gekoppelt sind, dass die beobachtete Verstopfung durch vorzeitige Faltung des reifen Teils, der sich

noch im Zytosol befindet, nicht erfolgen würde [141]. Unter Berücksichtigung dieser Umstände ist, neben der vermuteten posttranslationalen Translokation, auch unter Beteiligung von Sec62 ein teilweiser cotranslationaler Transport von ERj3-DHFR und auch ERj3 denkbar, wofür in dieser Arbeit deutlich Hinweise aufgezeigt werden konnten.

Durch eine technische Limitierung konnte das DHFR-Signal hier nicht detektiert werden. Es bestand in diesem Fall wegen des molekularen Größenunterschiedes nur die Möglichkeit entweder das Substrat oder DHFR zu betrachten. Daher ist die Interpretation einer fehlenden Faltung kritisch zu betrachten. Eine sichere Aussage hierzu ist nicht zweifelsfrei möglich, da MTX möglicherweise zumindest zum Teil bindet, was in diesem Experiment nicht gesehen werden konnte. Sinnvoll wäre daher eine Wiederholung des Experimentes mit Fokus auf DHFR. Ein anteiliger posttranslationaler Transport ist daher möglich, was durch entsprechende Detektion in einem erneuten Experiment potentiell nachgewiesen werden kann. Handelt es sich hierbei nur um einen geringen Anteil, ist die Detektion weiterhin schwierig. Dennoch resultiert aus diesen Ergebnissen zumindest ein anteiliger cotranslationaler Transport für ERj3-DHFR.

## **5.6 Sil1 und Apelin-DHFR werden SRP-unabhängig transportiert**

In intakten Zellen fällt die Detektion von Apelin nach Plasmid-basierter Expression im kombinierten Einsatz mit siRNA-Oligonukleotiden schwer. Die Signale nach Western Blot sind inkonsistent und oftmals schlecht detektierbar. Durch *in vitro*-Studien konnte für das Substrat ein anteiliger co- und posttranslationaler Transport, unter Beteiligung von Sec62, Sec63 und SR $\alpha$ , nachgewiesen werden (Sarah Haßdenteufel, mündliche Mitteilung, [28]). Apelin-DHFR zeigt nach ersten Erkenntnissen mittels *in vitro*-Versuchen ebenfalls Sec63-abhängigen Transport, der unter cotranslationalen Bedingungen abläuft. Um diese Abhängigkeit in intakten Zellen zu untersuchen und weitere Translokaselemente zum ER-Import des Fusionsproteins zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit neben Sec63 auch der Einfluss von Sec62 und SR $\alpha$  mittels siRNA-vermittelter Depletion erforscht. In intakten Zellen konnte für keine der getesteten Komponenten nach deren Depletion ein starker Verlust an transportiertem Substrat nachgewiesen werden (Abb. 4.15). Die Verringerung von Sec63 führte zur einer schwachen, aber signifikanten Transportreduktion, wobei auch hieraus keine eindeutige Beteiligung der Translokon-assoziierten Komponente hervorgeht, da der Effekt gegenüber den Kontrollzellen sehr gering ist. Wie bereits zuvor festgestellt (Abschnitte 5.3 und 5.2), kann es sich hier um einen regulierenden Effekt zur Kompensation handeln, der das Defizit an Sec63 ausgleicht um einen Transportverlust zu vermeiden. Damit wäre eine potentielle Sec63-Abhängigkeit

schlecht nachweisbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Beteiligung von Sec63 zum Transport von Apelin-DHFR in intakten Zellen, wie auch in *in vitro*-Experimenten gezeigt, durchaus denkbar ist. Zur Feststellung einer möglichen Involvierung von Sec63, könnte Apelin-DHFR in intakten Zellen nach Depletion der Translokation-assoziierten Komponente auf Sensitivität gegenüber MTX getestet werden. Weiterhin kann die Analyse des sezernierten Anteils an Apelin-DHFR nach Depletion von Sec63 oder weiterer Komponenten, auch in Kombination, Aufschluss geben, ob die Translokation des Substrates durch diese reguliert wird.

Funktionales BiP ist am Öffnungsmechanismus des Translokationskanals, an der Faltung neu synthetisierter Proteine, deren anschließender Sekretion und an der Degradation fehlgefalteter Substrate beteiligt [71]. Sil1 dient dem Chaperon als Nukleotidaustauschfaktor und trägt somit durch seine Aktivierung zu seiner Funktionalität bei [68]. In Patientenzellen mit niedrigem TRAP $\gamma$ - und  $\delta$ -Gehalt sowie nach Depletion von TRAP $\beta$  in HeLa-Zellen wurde ein erniedrigter Gehalt an endogenem Sil1 detektiert (Johanna Dudek, persönliche Mitteilung). Dies legte die Vermutung einer Involvierung des TRAP-Komplex am Transport des Substrates nahe. Transportmechanismen von Sil1 in das Lumen des ER sind bisher nicht bekannt, weshalb innerhalb dieser Arbeit erste Experimente diesbezüglich durchgeführt wurden. Dazu wurde untersucht, welche Auswirkung die Abwesenheit von TRAP $\beta$ , Sec63 und SR $\alpha$  auf den Transport des Substrates hat. Durch die Verwendung von TRAP $\beta$ -siRNAs konnte eine leichte Verminderung der Prozessierungsrate, aber kein eindeutiger Hinweis durch Signifikanz auf die Beteiligung des Komplexes am ER-Import von Sil1 beobachtet werden (Abb. 4.17). Weiterhin wurde keine Abhängigkeit zum Transport des Nukleotidaustauschfaktors von Sec63 festgestellt. Auch die Depletion von SR $\alpha$  übte keinen Effekt auf den ER-Import des Substrates aus.

Diese ersten Ergebnisse zeigen einen möglichen TRAP-abhängigen Transport von Sil1. Weiterführende Untersuchungen bestätigen die Tendenz einer reduzierten Prozessierung nach Depletion von TRAP $\beta$  oder weiterer Untereinheiten des TRAP-Komplexes (Stefan Schorr, mündliche Mitteilung). Es besteht die Möglichkeit, dass auch anderen Komponente in den Transport involviert sind, die noch nicht dahingehend untersucht wurden, und die Abwesenheit von TRAP-Untereinheiten durch diese kompensiert werden, wodurch kein starker Translokationsdefekt zu detektieren ist. Weiterhin wurde kein Transportverlust nach Depletion von SR $\alpha$  nachgewiesen, was auf einen SRP-unabhängigen Transport vermuten lässt.

