

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

Der Sec61-Komplex des Endoplasmatischen Retikulums:
Proteintargetingrouten und pathogene Mechanismen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2021

Vorgelegt von: Mark Sicking
geb. am: 21.11.1992 in Ahaus

Tag der Promotion: 07. Januar 2022

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

Gutachter: Prof. Dr. Richard Zimmermann

Univ. Prof. Dr. Frank Schmitz

Dr. Andreas Beck

Meiner Familie
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	v
2.	Abstract	ix
3.	Zusammenfassung	x
4.	Einleitung	1
4.1.	Ein Organell mit zentralen Funktionen: Das Endoplasmatische Retikulum	1
4.2.	Der Proteintranslokase-Komplex: Multiple Funktionen durch Interaktionen.....	3
4.3.	Transport von naszierenden Proteinen	8
4.3.1.	Signalsequenzen und Transmembrandomänen als Richtungsweiser zum ER.....	8
4.3.2.	Cotranslatationaler Transport: Zusammenarbeit des Ribosoms mit Sec61	10
4.3.3.	Variable Möglichkeiten des posttranslationalen Transportes.....	12
4.3.4.	Der SND abhängige Transportweg	14
4.3.5.	Proteininsertion verschiedener Substrate in das ER	16
4.3.6.	Molekulare Chaperone: BiP als Faltungshelfer und Kanalöffner	19
4.4.	Die Calciumhomöostase der Zelle	21
4.4.1.	Die Verteilung und Regulierung von Calcium in der Zelle	21
4.4.2.	Calciumleak: Ursprung und Funktion	23
4.4.3.	Der SOCE gleicht Calciummangel aus	24
4.4.4.	SERCA als Calcium ATPase des ERs	25
4.5.	ER-assoziierte Pathophysiologie	26
4.5.1.	ADTKD: Ursachen und Symptomatik.....	26
4.5.2.	Pathophysiologie im Kontext des Translokons.....	29
4.5.2.1.	Die <i>SEC61A1</i> -Mutationen V67G und T185A führen zu ADTKD.....	29
4.5.2.2.	Weitere pathophysiologische Phänotypen nach Mutationen in <i>SEC61A1</i>	30
4.6.	Zielsetzung der Arbeit.....	33
5.	Material und Methoden	34
5.1.	Material.....	34
5.1.1.	Geräte und Software.....	34
5.1.2.	Chemikalien, Enzyme und Kits	36
5.1.3.	Antikörper	38
5.1.3.1.	Primäre Antikörper.....	38
5.1.3.2.	Sekundäre Antikörper	41
5.1.4.	Peptide	41
5.1.5.	DNA-Oligonukleotide (Primer).....	42
5.1.6.	Plasmide.....	45
5.1.7.	Raue Mikrosomen.....	48

5.1.8.	Bakterien	48
5.1.9.	Zelllinien	48
5.1.9.1.	HeLa-Zellen	48
5.1.9.2.	HEK293-Zellen	49
5.2.	Methoden der Proteinbiochemie	50
5.2.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Assay)	50
5.2.2.	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
5.2.3.	Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau	53
5.2.4.	Western Blot und immunologische Proteindetektion	54
5.2.5.	Fixieren und Trocknen von SDS PAGE Gelen	56
5.2.6.	Immunpräzipitationen	56
5.2.7.	Fällung von Proteinen durch TCA	59
5.2.8.	SERCA-Aktivitätsassay.....	60
5.2.9.	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in vitalen Zellen mit Hilfe des NanoBiT-Systems.....	62
5.2.10.	Sequestrierung von Proteinen zum Orientierungsnachweis	70
5.2.11.	Massenspektrometrische Analysen	73
5.2.12.	Densitometrie	74
5.3.	<i>In vitro</i> Protein Synthese und Transport.....	74
5.3.1.	Synthese von mRNA mittels T7 oder SP6 Polymerase	74
5.3.2.	<i>In vitro</i> Transport und radioaktive Markierung von Substraten	75
5.3.3.	Autoradiographie	77
5.3.4.	Modifikation durch 4-PBA Behandlung.....	77
5.3.5.	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation	77
5.4.	Methoden der DNA-Manipulation.....	78
5.4.1.	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	78
5.4.2.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid	79
5.4.3.	Präparation von Plasmid DNA	80
5.4.4.	Bestimmung der DNA-Konzentration und-Reinheit	81
5.4.5.	Isolation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	81
5.4.6.	Agarosegelelektrophorese	81
5.4.7.	Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen mittels PCR	82
5.4.8.	Nachweis von mRNA mittels qRT-PCR	83
5.4.9.	Generierung modifizierter <i>inserts</i> zur Verwendung im Nanobit-System.....	84
5.4.10.	Restriktionsverdau von <i>inserts</i> und Plasmiden.....	85
5.4.11.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	87
5.4.12.	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden.....	87

5.5.	Zellkulturtechniken.....	88
5.5.1.	Kultivierung von Säugerzellen.....	88
5.5.2.	Zellzählung und Größenbestimmung mittels Cytometer.....	88
5.5.3.	Manipulation von Säugerzellen durch Plasmide.....	89
5.5.4.	Manipulation von Säugerzellen durch 4-PBA.....	90
5.5.5.	Präparation von semi-permeabilisierten Zellen.....	91
5.5.6.	Präparation von Zelllysaten.....	92
5.6.	Analyse der Calciumhomöostase der Zelle.....	93
5.6.1.	Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels FURA-2AM.....	94
5.6.2.	Kalibrierung des Mikroskops.....	99
5.6.3.	Bestimmung des luminalen Calciumgehalts anhand GCaMP ₆₋₁₅₀	101
5.7.	Real Time Cell Analyzer.....	102
5.8.	Auswertung und Statistik zu den Ergebnissen.....	103
6.	Ergebnisse	104
6.1.	Aufklärung des hSnd2-Interaktoms.....	104
6.1.1.	Eingrenzung der Interaktionskandidaten per Massenspektrometrie.....	105
6.1.2.	Co-IP zur Identifikation von hSnd2-Interaktionspartnern ohne zusätzliche <i>bait</i> protein-Expression.....	108
6.1.3.	Co-IP mit TMEM109 Varianten zur Bestätigung der Interaktion in der ER-Membran.....	110
6.1.4.	Entgegengerichtete Co-IP zur Bestätigung der weiteren Interaktionskandidaten ..	113
6.1.5.	Bestimmung der hSnd2-Topologie zur Aufklärung möglicher Interaktionsmuster im NanoBiT-System.....	115
6.1.6.	Verifikation des NanoBiT-Systems durch den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb und zwischen Komplexen.....	122
6.1.7.	Nachweis der Interaktion zwischen hSnd2 und TMEM109 in lebenden Zellen mittels NanoBiT.....	126
6.1.8.	Interaktionsmatrix von hSnd2 und TMEM109 im Kontext des Translokons in vitalen Zellen.....	130
6.1.9.	Nachweis der NanoBiT-Konstrukte.....	133
6.2.	Beschreibung biochemischer Fehlfunktionen der ADTKD-assoziierten <i>SEC61A1</i> -Mutationen.....	140
6.2.1.	Genetische und zellphysiologische Charakterisierung der Zelllinien.....	140
6.2.2.	Veränderte Proteinabundanzen geben Hinweise auf Fehlregulation in der Calciumhomöostase.....	143
6.2.3.	Analyse der Calciumhomöostase der ADTKD Zellen.....	146
6.2.4.	Entkopplung der Gesamtcalciumkapazität und dem Sec61-assoziierten Calciumleak.....	150
6.2.5.	Messungen im ER zeigen eine verlangsamte Calciumdepletion aus dem ER.....	153