Eine sinnvolle Weiterführung der Experimente zur Identifizierung möglicher involvierter Translokation-assoziiierter Komponenten zur Biogenese von Sil1 bietet sich durch zusätzliche Transportversuche. Hierfür wäre eine Depletion weiterer Komponenten, auch in Kombination, sinnvoll, um beteiligte akzessorische Proteine zu erforschen. Ein möglicher Ansatzpunkt besteht in der Erforschung einer Rolle von BiP während der Translokation von Sil1. Da das Chaperon im Lumen des ER funktional mit dem Nukleotidaustauschfaktor interagiert [67] und auch eine

Funktion am Substrattransport ausübt, beispielsweise innerhalb der Regulierung der Kanalöffnung [77], stellt sich die Frage nach einer weiteren Funktion von BiP hinsichtlich Sil1. Um eine SRP-unabhängige Translokation abzusichern wäre eine Reduktion des dimeren SR-Komplexes oder von SRP-Untereinheiten sinnvoll, möglicherweise auch unter Einsatz des CRISPR-Systems [122, 123]. Des Weiteren könnte eine Quervernetzungsstudie Aufschluss darüber geben, mit welchen Elementen der Translokase Sil1 agiert. Im Hinblick auf das Marinesco-Sjögren-Syndrom wäre außerdem eine Untersuchung von Patientenzellen auf den TRAP-Gehalt sinnvoll. Es ist bekannt, dass die Krankheit in Verbindung mit mutierten Formen von *SIL1* steht [70, 71]. Denkbar ist auch eine Mutation die zur fehlerhaften subzellularen Lokalisation führt [71]. Diese kann entweder durch Verlust der Transportinformation am veränderten *SIL1* hervorgerufen werden oder auch durch genetische Veränderungen, die zu fehlerhaften Translokase-Einheiten führen, welche für den ER-Import von Sil1 benötigt werden. Da die Abwesenheit oder Reduktion des endogenen TRAP-Komplexes bereits in unspezifizierten Patientenzellen festgestellt wurde und eine TRAP-abhängige Translokation auch für Sil1 denkbar ist, stellt sich die Frage eines möglichen Zusammenhangs von misslokalisiertem Sil1 durch Abwesenheit des TRAP-Komplexes. Die Untersuchung von Patientenzellen, die am Marinesco-Sjögren-Syndrom leiden, hinsichtlich ihres TRAP-Gehalts erscheint daher als interessanter Ansatz einen möglichen Zusammengang zwischen Sil1 und dem Komplex herzustellen und die physiologische Relevanz der vermuteten Abhängigkeit näher zu charakterisieren.

---

# LITERATURVERZEICHNIS

- [1] VIRCHOW, Rudolf: *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: 20 Vorlesungen, gehalten während d. Monate Febr., März u. April 1858 im Patholog. Inst. zu Berlin.* Hirschwald, 1858
- [2] DE DUVE, Christian: The origin of eukaryotes: a reappraisal. In: *Nature Reviews Genetics* 8 (2007), Nr. 5, S. 395–403
- [3] ENGLISH, Amber R. ; ZUREK, Nesia ; VOELTZ, Gia K.: Peripheral ER structure and function. In: *Current Opinion in Cell Biology* 21 (2009), Nr. 4, S. 596–602
- [4] WHITE, Stephen H. ; HEIJNE, Gunnar von: The machinery of membrane protein assembly. In: *Current Opinion in Structural Biology* 14 (2004), Nr. 4, S. 397–404
- [5] SIMON, Sanford M. ; BLOBEL, Günter: A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. In: *Cell* 65 (1991), Nr. 3, S. 371–380
- [6] PARK, Seong H. ; BLACKSTONE, Craig: Further assembly required: construction and dynamics of the endoplasmic reticulum network. In: *EMBO reports* 11 (2010), Nr. 7, S. 515–521
- [7] LADIGES, Warren C. ; KNOBLAUGH, Sue E. ; MORTON, John F. ; KORTH, Marcus J. ; SOPHER, Bryce L. ; BASKIN, Carole R. ; MACAULEY, Alasdair ; GOODMAN, Alan G. ; LEBŒUF, Renee C. ; KATZE, Michael G.: Pancreatic  $\beta$ -cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK. In: *Diabetes* 54 (2005), Nr. 4, S. 1074–1081
- [8] HAMMAN, Brian D. ; CHEN, Jui-Chang ; JOHNSON, Edward E. ; JOHNSON, Arthur E.: The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. In: *Cell* 89 (1997), Nr. 4, S. 535–544
- [9] VOELTZ, Gia K. ; ROLLS, Melissa M. ; RAPOPORT, Tom A.: Structural organization of the endoplasmic reticulum. In: *EMBO reports* 3 (2002), Nr. 10, S. 944–950
- [10] CROWLEY, Kathleen S. ; LIAO, Shuren ; WORRELL, Veronica E. ; REINHART, Gregory D. ; JOHNSON, Arthur E.: Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. In: *Cell* 78 (1994), Nr. 3, S. 461–471
- [11] BLOBEL, Günter: Intracellular protein topogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (1980), Nr. 3, S. 1496–1500
- [12] BLOBEL, Günter ; DOBBERSTEIN, Bernhard: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. In: *The Journal of Cell Biology* 67 (1975), Nr. 3, S. 835–851
- [13] GÖRLICH, Dirk ; PREHN, Siegfried ; HARTMANN, Enno ; KALIES, Kai-Uwe ; RAPOPORT, Tom A.: A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. In: *Cell* 71 (1992), Nr. 3, S. 489–503
- [14] KALIES, Kai-Uwe ; ALLAN, Susanne ; SERGEYENKO, Tatiana ; KRÖGER, Heike ; RÖMISCH, Karin: The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. In: *The EMBO Journal* 24 (2005), Nr. 13, S. 2284–2293
- [15] GENEREUX, Joseph C. ; QU, Song ; ZHOU, Minghai ; RYNO, Lisa M. ; WANG, Shiyu ; SHOULDERS, Matthew D. ; KAUFMAN, Randal J. ; LASMÉZAS, Corinne I. ; KELLY, Jeffery W. ; WISEMAN, R.L.: Unfolded protein response-induced ERdj3 secretion links ER stress to extracellular proteostasis. In: *The EMBO Journal* 34 (2015), Nr. 1, S. 4–19
- [16] FONS, Ryen D. ; BOGERT, Brigitte A. ; HEGDE, Ramanujan S.: Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. In: *The Journal of Cell Biology* 160 (2003), Nr. 4, S. 529–539
- [17] VON HEIJNE, Gunnar: Signal sequences: the limits of variation. In: *Journal of Molecular Biology* 184 (1985), Nr. 1, S. 99–105
- [18] KIM, Soo J. ; MITRA, Devarati ; SALERNO, Jeffrey R. ; HEGDE, Ramanujan S.: Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. In: *Developmental Cell* 2 (2002), Nr. 2, S. 207–217
- [19] REITHINGER, Johannes H. ; KIM, Ji Eun H. ; KIM, Hyun: Sec62 protein mediates membrane insertion and orientation of moderately hydrophobic signal anchor proteins in the endoplasmic reticulum (ER). In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (2013), Nr. 25, S. 18058–18067
- [20] JOHNSON, Nicholas ; HASSDENTEUFEL, Sarah ; THEIS, Melanie ; PATON, Adrienne W. ; PATON, James C. ; ZIMMERMANN, Richard ; HIGH, Stephen: The signal sequence influences post-translational ER translocation at distinct stages. In: *PLOS ONE* 8 (2013), Nr. 10, S. e75394
- [21] LAKKARAJU, Asvin K. ; THANKAPPAN, Ratheeshkumar ; MARY, Camille ; GARRISON, Jennifer L. ; TAUNTON, Jack ; STRUB, Katharina: Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. In: *Molecular Biology of the Cell* 23 (2012), Nr. 14, S. 2712–2722
- [22] LYMAN, Susan K. ; SCHEKMAN, Randy: Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. In: *Cell* 88 (1997), Nr. 1, S. 85–96

- [23] NG, DT ; BROWN, Jeremy D. ; WALTER, Peter: Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. In: *The Journal of Cell Biology* 134 (1996), Nr. 2, S. 269–278
- [24] WALTER, Peter ; IBRAHIMI, Ibrahim ; BLOBEL, GUNTER: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. In: *The Journal of Cell Biology* 91 (1981), Nr. 2, S. 545–550
- [25] WALTER, Peter ; BLOBEL, GONTER: Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. In: *The Journal of Cell Biology* 91 (1981), Nr. 2, S. 557–561
- [26] GILMORE, Reid ; WALTER, Peter ; BLOBEL, GONTER: Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. In: *The Journal of Cell Biology* 95 (1982), Nr. 2, S. 470–477
- [27] MÜLLER, Linda ; ESCAURIAZA, Maria D. ; LAJOIE, Patrick ; THEIS, Melanie ; JUNG, Martin ; MÜLLER, Anika ; BURGARD, Carsten ; GREINER, Markus ; SNAPP, Erik L. ; DUDEK, Johanna u. a.: Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. In: *Molecular Biology of the Cell* 21 (2010), Nr. 5, S. 691–703
- [28] JOHNSON, Nicholas ; VILARDI, Fabio ; LANG, Sven ; LEZNICKI, Pawel ; ZIMMERMANN, Richard ; HIGH, Stephen: TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. In: *Journal of Cell Science* 125 (2012), Nr. 15, S. 3612–3620
- [29] ZIMMERMANN, Richard ; SAGSTETTER, Maria ; LEWIS, Michael J. ; PELHAM, HR: Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. In: *The EMBO Journal* 7 (1988), Nr. 9, S. 2875
- [30] SANDERS, Sylvia L. ; WHITFIELD, Kristina M. ; VOGEL, Joseph P. ; ROSE, Mark D. ; SCHEKMAN, Randy W.: Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. In: *Cell* 69 (1992), Nr. 2, S. 353–365
- [31] PANZNER, Steffen ; DREIER, Lars ; HARTMANN, Enno ; KOSTKA, Susanne ; RAPOPORT, Tom A.: Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. In: *Cell* 81 (1995), Nr. 4, S. 561–570
- [32] JUNG, Sung-jun ; KIM, Ji Eun H. ; REITHINGER, Johannes H. ; KIM, Hyun: The Sec62–Sec63 translocon facilitates translocation of the C-terminus of membrane proteins. In: *Journal of Cell Science* 127 (2014), Nr. 19, S. 4270–4278
- [33] HANEIN, Dorit ; MATLACK, Kent E. ; JUNGnickel, Berit ; PLATH, Kathrin ; KALIES, Kai-Uwe ; MILLER, Kenneth R. ; RAPOPORT, Tom A. ; AKEY, Christopher W.: Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. In: *Cell* 87 (1996), Nr. 4, S. 721–732
- [34] BERG, Bert van d. ; CLEMONS, William M. ; COLLINSON, Ian ; MODIS, Yorgo ; HARTMANN, Enno ; HARRISON, Stephen C. ; RAPOPORT, Tom A.: X-ray structure of a protein-conducting channel. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6969, S. 36–44
- [35] PARK, Eunyong ; RAPOPORT, Tom A.: Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. In: *Annual Review of Biophysics* 41 (2012), S. 21–40
- [36] PFEFFER, Stefan ; BRANDT, Florian ; HRABE, Thomas ; LANG, Sven ; EIBAUER, Matthias ; ZIMMERMANN, Richard ; FÖRSTER, Friedrich: Structure and 3D arrangement of endoplasmic reticulum membrane-associated ribosomes. In: *Structure* 20 (2012), Nr. 9, S. 1508–1518
- [37] MORGAN, David G. ; MENETRET, Jean-Francois ; NEUHOF, Andrea ; RAPOPORT, Tom A. ; AKEY, Christopher W.: Structure of the Mammalian Ribosome–Channel Complex at 17Å Resolution. In: *Journal of Molecular Biology* 324 (2002), Nr. 4, S. 871–886
- [38] RADEN, David ; SONG, Weiqun ; GILMORE, Reid: Role of the cytoplasmic segments of Sec61 $\alpha$  in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. In: *The Journal of Cell Biology* 150 (2000), Nr. 1, S. 53–64
- [39] PLEMPER, Richard K. ; BÖHMLER, Sigrun ; BORDALLO, Javier ; SOMMER, Thomas ; WOLF, Dieter H.: Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. In: *Nature* 388 (1997), Nr. 6645, S. 891–895
- [40] WALTER, Peter ; BLOBEL, Günter: Disassembly and reconstitution of signal recognition particle. In: *Cell* 34 (1983), Nr. 2, S. 525–533
- [41] HALIC, Mario ; BECKER, Thomas ; POOL, Martin R. ; SPAHN, Christian M. ; GRASSUCCI, Robert A. ; FRANK, Joachim ; BECKMANN, Roland: Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6977, S. 808–814
- [42] NEUHOF, Andrea ; ROLLS, Melissa M. ; JUNGnickel, Berit ; KALIES, Kai-Uwe ; RAPOPORT, Tom A.: Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. In: *Molecular Biology of the Cell* 9 (1998), Nr. 1, S. 103–115
- [43] LAKKARAJU, Asvin K. ; MARY, Camille ; SCHERRER, Anne ; JOHNSON, Arthur E. ; STRUB, Katharina: SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites. In: *Cell* 133 (2008), Nr. 3, S. 440–451
- [44] KURZCHALIA, TV ; WIEDMANN, M ; GIRSHOVICH, AS ; BOCHKAREVA, ES ; BIELKA, H ; RAPOPORT, TA: The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. In: *Nature* 320 (1986), Nr. 6063, S. 634–636
- [45] ZOPF, D ; BERNSTEIN, HD ; JOHNSON, AE ; WALTER, P: The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. In: *The EMBO*