6.2.6.	Verringerte SERCA2-Abundanz führt zur erhöhten Aktivität der SERCA-Proteine	154
6.2.7.	Calciumleakmessungen geben keinen Hinweis auf UPR-Aktivität	156
6.2.8.	Chemische Chaperone und SERCA-Aktivatoren zeigen einen positiven Einfluss auf den Zellindex	158
6.2.9.	Fehlfunktionen der Calciumhomöostase können durch eine 4-PBA Behandlung verringert werden.....	162
6.2.10.	Mutiertes Sec61 α zeigt reduzierte Sensitivität gegenüber Eeyarestatin1	168
6.2.11.	<i>In vitro</i> Transportstudien zeigen verringerte Transportkapazität spezifischer Substrate	170
6.2.12.	ADTKD-Mutationen üben Signalsequenz spezifische Selektion aus	173
6.2.13.	Verbesserung des Transportes in Anwesenheit von 4-PBA.....	175
6.3.	Modellierung der Interaktion zwischen Sec61 α und 4-PBA.....	176
7.	Diskussion	178
7.1.	Topologie des hSnd2-Proteins in der ER-Membran.....	178
7.2.	Verifikation des NanoBiT-Systems für membranständige Proteine	179
7.3.	Interaktionspartner des hSnd2-Proteins im Proteintargetingweg.....	184
7.4.	Insertion von SND-abhängigen Substraten in die ER-Membran und die Struktur des Translokons in vitalen HeLa-Zellen	186
7.5.	<i>SEC61A1</i> -V67G und -T185A führen zu Fehlfunktionen im Proteintransport und der Calciumhomöostase	189
7.6.	<i>SEC61A1</i> -Mutationen lösen sekundär den ADTKD-Phänotypen aus.....	196
7.7.	Signalsequenzanalysen zeigen Gemeinsamkeiten betroffener Substrate	199
7.8.	Globale RNA-Analyse gibt Hinweise auf fibrotische Nierenpathologie	203
7.9.	4-PBA als potenzielles Medikament gegen ADTKD	208
7.10.	Vergleichbarkeit unterschiedlicher Sec61 α -Mutationen.....	211
8.	Ausblick	214
9.	Literaturverzeichnis	218
10.	Abbildungsverzeichnis	246
11.	Tabellenverzeichnis	248
12.	Publikationen	249
13.	Danksagung	250
14.	Anhang	252
15.	Lebenslauf	258

1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+IP	Fraktion der Co-IP nach der Zugabe der proteinbindenden <i>beads</i>
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
4-PBA	<i>4-phenylbutric acid/ sodium phenylbutyrate</i>
61β	Sec61β
ADP	Adenosindiphosphat
ADSCN	<i>autosomal dominant severe congenital neutropenia</i>
ADTKD	<i>autosomal-dominant tubulointerstitial kidney disease</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APE	Apelin
ATP	Adenosintriphosphat
B	Beadfraktion der Co-IP
BiP	<i>binding-immunoglobulin protein; immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Zweiwertiges Calciumion
CAML	<i>Calcium signal-modulating cyclophilin ligand</i>
CEC	Preprocecropin
C _L	C-terminal LgBiT markiert
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
C _S	C-terminal SmBiT markiert
C-Terminus	Carboxyl Terminus
CVID	<i>common variable immunodeficiency</i>
CYT	Cytochrom b5
dest	Destilliert
Digi.	Digitonin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat der Co-IP
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMC	ER membrane complex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERdj	ER localized DnaJ cofactors
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ES	<i>External solution</i>
ES1	Eeyarestatin 1
<i>et al.</i>	et alii / und andere
EV	<i>empty vector</i> / Leervektor

f.c.	<i>final concentration</i> / finale Konzentration
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FLAG	Proteintag mit der Aminosäuresequenz DYKDDDDK
FS	Forskolin
fwd.	<i>Forward</i>
GET	<i>guided entry of TA proteins</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	hours / Stunden
HeK	<i>Human embryonic kidney</i>
HeLa	“Henrietta Lacks” Gebärmutterhalskrebszellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HaBiT Pep.	High affinity NanoBiT Peptid
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HSV-TK	Herpes simplex virus-1 Thymidine kinase
Iono	Ionomycin
-IP	Fraktion der Co-IP vor der Zugabe der proteinbindenden <i>beads</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
IVC	Invariante Kette
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LgBiT	LargeBiT- <i>tag</i> des NanoBiT Systems
LU	<i>light units</i>
M	Mol
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular weight
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NanoBiT	<i>nanoluciferase binary technology</i>
NBD	Nukleotidbindedomäne
N _L	N-terminal LgBiT markiert
N _S	N-terminal SmBiT markiert
N-Terminus	Amino-Terminus
Oligo	Oligomycin
Ops	Opsin- <i>tag</i>
OST	Oligosaccharyl-Transferase
P	Pellet der Co-IP

PAD	<i>primary antibody deficiencies</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
PK	Pyruvatkinase
PLAC	Pepstain A, Leupetin, Antipain, Chymosatin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPL	Preprolactin
prä.	Vorläufer-nicht transportiertes Protein
PRP	Prionprotein
Pur	Puromycin
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
reif.	Reifes, modifiziertes Protein
Ren	Renin
rev	revers
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RM	Raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
S	<i>S-tag</i>
SBD	Substratbindedomäne
Scr	<i>scrambled</i> , zufällig zusammengesetzte Sequenz
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERCa	<i>sarco/endoplasmic reticulum ATPase pump</i>
SmBiT	SmallBiT- <i>tag</i> des NanoBit Systems
SND	<i>SRP independent</i>
SOCE	<i>store operated calcium entry</i>
SPC	Signalpeptidasekomplex
SPZ	Semi-permeabilisierte Zellen
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SS	Signalsequenz
TA	<i>Tail anchored</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TG	Thapsigargin
TMD	Transmembrandomäne
TRAP	<i>translocon associated protein</i>
TRC40	<i>transmembrane domain recognition complex 40 kDa ATPase subunit</i>
TUD / Tudca	Tauroursodeoxycholsäure
Tun	Tunicamycin
Umod / UMO	Uromodulin
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen
W1-W6	Waschschritte 1 bis 6 der Co-IP
WRB	<i>tryptophan-rich basic protein</i>
WT	Wildtyp

Aminosäuren

Aminosäure	3 Buchstaben	1 Buchstabe	Aminosäure	3 Buchstaben	1 Buchstabe
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Nukleotide

A	Adenin	C	Cytosin
T	Thymin	G	Guanin
U	Uracil		

Erklärung zum Text:

In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit die Ergänzung der Bezeichnung „Protein“ bei Mehrfachnennung des Proteins verzichtet. Die Abgrenzung zu Genen erfolgt durch die kursive Schreibweise des gene ontology Namen.

Beispiel: Sec61 α entspricht dem Sec61 α -Protein und *SEC61A1* stellt das Gen des Sec61 α -Proteins dar.

Ebenfalls zur besseren Lesbarkeit wird der generische Maskulin verwendet. Hierbei sind alle Geschlechter ausdrücklich mitgemeint.

2. Abstract

The Sec61 complex of the endoplasmic reticulum:

Protein targeting routes and pathogenic mechanisms

The Sec61 complex represents a multifunctional protein unit in the membrane of the endoplasmic reticulum, which is composed of three subunits. The Sec61 α protein is the largest and central subunit of this complex. It forms an aqueous pore in the membrane, allowing active transport of newly synthesized proteins into the ER and simultaneously the passive calcium flux out of the ER. Both of these functions are crucial for cell viability. Therefore, the aims of this study were:

(A) To identify the components of the SND protein targeting pathway, which guides proteins to the Sec61 complex. These components are unknown in the human system except for the hSnd2 protein.

(B) To identify, characterize and modulate the pathological effects triggered by *autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease (ADTKD)*-associated *SEC61A1* mutations at the molecular level using a cellular disease model.

Based on Co-IP experiments performed with the hSnd2 protein the ER membrane protein TMEM109 was identified as hSnd3 candidate. The co-localization and direct protein-protein-interaction of these two proteins was confirmed in living cells. Simultaneously, previously published *in vitro* interaction data regarding hSnd2 were confirmed and expanded, as both proteins are in the vicinity of Sec61 α and further translocon components (Fig. 1A).