*Journal* 9 (1990), Nr. 13, S. 4511

- [46] BERNSTEIN, Harris D. ; PORITZ, Mark A. ; STRUB, Katharina ; HOBEN, Patricia J. ; BRENNER, Sydney ; WALTER, Peter: Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. In: *Nature* 340 (1989), Nr. 6233, S. 482–486
- [47] ZAHEDI, René P ; VÖLZING, Christian ; SCHMITT, Andreas ; FRIEN, Michael ; JUNG, Martin ; DUDEK, Johanna ; WORTELKAMP, Stefanie ; SICKMANN, Albert ; ZIMMERMANN, Richard: Analysis of the membrane proteome of canine pancreatic rough microsomes identifies a novel Hsp40, termed ERj7. In: *Proteomics* 9 (2009), Nr. 13, S. 3463–3473
- [48] MILLER, Joshua D. ; TAJIMA, Shoji ; LAUFFER, Leander ; WALTER, Peter: The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. In: *The Journal of Cell Biology* 128 (1995), Nr. 3, S. 273–282
- [49] YOUNG, Jason C. ; URSINI, Josie ; LEGATE, Kyle R. ; MILLER, Joshua D. ; WALTER, Peter ; ANDREWS, David W.: An amino-terminal domain containing hydrophobic and hydrophilic sequences binds the signal recognition particle receptor  $\alpha$  subunit to the  $\beta$  subunit on the endoplasmic reticulum membrane. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), Nr. 26, S. 15650–15657
- [50] DESHAIES, Raymond J. ; SANDERS, Sylvia L. ; FELDHEIM, David A. ; SCHEKMAN, Randy: Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. In: *Nature* 349 (1991), S. 806–808
- [51] SCHLENSTEDT, G ; GUDMUNDSSON, Gudmundur H. ; BOMAN, HG ; ZIMMERMANN, R: A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), Nr. 23, S. 13960–13968
- [52] LANG, Sven ; BENEDIX, Julia ; FEDELES, Sorin V. ; SCHORR, Stefan ; SCHIRRA, Claudia ; SCHÄUBLE, Nico ; JALAL, Carolin ; GREINER, Markus ; HASSDENTEUFEL, Sarah ; TATZELT, Jörg u. a.: Different effects of Sec61 $\alpha$ , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. In: *Journal of Cell Science* 125 (2012), Nr. 8, S. 1958–1969
- [53] TAKACS, ZF ; SOLOMAYER, EF ; SCHICK, B ; ZIMMERMANN, R ; GREINER, M ; BOHLE, RM ; LINXWEILER, M: Identifikation von SEC62 als EMT induzierendes Onkogen der 3q Region in präkanzerösen Läsionen der Zervix. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 74 (2014), Nr. S 01, S. FV\_07\_06
- [54] LINXWEILER, Maximilian ; SCHORR, Stefan ; SCHÄUBLE, Nico ; JUNG, Martin ; LINXWEILER, Johannes ; LANGER, Frank ; SCHÄPFERS, Hans-Joachim ; CAVALIÉ, Adolfo ; ZIMMERMANN, Richard ; GREINER, Markus: Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. In: *BMC Cancer* 13 (2013), Nr. 1, S. 1
- [55] ESCHRICH, Steven ; YANG, Ivana ; BLOOM, Greg ; KWONG, Ka Y. ; BOULWARE, David ; CANTOR, Alan ; COPPOLA, Domenico ; KRUGHØFFER, Mogens ; AALTONEN, Lauri ; ORNTOFT, Torben F. u. a.: Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. In: *Journal of Clinical Oncology* 23 (2005), Nr. 15, S. 3526–3535
- [56] AMPOFO, Emmanuel ; WELKER, Sabrina ; JUNG, Martin ; MÜLLER, Linda ; GREINER, Markus ; ZIMMERMANN, Richard ; MONTENARI, Mathias: CK2 phosphorylation of human Sec63 regulates its interaction with Sec62. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1830 (2013), Nr. 4, S. 2938–2945
- [57] TYEDMERS, Jens ; LERNER, Monika ; BIES, Christiane ; DUDEK, Johanna ; SKOWRONEK, Markus H. ; HAAS, Ingrid G. ; HEIM, Nicole ; NASTAINCZYK, Wolfgang ; VOLKMER, Jörg ; ZIMMERMANN, Richard: Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), Nr. 13, S. 7214–7219
- [58] SKOWRONEK, Markus H. ; ROTTER, Max ; HAAS, Ingrid G.: Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. In: *Biological Chemistry* 380 (1999), Nr. 9, S. 1133–1138
- [59] HAMMAN, Brian D. ; HENDERSHOT, Linda M. ; JOHNSON, Arthur E.: BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. In: *Cell* 92 (1998), Nr. 6, S. 747–758
- [60] SCHORR, Stefan ; KLEIN, Marie-Christine ; GAMAYUN, Igor ; MELNYK, Armin ; JUNG, Martin ; SCHÄUBLE, Nico ; WANG, Qian ; HEMMIS, Birgit ; BOCHEN, Florian ; GREINER, Markus u. a.: Co-chaperone specificity in gating of the polypeptide conducting channel in the membrane of the human endoplasmic reticulum. In: *Journal of Biological Chemistry* 290 (2015), Nr. 30, S. 18621–18635
- [61] BRODSKY, Jeffrey L. ; GOECKELER, Jennifer ; SCHEKMAN, Randy: BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995), Nr. 21, S. 9643–9646
- [62] DAVILA, Sonia ; FURU, Laszlo ; GHARAVI, Ali G. ; TIAN, Xin ; ONOE, Tamehito ; QIAN, Qi ; LI, Airong ; CAI, Yiqiang ; KAMATH, Patrick S. ; KING, Bernard F. u. a.: Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. In: *Nature Genetics* 36 (2004), Nr. 6, S. 575–577