The ADTKD associated *SEC61A1* mutations V67G (plug domain) and T185A (near to pore ring) are located near to specific functional domains of this protein. Both mutations result in negative protein transport effects, with stronger effects in V67G as in the T185A mutant. A substrate specific transport limitation was revealed. These suggested that the reason of the transport restriction could be determined by the composition of the signal sequence. *live-cell calcium imaging* experiments demonstrated that both mutants had a reduced calcium pool in the ER. The T185A variant showed in contrast to the V67G mutant a reduced Sec61 α -mediated calcium leak from the ER. The reduced amount of total calcium may be related to the observed diminished protein abundances for calcium regulatory proteins. (Fig. 1B).

To correct the malfunctions in the cell culture model the chemical chaperone 4-PBA was used. This drug mitigated the negative effects on protein transport and calcium homeostasis in the mutant cells to the level of the untreated wild type.

Ultimately, my findings provide new insights in understanding protein trafficking of newly synthesized proteins to and into the ER and the Sec61 α dependent calcium regulation.

3. Zusammenfassung

Der Sec61-Komplex stellt eine multifunktionale Proteineinheit in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums dar, welcher aus drei Untereinheiten zusammengesetzt ist. Die größte und zentrale Untereinheit ist das Protein Sec61 α , welches eine wässrige Pore in der Membran bildet und so den aktiven Transport von neu synthetisierten Proteinen in das ER reguliert und den simultanen passiven Calciumstrom aus dem ER heraus erlaubt. Beide Funktionen spielen eine entscheidende Rolle für die Vitalität der Zelle. Daher war es das Ziel dieser Arbeit:

(A) Komponenten des SND-Proteintargetingweges zum Sec61-Komplex zu identifizieren, für den im humanen System nur hSnd2 bekannt ist.

(B) die pathologischen Effekte, die durch *autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease* (ADTKD) assoziierte *SEC61A1*-Mutationen ausgelöst werden, auf molekularbiologischer Ebene anhand eines Zellkulturmodells der Krankheit zu definieren und zu modulieren.

Auf der Basis von Co-IP Experimenten, die mit dem hSnd2-Protein durchgeführt wurden, ist TMEM109-Protein durch dessen Interaktion als hSnd3-Kandidat identifiziert worden. Die gemeinsame Lokalisation und direkte Interaktion dieser beiden Membranproteine des ER wurde in lebenden Zellen verifiziert. Gleichzeitig wurden bereits publizierte *in vitro* Interaktionsstudien für hSnd2 bestätigt und erweitert, da beide Proteine eine räumliche Nähe zum Sec61 α -Protein und dem Translokonzugehörigen Komponenten aufwiesen (Abb. 1A).

Die ADTKD assoziierten *SEC61A1*-Mutationen V67G und T185A liegen in (V67G \rightarrow *plug* Domäne) oder nahe an (T185A \rightarrow *pore ring*) funktionell wichtigen Domänen des Sec61 α -Proteins. Aus beiden Mutationen resultierten negative Proteintransporteffekte, von welchen die V67G-Mutante stärker betroffen war als die T185A-Mutante. Hierbei zeigten sich substratspezifische Einschränkungen des Proteintransportes. Diese ließen vermuten, dass die Grundlage der Transporteinschränkung in der Zusammensetzung der Signalsequenz zu finden sein könnte. *live-cell calcium imaging* Experimente belegten, dass beide Mutanten einen verringerten Calciumpool im ER aufwiesen. Hier zeigte sich in der T185A-Variante ein ebenfalls reduzierter Sec61 α -vermittelter *Calciumleak* aus dem ER. Die reduzierte Menge des Gesamtcalciums der Zellen könnte in Verbindung mit den reduzierten Proteinabundanz für calciumregulatorische Proteine stehen. Milderung dieser Fehlfunktionen auf Zellkulturebene erfolgte durch das chemische Chaperon 4-PBA. Durch dessen Einsatz konnte der negativ beeinflusste Proteintransport und die fehlregulierte Calciumhomöostase in den mutierten Zellen wieder an das Niveau des unbehandelten Wildtyps angepasst werden (Abb. 1B).

Zusammengenommen liefern die generierten Ergebnisse ein vertieftes Verständnis des Proteintransportes neu synthetisierter Proteine zum und in das ER sowie die Sec61 α -abhängige Calciumregulation.

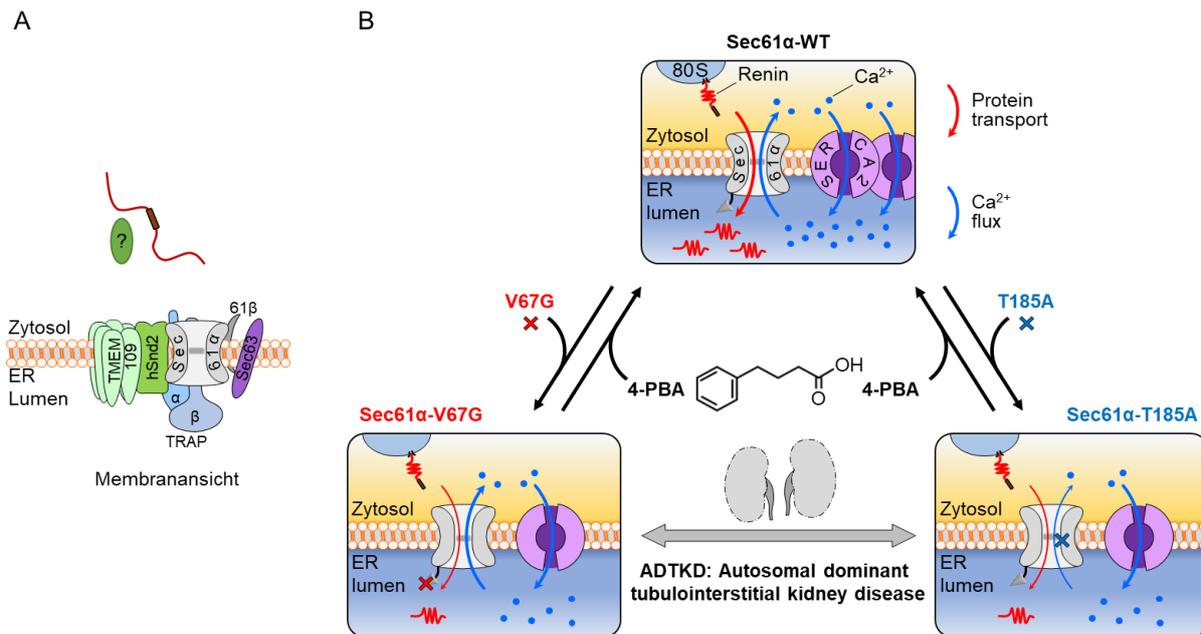


Abb. 1: Grafische Zusammenfassung der experimentellen Arbeiten: A: Lokalisierung und Interaktion des hSnd2 Proteins im Kontext des Translokons. Die Interaktion zwischen hSnd2 und TMEM109 konnte sowohl wechselseitig durch Co-IP, als auch in lebenden Zellen durch das NanoBiT-System nachgewiesen werden. Beide Proteine zeigten Interaktionen sowohl mit Sec61α als auch mit weiteren akzessorischen Komponenten. Dementsprechend wird postuliert, dass TMEM109 als humanes Ortholog zum Snd3-Protein der Hefe angesehen werden kann. **B: ADTKD assoziierte SEC61A1-Mutationen wurden in Bezug auf Proteintransport und Calciumhomöostase untersucht.** Durch die Anwesenheit der V67G Mutante wird der Proteintransport, die Calciumkapazität und die Abundanz unterschiedlicher Proteine beeinflusst. Durch die Anwesenheit der T185A-Mutante wird zusätzlich zu den beschriebenen Effekten ebenfalls der Sec61-vermittelte Calciumleak aus dem ER reduziert. Durch die Behandlung mit 4-PBA konnten die beobachteten pathologischen Effekte des Proteintransportes und der Calciumhomöostase wieder auf das Niveau des unbehandelten Wildtyps normalisiert werden.