- [63] PREHN, Siegfried ; HERZ, Joachim ; HARTMANN, Enno ; KURZCHALIA, Teymuraz V. ; FRANK, Rainer ; RÖMISCH, Karin ; DOBBERSTEIN, Bernhard ; RAPOPORT, Tom A.: Structure and biosynthesis of the signal-sequence receptor. In: *European Journal of Biochemistry* 188 (1990), Nr. 2, S. 439–445
- [64] GÖRLICH, Dirk ; PREHN, Siegfried ; HARTMANN, Enno ; HERZ, Joachim ; OTTO, Albrecht ; KRAFT, Regine ; WIEDMANN, Martin ; KNESPEL, Siegne ; DOBBERSTEIN, Bernhard ; RAPOPORT, Tom A.: The signal sequence receptor has a second subunit and is part of a translocation complex in the endoplasmic reticulum as probed by bifunctional reagents. In: *The Journal of Cell Biology* 111 (1990), Nr. 6, S. 2283–2294
- [65] HARTMANN, Enno ; GÖRLICH, Dirk ; KOSTKA, Susanne ; OTTO, Albrecht ; KRAFT, Regine ; KNESPEL, Signe ; BÜRGER, Elke ; RAPOPORT, Tom A. ; PREHN, Siegfried: A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. In: *European Journal of Biochemistry* 214 (1993), Nr. 2, S. 375–381
- [66] TYSON, John R. ; STIRLING, Colin J.: LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. In: *The EMBO Journal* 19 (2000), Nr. 23, S. 6440–6452
- [67] KABANI, Mehdi ; BECKERICH, Jean-Marie ; GAILLARDIN, Claude: Sls1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000), Nr. 18, S. 6923–6934
- [68] CHUNG, Kyung T. ; SHEN, Ying ; HENDERSHOT, Linda M.: BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 49, S. 47557–47563
- [69] ZHAO, Lihong ; LONGO-GUESS, Chantal ; HARRIS, Belinda S. ; LEE, Jeong-Woong ; ACKERMAN, Susan L.: Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. In: *Nature Genetics* 37 (2005), Nr. 9, S. 974–979
- [70] ANTONONEN, Anna-Kaisa ; MAHJNEH, Ibrahim ; HÄMÄLÄINEN, Riikka H. ; LAGIER-TOURENNE, Clotilde ; KOPRA, Outi ; WARIS, Laura ; ANTONONEN, Mikko ; JOENSUU, Tarja ; KALIMO, Hannu ; PAETAU, Anders u. a.: The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. In: *Nature Genetics* 37 (2005), Nr. 12, S. 1309–1311
- [71] SENDEREK, Jan ; KRIEGER, Michael ; STENDEL, Claudia ; BERGMANN, Carsten ; MOSER, Markus ; BREITBACH-FALLER, Nico ; RUDNIK-SCHÖNEBORN, Sabine ; BLASCHEK, Astrid ; WOLF, Nicole I. ; HARTING, Inga u. a.: Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjögren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. In: *Nature Genetics* 37 (2005), Nr. 12, S. 1312–1314
- [72] ROOS, Andreas ; BUCHKREMER, Stephan ; KOLLIPARA, Laxmikanth ; LABISCH, Thomas ; GATZ, Christian ; ZITZELSBERGER, Manuela ; BRAUERS, Eva ; NOLTE, Kay ; SCHRÖDER, J. M. ; KIRSCHNER, Janbernd u. a.: Myopathy in Marinesco-Sjögren syndrome links endoplasmic reticulum chaperone dysfunction to nuclear envelope pathology. In: *Acta Neuropathologica* 127 (2014), Nr. 5, S. 761–777
- [73] HAAS, Ingrid G. ; WABL, Matthias: Immunoglobulin heavy chain binding protein. In: *Nature* 306 (1983), Nr. 5941, S. 387–389
- [74] LIN, HY ; MASSO-WELCH, P ; DI, YP ; CAI, JW ; SHEN, JW ; SUBJECT, JR: The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. In: *Molecular Biology of the Cell* 4 (1993), Nr. 11, S. 1109–1119
- [75] GETHING, Mary-Jane: Role and regulation of the ER chaperone BiP. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* Bd. 10 Elsevier, 1999, S. 465–472
- [76] FELDHEIM, D ; ROTHBLATT, J ; SCHEKMAN, R: Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. In: *Molecular and Cellular Biology* 12 (1992), Nr. 7, S. 3288–3296
- [77] SCHÄUBLE, Nico ; LANG, Sven ; JUNG, Martin ; CAPPEL, Sabine ; SCHORR, Stefan ; ULUCAN, Özlem ; LINXWEILER, Johannes ; DUDEK, Johanna ; BLUM, Robert ; HELMS, Volkhard u. a.: BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. In: *The EMBO Journal* 31 (2012), Nr. 15, S. 3282–3296
- [78] WEITZMANN, Andreas ; VOLKMER, Jörg ; ZIMMERMANN, Richard: The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of Sil1 function in man and mouse. In: *FEBS Letters* 580 (2006), Nr. 22, S. 5237–5240
- [79] CAPPEL, Sabine: *Funktionale Charakterisierung der ER-luminalen Proteine BiP, Grp170 und Sil1 hinsichtlich der Zellovitalität und der Protein-Biogenese*, Universität des Saarlandes, Homburg, Diss., 2011
- [80] BIES, Christiane ; GUTH, Silvia ; JANOSCHEK, Katja ; NASTAINCZYK, Wolfgang ; VOLKMER, Jörg ; ZIMMERMANN, Richard: A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. In: *Biological Chemistry* 380 (1999), Nr. 10, S. 1175–1182
- [81] ELLGAARD, Lars ; RUDDOCK, Lloyd W.: The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. In: *EMBO reports* 6 (2005), Nr. 1, S. 28–32
- [82] HATAHET, Feras ; RUDDOCK, Lloyd W.: Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. In: *Antioxidants & redox signaling* 11 (2009), Nr. 11, S. 2807–2850
- [83] MURKOFKY, NA ; LAMM, Michael E.: Effect of a disulfide-interchange enzyme on the assembly of human secretory