4. Einleitung

Trotz der immensen Variabilität des Lebens, basiert dieses in allen Fällen auf einem hochfunktionalen Reaktionsraum, der Zelle. Diese können als Einzeller oder in Zellverbänden mit spezifizierten Funktionen, als Mehrzeller, vorliegen. Schon früh wurde durch Wissenschaftler nachgewiesen, dass Zellen nur aus Zellen entstehen können, also Leben weiteres Leben hervorbringt, geprägt durch das Theorem von R. Virchow (Clarke 1898). Wie die erste Zelle und damit das Leben entstanden ist, kann bis heute nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden, für dessen darauf folgende Entwicklung zu höheren Organismen gibt es jedoch verschiedene Theorien (Martin et al. 2015; Williams & Embley 2015). Bei all den unterschiedlichen Zelltypen, auch innerhalb eines Zellverbundes, ist die gemeinsame Grundlage, dass die Zelle einen nach außen hin scheinbar abgeschlossenen Reaktionsraum darstellt, der in sich alle nötigen Funktionen vereint, um das Überleben und die Replikation der Zelle zu sichern. Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele Forschungen auf zellulärer Ebene beginnen, um dann auf größere Zellverbände oder ganze Organismen übertragen zu werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf einen spezifischen Reaktionsraum innerhalb der Zelle gelegt, das Endoplasmatische Retikulum (ER). Es bestehen zwei Hypothesen zum Ursprung des Organells, die besagen, dass das ER zum einen aus der Invagination der Plasmamembran oder zum anderen als Erweiterung aus der Kernmembran entstanden sein könnte (Baum & Baum 2014). Das Organell selbst ist sowohl für die Calciumhomöostase der Zelle, die Biosynthese von Proteinen und Lipiden, als auch bezüglich der Reaktion auf Stress von zentraler Bedeutung (Jacquemyn et al. 2017; Schwarz & Blower 2016). Mutationen, welche die Homöostase des ERs betreffen, lösen daher nicht nur Effekte am ER selbst aus, sondern nehmen Einfluss auf die gesamte Zelle. Schlussendlich führt dies zu unterschiedlichen pathologischen Phänotypen im Gesamtorganismus (Lin et al. 2008; Manalo & Medina 2018). Im weiteren Verlauf werden sowohl die mit dem ER zusammenhängenden Funktionen des Proteintransportes, der Calciumhomöostase und eine Auswahl pathologischer Defekte näher beschrieben.

4.1. Ein Organell mit zentralen Funktionen: Das Endoplasmatische Retikulum

Durch die Generierung von Subkompartimenten ist die Zelle in einzelne Bereiche aufgeteilt, denen eine spezifische Struktur und Funktion zugeordnet werden konnte. Beispielsweise wird im Zellkern die genetische Information gespeichert, repliziert und transkribiert. In Mitochondrien, einem entsprechend der Endosymbiontentheorie „nachträglich“ aufgenommenen Organell erfolgt unter anderem ein Großteil des Energiemetabolismus der Zelle (Martin et al. 2015). Für das ER sind ebenfalls typische Strukturen und einzigartige Funktionen beschrieben worden. Seit der ersten Beschreibung eines retikulären Netzwerkes im Jahre 1902 und der Entdeckung einer „lace like structure“ in elektromikroskopischen Bildern von kultivierten Zellen im Jahre 1945 wurden große Fortschritte in der Aufklärung dieses

Gebildes erreicht (Margreth 2002; Porter et al. 1945; Veratti 1961). Aufgrund der Lage und der Form dieses intrazellulären Organells wurde der Name des Endoplasmatischen Retikulums (intrazelluläre Netzstruktur) eingeführt, welches dann 1954 erstmalig elektronenmikroskopisch gezeigt werden konnte (Palade & Porter 1954; Porter 1953). Typischerweise ist das ER von einer durchgängigen Doppellipidmembran umschlossen und ein Organell, welches vor allem in sekretorisch aktiven Zellen überproportional stark vorhanden ist (Schwarz & Blower 2016; Voeltz 2002). Die netzartige Ausbreitung in der Zelle erlaubt eine hohe Konnektivität zu anderen Organellen wie Mitochondrien, Golgi oder Endosomen, sowie zur Plasmamembran und Zytoskelett, was eine hohe Dynamik des ERs zur Folge hat (Guo et al. 2018b; Valm et al. 2017; Westrate et al. 2015). Dadurch entstehen innerhalb des Organells verschiedene Funktionsbereiche. Die erste Unterscheidung dieser Domänen erfolgt anhand ihrer Lokalisation, erstens in den membranbildenden Teil um den Zellkern, die sogenannte „*nuclear envelope*“ oder Kernhülle und zweitens in das periphere ER (English et al. 2009; Pavelka & Roth 2010). Hierbei ist auffällig, dass die äußere Membran der Kernhülle fließend in die ER-Membran übergeht und auch die Proteinzusammensetzung dieser Membranen sehr ähnlich ist (Hetzer et al. 2005). Das ER ist hier dicht mit Ribosomen besetzt, sodass neu synthetisierte Proteine, die vor allem in der Interphase benötigt werden, durch das ER bis zur inneren Kernmembran gelangen können (D'Angelo & Hetzer 2006). Das periphere ER besteht in sich ebenfalls aus spezialisierten Zonen, die allerdings durch die dynamische Struktur ständig im Wandel sind (Lang et al. 2019). Der erste Teil ist durch eine flache zisternenartige Struktur definiert und wird als „*sheets*“ bezeichnet, während der zweite aufgrund der röhrenform als tubuläres ER bezeichnet wird. Ein weiterer mikroskopischer Unterschied, welcher ebenfalls namensgebend ist, ist der bereits beschriebene Besatz mit Ribosomen oder Polysomen. Während das zisternenartige ER, aufgrund dieser Anlagerung von Ribosomen auch als raues Endoplasmatisches Retikulum bezeichnet wird, fehlen diese Ribosomen am tubulären Teil, weswegen es auch als glattes endoplasmatisches Retikulum bezeichnet wird (Friedman & Voeltz 2011; Shibata et al. 2006). Strukturell gemeinsam haben diese beiden Formen, dass in jeder Form ein luminaler Durchmesser von ca. 30 nm vorzufinden ist (Shibata et al. 2010). Der glatte, tubuläre Teil des ERs ist funktionell mit der Steroid- und Lipidsynthese assoziiert und bildet unter anderem aus diesem Grund spezialisierte Regionen mit dem Golgi-Kompartiment aus, das *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC), da dort eine biochemische Modifizierung der Lipide erfolgen kann (Fagone & Jackowski 2009). Kontaktstellen werden ebenfalls zur Plasmamembran generiert, die wie in *S. cerevisiae* gezeigt wurde, funktionell die Endo- und Exozytose beeinflussen, die an diesen Kontaktstellen nicht mehr möglich ist (Stradalova et al. 2012). Im humanen System ist in Muskelzellen diese Kontaktzone deutlich ausgeprägter als in anderen Zelltypen, was mit den Calciumregulationsprozessen nach einer Muskelkontraktion zu erklären ist (Orci et al. 2009; Takeshima et al. 2000; Westrate et al.

2015). Das in dieser Arbeit im Fokus liegende raue ER ist durch den Besatz mit Ribosomen einer der zentralen Orte der Proteinbiosynthese. Vom ER abhängig sind sowohl sekretorische als auch membranständige Proteine, die 36 % (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/secretome>; Zugriff 01.07.2021) des humanen proteinkodierenden Genoms umfassen (Aviram & Schuldiner 2017; Uhlen et al. 2015; Wallin & Heijne 1998). Auf die hierfür benötigten Mechanismen wird im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit Bezug genommen. Nach dem Transport über diese Membran hinweg, können die Polypeptidketten im ER Lumen modifiziert werden, beispielsweise durch Faltungen, Assemblierung, Signalsequenzabspaltung oder Glykosylierung (Lodish et al. 2000; van Anken & Braakman 2005). Darauf folgend werden die modifizierten Proteine durch den vesikulären Transport an den Bestimmungsort übertragen.

Auffällig ist, dass in sekretorisch hochaktiven Zellen, wie zum Beispiel Plasmazellen des Bluts oder β -Zellen des Pankreas der ER-sheet-Anteil gesteigert ist, wohingegen Zellen, die eine hohe Abhängigkeit von der Calciumregulation zeigen, beispielsweise Muskelzellen, hauptsächlich aus tubulärem ER bestehen (Schwarz & Blower 2016; Shibata et al. 2006).

Eine zentrale Funktion, sowohl für die Calciumhomöostase und besonders für den Transport neu synthetisierter Proteine, nimmt der Proteintranslokase-Komplex ein. Die Verbindung zwischen pathologischen Phänotypen und Sec61 α , der zentrale Komponente dieses Komplexes, sowie die Hinführung von Substraten zu diesem bilden die zentralen Aspekte dieser Arbeit (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2019; Osborne et al. 2005; Sicking et al. 2021).

4.2. Der Proteintranslokase-Komplex: Multiple Funktionen durch Interaktionen

Der humane Proteintranslokase-Komplex, oder auch Translokon genannt, besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, wobei der heterotrimere Sec61-Komplex die zentrale Rolle als porenbildende Komponente in der Membran erfüllt. Dieser Komplex ermöglicht den Transport eines Großteiles der Proteine auf co- und posttranslationale Weise (Lang et al. 2017; Rychkova & Warshel 2013).

Der Bezug des Sec61-Komplexes zur Proteintranslokation wurde erstmalig 1987 in einem genetischen *screening* Verfahren im Modellorganismus *S. cerevisiae* gezeigt (Deshaies & Schekman 1987). Der Sec61-Komplex besteht in der humanen Form aus den drei Untereinheiten α , β , γ und bildet eine dynamische Struktur in der ER Membran, die geschlossen oder als geöffneter wässriger Kanal vorliegen kann (Görlich et al. 1992a; Lang et al. 2017). Während die Sequenz der α - und der γ -Untereinheit stark konserviert sind, gilt dies nur begrenzt für die β -Untereinheit, was einen Hinweis darauf gibt, warum die zwei erstgenannten Einheiten eine essentielle Rolle für die Zellviabilität spielen (Kinch et al. 2002; Park & Rapoport 2012). Die Benennung der Untereinheiten in unterschiedlichen Organismen

ist verschieden (beispielhaft entspricht Sec61 α in Säugern dem SecY in Bakterien und Sec61p/SSh1p in der Hefe) trotz der funktionellen Konservierung (Denks et al. 2014; Dudek et al. 2015). Dennoch ist es der Fall, dass die α -Untereinheit als die transportvermittelnde Einheit eine deutlich geringere Abundanz in HeLa-Zellen aufweist als die β - und die γ -Untereinheiten (Hein et al. 2015). Dies könnte damit zusammenhängen, dass eine zweite Isoform von Sec61 α , Sec61 α 2, in humanen Zellen vorhanden ist, die in der Publikation von Hein et al. nicht aufgeführt ist (Grupe et al. 2006). Die Analyse der Aminosäuresequenz beider Isoformen zeigt eine Übereinstimmung von 93 %, jedoch ist die zweite Isoform kaum experimentell untersucht oder beschrieben. Durch Kryoelektronen-Mikroskopie und Kristallographiedaten des Sec61 α bzw. SecY in verschiedenen Organismen, wurden funktionell zentrale Domänen identifiziert, die den Proteintransport ermöglichen und strukturell einige Besonderheiten aufweisen (Becker et al. 2009; Gogala et al. 2014; Van den Berg et al. 2004; Voorhees et al. 2014). Die insgesamt zehn Transmembrandomänen (TMD) können in zwei symmetrische Abschnitte aufgeteilt werden, wobei der zytosolische N-Terminus und die TMD eins bis fünf die N-terminale Hälfte bilden und die TMD sechs bis zehn zusammen mit dem ebenfalls zytosolischen C-Terminus die C-terminale Hälfte darstellen (Van den Berg et al. 2004). Verbunden werden die einzelnen Helices durch Loops, die auf zytosolischer und luminaler Seite der Membran verschiedene Funktionen haben. Während der N-Terminus auf zytosolischer Seite als Verbindung zu Calmodulin dient, einem zytosolischen calcium- und proteinbindenden Faktor, sowie die Loops sechs und acht als Ribosom- oder Sec62/63-Bindestelle, sind die Loops fünf und sieben auf luminaler Seite für die Interaktion mit TRAP (in der Hefe ebenfalls Sec63) und *binding immunoglobulin protein* (BiP) verantwortlich (Erdmann et al. 2011; Harsman et al. 2011c; Itskanov & Park 2019; Lang et al. 2019; Ménétret et al. 2007; Pfeffer et al. 2017; Schäuble et al. 2012; Voorhees et al. 2014). Alle genannten Proteine werden im Verlauf der Arbeit näher beschrieben. Aus der Ebene der Membran betrachtet, hat das Protein die Form einer Sanduhr, wobei der engste Teil im Zentrum der Membranebene liegt. In diesem Teil des Kanals, mit 5-8 Å im Durchmesser, sind insgesamt sechs hydrophobe Aminosäuren präsent, die den sogenannten „*pore ring*“ bilden (Van den Berg et al. 2004; Zimmermann et al. 2011). Dieser Ring verringert zum einen die aufzuwendende Energie für den Transport durch geringe Interaktion mit dem zu transportierenden Substrat, zum anderen fungiert er als Abdichtung des wässrigen Kanals während des Proteintransportes (Bol et al. 2007; Cannon et al. 2005). Somit wird die Membranbarriere zwischen Zytosol und ER-Lumen auch während des Transportes aufrechterhalten und eine Diffusion kleiner Moleküle und Ionen ins Zytosol reduziert. Eine beachtenswerte und physiologisch relevante Ausnahme stellt der passive Calciumausstrom für einen Moment nach Abschluss des Transportes dar, wenn Calcium durch den Sec61-Komplex aus dem ER entweicht (Klein et al. 2018; Wirth et al. 2003).