- immunoglobulin A from immunoglobulin A and free secretory component. In: *Journal of Biological Chemistry* 254 (1979), Nr. 23, S. 12181–12184
- [84] BIES, Christiane ; BLUM, Robert ; DUDEK, Johanna ; NASTAINCZYK, Wolfgang ; OBERHAUSER, Simone ; JUNG, Martin ; ZIMMERMANN, Richard: Characterization of pancreatic ERj3p, ahomolog of yeast DnaJ-like protein Scj1p. In: *Biological Chemistry* 385 (2004), Nr. 5, S. 389–395
- [85] OTERO, Joel H. ; LIZÁK, Beata ; FEIGE, Matthias J. ; HENDERSHOT, Linda M.: Dissection of structural and functional requirements that underlie the interaction of ERdj3 protein with substrates in the endoplasmic reticulum. In: *Journal of Biological Chemistry* 289 (2014), Nr. 40, S. 27504–27512
- [86] PETROVA, Kseniya ; OYADOMARI, Seiichi ; HENDERSHOT, Linda M. ; RON, David: Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3. In: *The EMBO Journal* 27 (2008), Nr. 21, S. 2862–2872
- [87] DEJGAARD, Kurt ; THEBERGE, Jean-Francois ; HEATH-ENGEL, Hannah ; CHEVET, Eric ; TREMBLAY, Michel L. ; THOMAS, David Y.: Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis. In: *Journal of Proteome Research* 9 (2010), Nr. 4, S. 1763–1771
- [88] OYADOMARI, Seiichi ; YUN, Chi ; FISHER, Edward A. ; KREGLINGER, Nicola ; KREIBICH, Gert ; OYADOMARI, Miho ; HARDING, Heather P. ; GOODMAN, Alan G. ; HARANT, Hanna ; GARRISON, Jennifer L. u. a.: Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. In: *Cell* 126 (2006), Nr. 4, S. 727–739
- [89] LEE, Tae G. ; TANG, Norina ; THOMPSON, Samantha ; MILLER, James ; KATZE, Michael G.: The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. In: *Molecular and Cellular Biology* 14 (1994), Nr. 4, S. 2331–2342
- [90] SILBERSTEIN, Susana ; SCHLENSTEDT, Gabriel ; SILVER, Pam A. ; GILMORE, Reid: A role for the DnaJ homologue Scj1p in protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. In: *The Journal of Cell Biology* 143 (1998), Nr. 4, S. 921–933
- [91] SHEN, Ying ; HENDERSHOT, Linda M.: ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. In: *Molecular Biology of the Cell* 16 (2005), Nr. 1, S. 40–50
- [92] YU, Min ; HASLAM, David B.: Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. In: *Infection and Immunity* 73 (2005), Nr. 4, S. 2524–2532
- [93] GUO, Feng ; SNAPP, Erik L.: ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells. In: *Journal of Cell Science* 126 (2013), Nr. 6, S. 1429–1439
- [94] SYNOFZIK, Matthis ; HAACK, Tobias B. ; KOPAJTICH, Robert ; GORZA, Matteo ; RAPAPORT, Doron ; GREINER, Markus ; SCHÖNFELD, Caroline ; FREIBERG, Clemens ; SCHORR, Stefan ; HOLL, Reinhard W. u. a.: Absence of BiP co-chaperone DNAJC3 causes diabetes mellitus and multisystemic neurodegeneration. In: *The American Journal of Human Genetics* 95 (2014), Nr. 6, S. 689–697
- [95] RUTKOWSKI, D T. ; KANG, Sang-Wook ; GOODMAN, Alan G. ; GARRISON, Jennifer L. ; TAUNTON, Jack ; KATZE, Michael G. ; KAUFMAN, Randal J. ; HEGDE, Ramanujan S.: The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. In: *Molecular Biology of the Cell* 18 (2007), Nr. 9, S. 3681–3691
- [96] JUNGNICHEL, Berit ; RAPOPORT, Tom A.: A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. In: *Cell* 82 (1995), Nr. 2, S. 261–270
- [97] SCHORR, Stefan: *Funktionelle Charakterisierung Translokon-assoziiierter Proteine bei der Regulation des Sec61-Komplexes*, Universität des Saarlandes, Homburg, Diss., 2014
- [98] WATTS, Colin ; WICKNER, William ; ZIMMERMANN, Richard: M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (1983), Nr. 10, S. 2809–2813
- [99] LUCEY, Brendan P. ; NELSON-REES, Walter A. ; HUTCHINS, Grover M.: Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133 (2009), Nr. 9, S. 1463–1467
- [100] LAEMMLI, Ulrich K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685
- [101] GÜLTEKIN, H ; HEERMANN, KH: Transblotting of proteins to PVDF membrane and specific detection using a multiple slit plate. In: *Analytical Biochemistry* 172 (1988), S. 320–329
- [102] FELGNER, Philip L. ; GADEK, Thomas R. ; HOLM, Marilyn ; ROMAN, Richard ; CHAN, Hardy W. ; WENZ, Michael ; NORTHROP, Jeffrey P. ; RINGOLD, Gordon M. ; DANIELSEN, Mark: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (1987), Nr. 21, S. 7413–7417
- [103] FELGNER, Jiin H. ; KUMAR, Raj ; SRIDHAR, CN ; WHEELER, Carl J. ; TSAI, Yali J. ; BORDER, Richard ; RAMSEY, Phillip ; MARTIN, Michael ; FELGNER, Philip L.: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 4, S. 2550–2561
- [104] FUJIKI, Yukio ; HUBBARD, Ann L. ; FOWLER, Stanley ; LAZAROW, Paul B.: Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. In: *The Journal of Cell Biology* 93 (1982), Nr. 1, S. 97–102