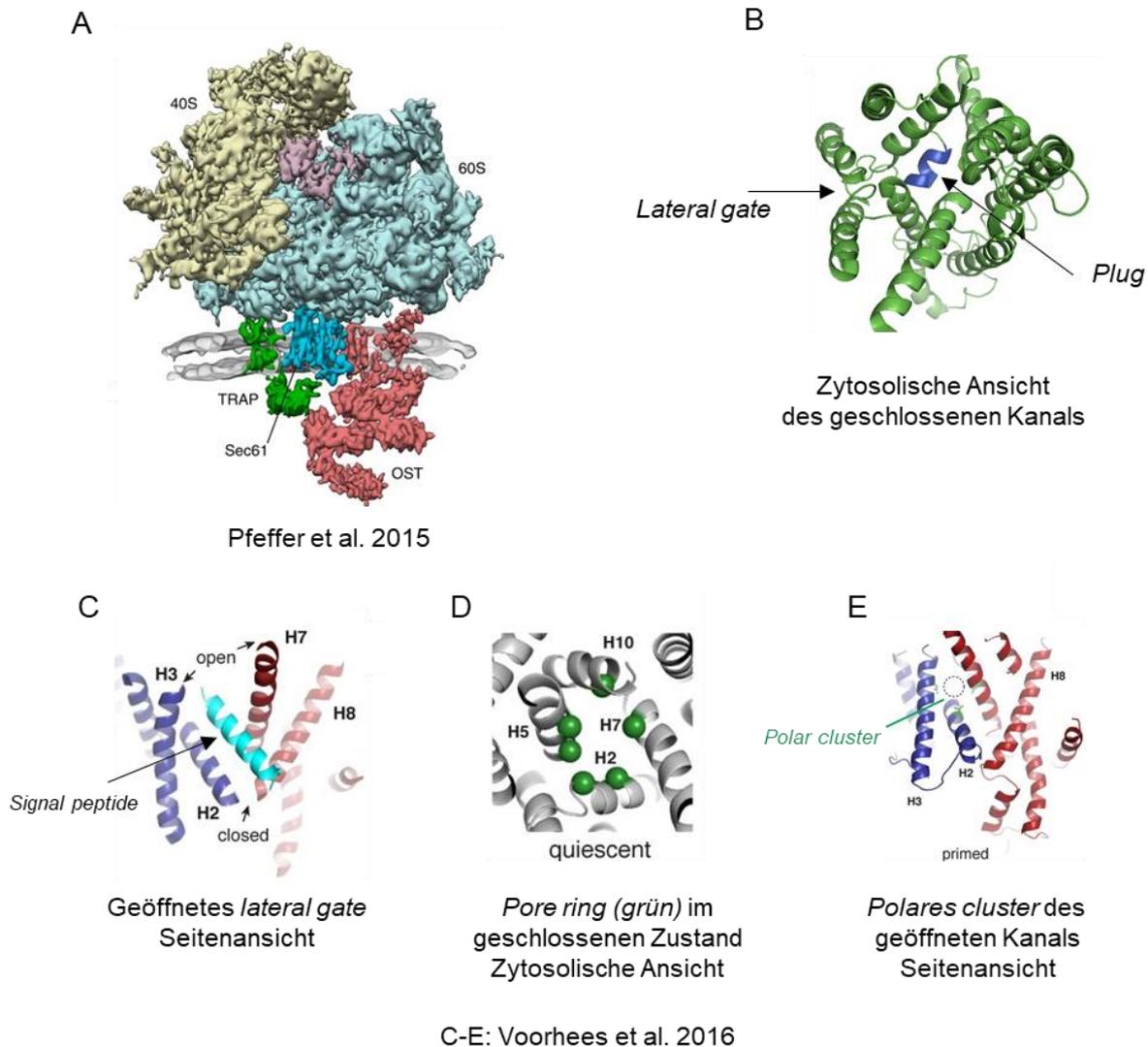


Abb. 2: Darstellung von Sec61 α in der Membran und Positionierung der speziellen Funktionsbereiche. **A:** CET-Struktur des Translokationskomplexes mit einem zytosolisch angelagerten Ribosom. Sec61 ist in blau dargestellt und liegt in Verbindung mit dem TRAP (grün) und dem OST-Komplex (rot) in der ER Membran (grau). Abbildung entnommen aus Pfeffer et al. 2015, lizenziert durch Creative Commons Attribution 4.0 International License. **B:** Helixstruktur des geschlossenen Sec61 α -Kanals basierend auf der PDB Struktur 5A6U (Pfeffer et al. 2015), betrachtet von der zytosolischen Seite. Die TMD sind in grün, die im Kanal liegende *plug* Domäne in blau dargestellt. Die linke Seite des Proteins bildet das *lateral gate* zwischen den TMD zwei und sieben. **C:** Geöffnete Struktur des *lateral gate* nach Insertion einer Signalsequenz (*signal peptide*, azur). Die TMD werden auseinander gespreizt und die Signalsequenz zwischen diesen eingelagert. **D:** Die sechs hydrophoben Aminosäuren, welche den *pore ring* im Sec61 α bilden, sind grün eingezeichnet. Im hier gezeigten geschlossenen Zustand wird durch diesen Ring und die *plug* Domäne die Membranbarriere für Ionen aufrechterhalten. **E:** Freilegung des polaren Clusters nach Öffnung des Kanals zur Anlagerung von hydrophoben Proteinabschnitten. Abbildung C-E aus [Voorhees et al. 2016]. Abgedruckt mit der Erlaubnis von AAAS und abgeändert mit der freundlichen Erlaubnis von R.M. Voorhees.

Einen ähnlichen Effekt, die Aufrechterhaltung der partiellen Membranimpermeabilität, übt ebenfalls die sogenannte *plug* Domäne aus, sofern kein Transportprozess stattfindet (Voorhees & Hegde 2016a). Die von Loop eins bzw. TMD 2a gebildete Struktur (Hefe AS 52-74; Human AS 66-82) sind auf luminaler Seite unterhalb des *pore ring* im Trichter der Sanduhr positioniert und verhindern so eine Diffusion von Molekülen im geschlossenen Zustand. Diese

Positionierung ist jedoch flexibel, da die *plug* Domäne während des Transportes aus der Pore hinausbewegt werden muss (Junne et al. 2006; Lang et al. 2019; MacKinnon et al. 2014; Tam et al. 2005; Van den Berg et al. 2004). Für beide Strukturen wurden in Hefe und *E. coli* verschiedene Mutationen eingebracht, um den Effekt der Strukturen von Sec61 α und dessen dadurch beeinflusste Transportfähigkeit zu ermitteln. Die Mutation einer oder mehrerer der sechs *pore ring* Aminosäuren in Hefen zeigte, dass vor allem ein Austausch zu geladenen Aminosäuren zu starken negativen Transporteffekten führen und die Membranintegration von Transportsubstraten durch den Austausch mit anderen Aminosäuren beeinflusst ist, in allen Fällen die Mutanten jedoch weiterhin vital sind, in Kombination mit Mutationen der *plug* Domäne in *E. coli* jedoch zu einer Instabilität und damit zur Letalität führen können (Junne et al. 2010; Junne et al. 2007; Smith et al. 2005). Dies zeigt, dass die Funktionalität dieser Strukturen eine entscheidende Rolle für den gesamten Organismus bilden. Um den Transport von Proteinen nicht nur über die Membran des ERs zu ermöglichen, sondern auch Proteine in diese Membran zu integrieren, sprich Proteine mit einer TMD, wird eine seitliche Öffnung des Kanals durch das *lateral gate* ermöglicht (Van den Berg et al. 2004). Bei dieser Öffnung, die unter anderem durch die Interaktion mit dem Ribosom und Sec61 γ ermöglicht wird, wird die N-terminale Hälfte um 22° gedreht und so ein *gate* zwischen den TMD zwei und sieben des Sec61 α gebildet (Pfeffer et al. 2015; Voorhees & Hegde 2016a). Durch dieses können Proteine seitlich aus dem Kanal austreten und direkt in die Membran integriert werden (Egea & Stroud 2010; Pfeffer et al. 2015; Wu et al. 2019). Im inaktiven, also im geschlossenen Zustand, wird das *lateral gate* durch drei polare Aminosäurereste stabilisiert, um eine Öffnung nur unter erwünschten Bedingungen zu garantieren (Voorhees & Hegde 2016a).

Die β -Untereinheit, ein 11 kDa großes *tail anchor* (TA) Protein, ist mit Sec61 α verbunden und es konnte gezeigt werden, dass diese den cotranslationalen Transport zwar unterstützt jedoch nicht essentiell ist (Kalies et al. 1998; Van den Berg et al. 2004). Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass eine Verbindung zwischen Sec61 β und dem Signalpeptidase-Komplex (SPC) besteht, wodurch ein Kontakt zwischen dem Sec61-Komplex und SPC vermittelt wird (Kalies et al. 1998). Neuere Studien legen nahe, dass Sec61 β eine Bindung entweder zu SR α oder Sec62 eingehen kann, welche in einem kompetitiven Verhältnis zueinander stehen, wodurch ein Wechsel zwischen Translokationsmechanismen unterstützt wird (Jadhav et al. 2015).

Der dritte und kleinste Bestandteil des Sec61 Komplexes hat essenzielle Funktionen, die vor allem in der Hefe nachgewiesen wurden. Bildlich gesprochen liegt die γ -Untereinheit des Komplexes als Klammer gegenüber dem *lateral gate* der α -Untereinheit, wodurch ein Einfluss auf die Flexibilität der α -Untereinheit und damit auf den Proteintransport ausgeübt wird (Van den Berg et al. 2004; Wilkinson et al. 2010). Der Verlust oder die Mutationen von Teilen dieses

Proteins führten dazu, dass die Barrierefunktion des Komplexes während der nichttranslozierenden Phasen verringert ist, bzw. die Stabilität des gesamten Komplexes abnimmt (Falcone et al. 2011; Witham et al. 2020).