- [105] SINHA, YN: Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. In: *Endocrine Reviews* 16 (1995), Nr. 3, S. 354–369
- [106] LEWIS, Urban J. ; SINGH, Rama N. ; SINHA, Yagya N. ; VANDERLAAN, Willard P.: Glycosylated Human Prolactin\*. In: *Endocrinology* 116 (1985), Nr. 1, S. 359–363
- [107] BERGHMAN, Luc R. ; LENS, P ; DECUYPERE, Eddy ; KÜHN, ER ; VANDESANDE, Frans: Glycosylated chicken growth hormone. In: *General and comparative endocrinology* 68 (1987), Nr. 3, S. 408–414
- [108] GÖRLICH, Dirk ; RAPOPORT, Tom A.: Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. In: *Cell* 75 (1993), Nr. 4, S. 615–630
- [109] THEIS, Melanie: *Untersuchungen des humanen Sec62-Proteins beim Proteintransport in das endoplasmatische Retikulum*, Universität des Saarlandes, Homburg, Diss., 2013
- [110] OBEID, Rima ; HERRMANN, Wolfgang: The emerging role of unmetabolized folic acid in human diseases: myth or reality? In: *Current Drug Metabolism* 13 (2012), Nr. 8, S. 1184–1195
- [111] BRODY, M ; BÖHM, I ; BIWER, E ; BAUER, R: [Successful treatment of panarteritis nodosa with low-dose methotrexate therapy]. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 45 (1994), Nr. 7, S. 476–479
- [112] SHAH, Gaurav D. ; YAHALOM, Joachim ; CORREA, Denise D. ; LAI, Rose K. ; RAIZER, Jeffrey J. ; SCHIFF, David ; LAROCCA, Renato ; GRANT, Barbara ; DEANGELIS, Lisa M. ; ABREY, Lauren E.: Combined immunochemotherapy with reduced whole-brain radiotherapy for newly diagnosed primary CNS lymphoma. In: *Journal of Clinical Oncology* 25 (2007), Nr. 30, S. 4730–4735
- [113] GRUHLER, Albrecht ; ONO, Hideyu ; GUIARD, Bernard ; NEUPERT, Walter ; STUART, RA: A novel intermediate on the import pathway of cytochrome b2 into mitochondria: evidence for conservative sorting. In: *The EMBO Journal* 14 (1995), Nr. 7, S. 1349
- [114] NAGASAWA, Koji ; HIGASHI, Toshio ; HOSOKAWA, Nobuko ; KAUFMAN, Randal J. ; NAGATA, Kazuhiro: Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. In: *EMBO reports* 8 (2007), Nr. 5, S. 483–489
- [115] CONNOLLY, Timothy ; COLLINS, Paula ; GILMORE, Reid: Access of proteinase K to partially translocated nascent polypeptides in intact and detergent-solubilized membranes. In: *The Journal of Cell Biology* 108 (1989), Nr. 2, S. 299–307
- [116] MEYER, David I. ; KRAUSE, Elke ; DOBBERSTEIN, Bernhard: Secretory protein translocation across membranes—the role of the ‘docking protein’. In: *Nature* 297 (1982), S. 647–650
- [117] HANN, Byron C. ; WALTER, Peter: The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. In: *Cell* 67 (1991), Nr. 1, S. 131–144
- [118] LIU, Li ; LIANG, Xue-hai ; ULIEL, Shai ; UNGER, Ron ; ULLU, Elisabetta ; MICHAELI, Shulamit: RNA interference of signal peptide-binding protein SRP54 elicits deleterious effects and protein sorting defects in trypanosomes. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 49, S. 47348–47357
- [119] LAKKARAJU, Asvin K. ; LUYET, Pierre-Philippe ; PARONE, Philippe ; FALGUIÈRES, Thomas ; STRUB, Katharina: Inefficient targeting to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle elicits selective defects in post-ER membrane trafficking. In: *Experimental Cell Research* 313 (2007), Nr. 4, S. 834–847
- [120] WALTER, Peter ; LINGAPPA, Vishwanath R.: Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. In: *Annual Review of Cell Biology* 2 (1986), Nr. 1, S. 499–516
- [121] SCHWARTZ, Thomas ; BLOBEL, Günter: Structural basis for the function of the  $\beta$  subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. In: *Cell* 112 (2003), Nr. 6, S. 793–803
- [122] GILBERT, Luke A. ; LARSON, Matthew H. ; MORSUT, Leonardo ; LIU, Zairan ; BRAR, Gloria A. ; TORRES, Sandra E. ; STERN-GINOSSAR, Noam ; BRANDMAN, Onn ; WHITEHEAD, Evan H. ; DOUDNA, Jennifer A. u. a.: CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. In: *Cell* 154 (2013), Nr. 2, S. 442–451
- [123] BARRANGOU, Rodolphe ; FREMAUX, Christophe ; DEVEAU, H el ene ; RICHARDS, Melissa ; BOYAVAL, Patrick ; MOINEAU, Sylvain ; ROMERO, Dennis A. ; HORVATH, Philippe: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. In: *Science* 315 (2007), Nr. 5819, S. 1709–1712
- [124] OGG, Stephen C. ; BARZ, Wolfgang P. ; WALTER, Peter: A functional GTPase domain, but not its transmembrane domain, is required for function of the SRP receptor  $\beta$ -subunit. In: *The Journal of Cell Biology* 142 (1998), Nr. 2, S. 341–354
- [125] YOUNG, Barry P. ; CRAVEN, Rachel A. ; REID, Peter J. ; WILLER, Martin ; STIRLING, Colin J.: Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. In: *The EMBO Journal* 20 (2001), Nr. 1-2, S. 262–271
- [126] HENNESSY, Fritha ; BOSHOFF, Aileen ; BLATCH, Gregory L.: Rational mutagenesis of a 40 kDa heat shock protein from *Agrobacterium tumefaciens* identifies amino acid residues critical to its in vivo function. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005), Nr. 1, S. 177–191
- [127] HUIZEN, Rika van ; MARTINDALE, Jennifer L. ; GOROSPE, Myriam ; HOLBROOK, Nikki J.: P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 $\alpha$  signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 18, S. 15558–15564

- [128] HESSA, Tara ; MEINDL-BEINKER, Nadja M. ; BERNSEL, Andreas ; KIM, Hyun ; SATO, Yoko ; LERCH-BADER, Mirjam ; NILSSON, IngMarie ; WHITE, Stephen H. ; HEIJNE, Gunnar von: Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. In: *Nature* 450 (2007), Nr. 7172, S. 1026–1030
- [129] GODER, Veit ; SPIESS, Martin: Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum. In: *The EMBO Journal* 22 (2003), Nr. 14, S. 3645–3653
- [130] DEVARANENI, Prasanna K. ; CONTI, Brian ; MATSUMURA, Yoshihiro ; YANG, Zhongying ; JOHNSON, Arthur E. ; SKACH, William R.: Stepwise insertion and inversion of a type II signal anchor sequence in the ribosome-Sec61 translocon complex. In: *Cell* 146 (2011), Nr. 1, S. 134–147
- [131] LYMAN, Susan K. ; SCHEKMAN, Randy: Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of Cell Biology* 131 (1995), Nr. 5, S. 1163–1171
- [132] POTTER, Matthew D. ; NICCHITTA, Christopher V.: Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 43, S. 33828–33835
- [133] POTTER, Matthew D. ; NICCHITTA, Christopher V.: Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 26, S. 23314–23320
- [134] PALAZZO, Alexander F. ; SPRINGER, Michael ; SHIBATA, Yoko ; LEE, Chung-Sheng ; DIAS, Anusha P. ; RAPOPORT, Tom A.: The signal sequence coding region promotes nuclear export of mRNA. In: *PLoS Biol* 5 (2007), Nr. 12, S. e322
- [135] HULL, J D. ; GILMORE, Reid ; LAMB, Robert A.: Integration of a small integral membrane protein, M2, of influenza virus into the endoplasmic reticulum: analysis of the internal signal-anchor domain of a protein with an ectoplasmic NH2 terminus. In: *The Journal of Cell Biology* 106 (1988), Nr. 5, S. 1489–1498
- [136] PLATH, Kathrin ; MOTHE, Walther ; WILKINSON, Barrie M. ; STIRLING, Colin J. ; RAPOPORT, Tom A.: Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. In: *Cell* 94 (1998), Nr. 6, S. 795–807
- [137] LEE, Tae G. ; TOMITA, Judy ; HOVANESSIAN, Ara G. ; KATZE, Michael G.: Purification and partial characterization of a cellular inhibitor of the interferon-induced protein kinase of Mr 68,000 from influenza virus-infected cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (1990), Nr. 16, S. 6208–6212
- [138] BARBER, Glen N. ; THOMPSON, Samantha ; LEE, Tae G. ; STROM, Ted ; JAGUS, Rosemary ; DARVEAU, Andre ; KATZE, Michael G.: The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1994), Nr. 10, S. 4278–4282
- [139] EILERS, Martin ; SCHATZ, Gottfried: Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. In: *Nature* 322 (1985), Nr. 6076, S. 228–232
- [140] ZIMMERMANN, Richard ; MÜLLER, Linda ; WULLICH, Bernd: Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. In: *Trends in Molecular Medicine* 12 (2006), Nr. 12, S. 567–573
- [141] AST, Tslil ; MICHAELIS, Susan ; SCHULDINER, Maya: The Protease Ste24 Clears Clogged Translocons. In: *Cell* 164 (2016), Nr. 1, S. 103–114

---

# DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Richard Zimmermann, der mir die Promotion überhaupt erst ermöglicht hat. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung, Forderung und Förderung sowie die stetige Unterstützung, konstruktive Kritik und Offenheit gegenüber Fragen und Problemen.

Prof. Dr. Markus Hoth danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Funktion als Zweitkorrektor.

Einen großen Dank möchte ich außerdem allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zimmermann aussprechen. Vor allem danke ich Dr. Markus Greiner, der mir in jeder Lage mit fachlichem Rat und Tat zur Seite stand, mich unterstützt und motiviert hat. Danke vor allem für die Geduld und für den konstruktiv-kritischen Blick. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Martin Jung und Dr. Johanna Dudek für ihre Unterstützung bei Fragen und Problemen bedanken. Ein herzlicher Dank gebührt Monika Lerner für ihre immense und unbezahlbare Hilfe durch technische oder methodische Unterstützung und Beratung. Außerdem bedanke ich mich sehr bei allen Doktoranden der Arbeitsgruppen Zimmermann und Schlenstedt für die große Hilfsbereitschaft, Kritik, Diskussionen, ständige Motivationen und aufbauende Worte, so manche lustige Feierabende und auch Fahrdienste. Vielen Dank insbesondere an Tina und Anke, sowie an Sarah, Nico, Armin, Tillman, Pavel, Florian, Stefan, Regine, Julia und Hanne.

Dem Graduiertenkolleg 1326 und dem Sonderforschungsbereich SFB 894 danke ich für die fachliche Förderung und finanzielle Unterstützung. Auch bei Judith Arend und Prof. Dr. Dieter Bruns möchte ich mich für die gute Organisation des Graduiertenkollegs bedanken.

Bei all meinen Freunden möchte mich ich für ihr offenes Ohr, die Abwechslung und die stetige moralische Stütze bedanken.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern, die mich während der gesamten Zeit meiner Dissertation maßlos unterstützt haben, mir die nötige Kraft gegeben haben und Mut gemacht haben, niemals aufzugeben. Danke auch an meine Neffen, die mir immer eine Flucht in unbeschwerte Momente ermöglicht und mich mit ihrem Lachen erfreut haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, ohne deren Rückhalt ich diesen Punkt nie erreicht hätte!

Danke!

---