Des Weiteren zum Komplex des Translokons zugehörig sind solche Proteine, die entweder weiterführende Funktionen zum Transport einnehmen, oder die Öffnung des Kanals, bzw. den Transport selbst unterstützen. Hierzu gehört zum einen das Ribosom, welches mit den zytosolischen Loops sechs und acht des Sec61 α sowie dem N-Terminus des Sec61 γ interagiert und so Polypeptidketten an das Translokon heranführt (Cheng et al. 2005; Voorhees et al. 2014). Während der Translokation von Polypeptidketten mit einer N-terminalen Signalsequenz erfolgt eine Abspaltung dieser Sequenzen, ermöglicht durch den Signalpeptidase-Komplex, was einen Teil des Reifungsprozesses der Polypeptide darstellt. Zur weiteren Reifung des Proteins ist ebenfalls der Oligosacharyltransferase (OST) Komplex als Teil des Translokons aktiv (Abb. 2) (Pfeffer et al. 2014). Dieser ermöglicht eine N-Glykosylierung von Substraten am N-X-S/T Aminosäuremotiv, wodurch sowohl deren Funktionalität als auch Stabilität beeinflusst wird (Larkin & Imperiali 2011; Ruiz-Canada et al. 2009). Zu den Komponenten, die neben dem Ribosom die Öffnung des Kanals triggern, zählt auch der *translocon associated protein* (TRAP) Komplex, der ebenfalls die zuvor beschriebene Glykosylierung beeinflusst (Dittner-Moormann et al. 2021; Ng et al. 2019; Nguyen et al. 2018; Phoomak et al. 2021). Dieser besteht aus vier Untereinheiten, von denen die TRAP α - und TRAP β -Untereinheit im Lumen mit Sec61 α interagiert, während auf zytosolischer Seite TRAP γ Verbindungen zum Ribosom ermöglicht (Hartmann et al. 1993; Pfeffer et al. 2017). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass von diesem Komplex spezielle Signalsequenzen mit überdurchschnittlichen Glycin-/ Prolingehalt abhängig sind, um das Substrat effizient zu transportieren (Kriegler et al. 2020; Nguyen et al. 2018). Sec62 und Sec63 sind membranständige Proteine, die mit Sec61-Proteinen im Komplex vorkommen (Conti et al. 2015; Jung et al. 2014). Deren Funktion wird im weiteren Verlauf näher beschrieben (Kapitel 4.3.2, 4.3.3). Die abundanteste der nicht-membranständigen Komponenten des Translokons ist das Protein BiP, welches als Chaperon im ER-Lumen agiert (Hein et al. 2015; Pobre et al. 2019). Dessen physische Interaktion beschränkt sich auf den Loop 7 von Sec61 α , jedoch ist die funktionelle Verbindung der beiden Proteine deutlich vielseitiger (Schäuble et al. 2012). Neben der Förderung zur Öffnung des Kanals, kann es mit naszierenden Polypeptidketten interagieren, deren Faltung unterstützen, und den Ausstrom von Calcium aus dem ER durch Sec61 α regulieren, indem es dessen Öffnung und Schließung moduliert (Haas 1994; Melnyk et al. 2015). Näher werden diese Funktionen in Abschnitt 4.3.6 beschrieben.

4.3. Transport von naszierenden Proteinen

Beim Blick auf das humane Genom zeigt sich, dass ca. ein Drittel des Genoms für sekretorische oder membranständige Proteine codiert ist und diese dementsprechend in und über Membranen hinweg transportiert werden (Aviram et al. 2016; Rapoport 2007; Uhlen et al. 2015). Der Transportprozess in das ER kann grob in drei Grundschrte unterteilt werden: (1) das Anlagern der neu synthetisierten oder naszierenden Polypeptide an die ER-Membran, (2) die Einführung des Polypeptides in den transportierenden Kanal, z.B. Sec61 (3) das Entlassen des Polypeptides aus dem Kanal in das ER Lumen oder durch das *lateral gate* in die Membran hinein (Linxweiler et al. 2017). Die Vielfalt der Substrate, die in das ER transportiert werden sollen, sowie deren unterschiedliche Transportwege, wird in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

4.3.1. Signalsequenzen und Transmembrandomänen als Richtungsweiser zum ER

Eine Gemeinsamkeit der eben genannten 36 % des Proteoms, welches über die ER-Membran oder in ebenjene hineintransportiert wird, ist, dass alle diese Proteine in einer Form eine Erkennungssequenz besitzen, die die Hinführung zu diesem Ziel ermöglicht. Hierbei werden zwei Merkmale als Erkennungssequenz für das ER vorrangig genutzt, abspaltbare Signalsequenzen oder TMDs. Etwa 15 % der codierten Proteine beinhalten eine Signalsequenz, während 28 % des Genoms für Proteine mit einer oder mehreren TMDs codiert ist (Daten zugänglich auf v20.1.proteinatlas.org (Thul et al. 2017; Uhlen et al. 2015)).

Die Signalsequenz ist am N-Terminus eines Proteins positioniert und hat eine Länge von ca. 15-50 Aminosäuren und kann in drei Abschnitte unterteilt werden (Martoglio & Dobberstein 1998; von Heijne 1986). Hierbei handelt es sich zu Beginn um eine positiv-geladene N-terminale Sequenz, die 1-5 Aminosäuren einnimmt. Darauf folgt die H-Region, die den längsten Teil der Sequenz ausmacht. Hier sind vor allem hydrophobe Aminosäuren eingelagert, die der Signalsequenz einen Charakter verleihen, der mit einer TMD vergleichbar ist. Den C-terminalen Abschluss der Sequenz bildet ein polarer Abschnitt (Chen et al. 2019; Gierasch 1989; von Heijne 1990). Charakteristisch für diesen C-Terminus in *E. coli* sind die drittletzte (aliphatische Aminosäure) und die letzte Aminosäure (klein, ungeladen), die als Erkennungssequenz für den Signalpeptidase-Komplex dient, welche die Signalsequenz während des Reifungsprozesses von der Polypeptidkette abspaltet (Ekici et al. 2007; Karla et al. 2005; Liaci et al. 2021). Signalsequenzen sind ebenfalls für andere Organellen bekannt, sind aber in diesen Fällen jedoch anders strukturiert, bzw. sogar anders lokalisiert (Kunze & Berger 2015). Wird ein Vergleich aller zum ER führenden Signalsequenzen vorgenommen, ist neben der konstanten dreigeteilten Aufteilung der Sequenz kaum eine Gemeinsamkeit auszumachen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass ein Großteil der Sequenz variiert werden

kann, dadurch jedoch nur die Transporteffizienz verringert wird (Kaiser et al. 1987). Andererseits zeigen Studien ebenfalls, dass einzelne Punktmutationen, z.B. in der Signalsequenz von Renin, zu einem Verlust der Nierenfunktion führen können (Beck et al. 2011; Jarjanazi et al. 2008; Živná et al. 2009). Die Signalsequenz selbst wird, wie im Folgekapitel beschrieben, von SRP erkannt und ermöglicht so den cotranslationalen Transport (Walter & Johnson 1994). Dementsprechend kann die Signalsequenz als eine Art Kompass verstanden werden, der auf das ER gerichtet ist.

TMD erfüllen eine ähnliche Funktion wie Signalsequenzen. Je nach betrachtetem Organismus codieren 20-30 % des Genoms Proteine, die eine oder mehrere TMD beinhalten (Krogh et al. 2001). Diese haben, je nach Sekundärstruktur, eine Länge von 10-20 hydrophoben Aminosäuren und durchspannen so in der in die Membran integrierten Form die etwa 30 Å breite Lipidmembran (White & Wimley 1999). Die Anzahl, Position und Orientierung der TMD in der Membran ordnet diese in verschiedene Klassen ein, da basierend auf diesen Faktoren die Topologie und Struktur des Membranproteins bestimmt wird (s. Abb. 3).

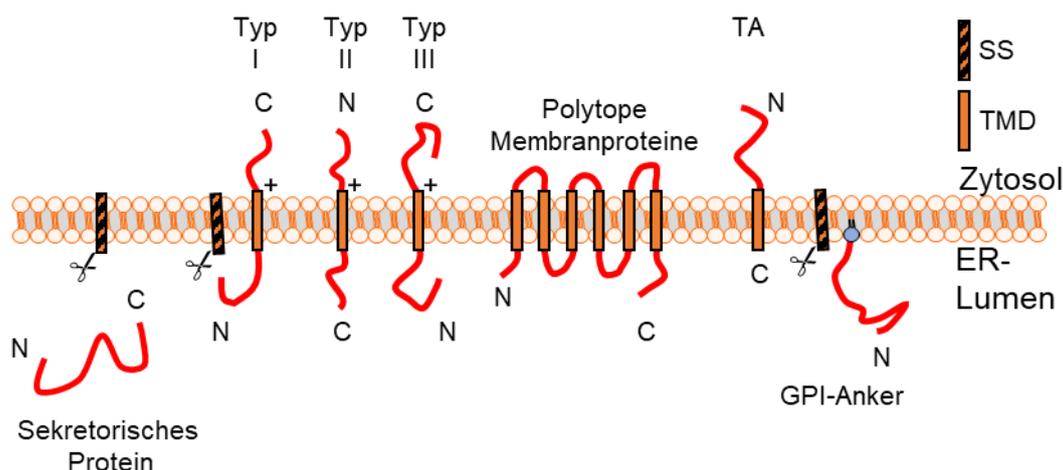


Abb. 3: Schematische Darstellung der Topologie von Proteinklassen in der ER Membran. Die Proteine werden eingeteilt in sekretorische und membranständige Proteine. Membranständige Proteine werden weiterhin unterteilt aufgrund der Anzahl der TMD und der Orientierung der Proteine in der Membran. Typ I-Typ III Proteine beinhalten eine TMD, wobei die flankierende Ladung entscheidend ist für die Termini („*positive inside rule*“). Die Struktur polytope Membranproteine, Proteine mit mehr als einer TMD, wird durch die Orientierung der ersten TMD bestimmt. TA Proteine werden durch eine C-terminale TMD in der ER-Membran positioniert. Ein Einbau von GPI-Ankerproteinen in die ER Membran erfolgt durch einen Transamidase-Komplex. SS = Signalsequenz; TMD = Transmembrandomäne; C = C-Terminus; N = N-Terminus; + = positive Ladung; Schere = Abspaltung von Signalsequenzen. Abbildung generiert mit Hilfe von Motifolio Inc..

Die Orientierung der TMD selbst wird durch die Ladung der Aminosäuren bestimmt, die an den jeweiligen Termini der TMD lokalisiert sind. Als Faustregel gilt die „*positive-inside-rule*“, die besagt, dass positiv geladene Aminosäuren das Ende der Membrandomäne flankieren, welches dem Zytosol zugewandt ist. Die komplementäre Regel „*negative-outside-rule*“ konnte hingegen seltener bestätigt werden (von Heijne 1992; von Heijne & Gavel 1988; Wallin &

Heijne 1998). Wie auch Signalsequenzen werden TMD im Zytosol von spezialisierten Proteinen erkannt, die eine Aggregation verhindern und die Polypeptide in einem transportkompetenten Zustand erhalten, bzw. zur Membran führen (Guna & Hegde 2018; Shan 2019). Es zeigte sich, dass die Helixstrukturen der TMD bereits am Ribosom ausgebildet werden, was die Anlagerung an das Sec61 und die Insertion in die Membran ermöglicht (Woolhead et al. 2004). Da Membranproteine nicht nur im ER sondern auch in allen anderen Membranen zugegen sind, ist z.B. im Fall von TA-Proteinen die TMD selbst auch das Sortierungssignal. Hier wird durch die Länge und die Ladung am C- und N-Terminus der TMD bestimmt, ob das Protein dem Mitochondrium oder dem ER zuzuordnen ist (Borgese et al. 2003; Shirane & Nakayama 2003). Sowohl TMD als auch Signalsequenzen können in schwache oder starke Klassen eingeteilt werden. Die physikalische Grundlage dieser Klassifizierung wird in der Hydrophobizität der jeweiligen Sequenz vermutet, wobei hydrophobe Sequenzen eher zur starken, wenig hydrophobe Sequenzen eher zur schwachen Klasse zugeordnet werden (Hegde & Kang 2008; Lang et al. 2017; Sun et al. 2020). Aus einer geringeren Hydrophobizität der Zielsequenz resultiert einer verminderte bzw. verlangsamte Öffnungswahrscheinlichkeit des Sec61-Kanals, was dadurch deutlich wird, dass Proteine mit einer schwachen Zielsequenz für diesen Prozess die Unterstützung einer akzessorischen Komponente benötigen (Haßdenteufel et al. 2018; Lang et al. 2012; Nguyen et al. 2018; Sommer et al. 2013; Ziska et al. 2019). Das Vorhandensein einer der beiden Zielsequenzen schließt jedoch nicht die Anwesenheit der anderen Form aus, wodurch es auch zu Überschneidungen in den Transportmechanismen kommen kann (Goder & Spiess 2001). Diese werden in den beiden Folgeabschnitten beschrieben.

4.3.2. Cotranslationaler Transport: Zusammenarbeit des Ribosoms mit Sec61

Ein seit mehreren Jahren untersuchter Transportweg von Polypeptidketten zum Translokon hin ist der SRP-Transportweg. Dieser Weg ist evolutionär stark konserviert (Zimmermann et al. 2011). Der Name leitet sich ab aus der zentralen zytosolischen Komponente des Transportweges, dem *signal recognition particle* (SRP) ab. Die Funktion dieses Proteins ist durch den Namen weitestgehend erklärt. Es erkennt durch die SRP54-Untereinheit (eine von sieben Protein-Untereinheiten) die N-terminale Signalsequenz naszierender Polypeptide bereits am Ribosom, wodurch die Bindung zwischen SRP und Ribosom stabilisiert wird (Krieg et al. 1986; Neuhof et al. 1998; Walter & Johnson 1994). Durch die Anlagerung des SRP an die Signalsequenz, entsteht eine Konformationsänderung des SRP und die N-terminale Alu-Domäne des Proteins blockiert die Bindestelle für Elongationsfaktoren am Ribosom. Dies hat eine Pausierung der Elongation des naszierenden Proteins zur Folge (Halic et al. 2004; Walter & Blobel 1981b). Dass diese temporäre Unterbrechung der Translation physiologisch wichtig ist zur Erhaltung der Transportkompetenz der Substrate, wurde 2008 gezeigt (Lakkaraju et al. 2008). An der ER-Membran bindet der Komplex an den heterodimeren SRP-Rezeptor,

bestehend aus SR α und SR β , worauf eine Bindung an das Translokon folgt. Dies hat die Hydrolyse von GTP zur Folge, welches an SR α und SRP gebunden war, und so den Komplex auflöst. Das Ribosom verbleibt am Translokon und die naszierende Kette wird in ebenjenes hineingeführt (Fulga et al. 2001; Gilmore et al. 1982b; Jomaa et al. 2017; Kobayashi et al. 2018; Luirink & Sinning 2004). Die Bindung vom Ribosom an das Translokon versetzt dieses in einen sogenannten „*primed*“ Zustand, der zur Initiation des Transportes entscheidend ist (Gogala et al. 2014; Pfeffer et al. 2014; Voorhees et al. 2014).

Neben dieser relativ gut verstandenen Variante des cotranslationalen Transportes, wird ebenfalls eine weitere Form diskutiert. In diesem bindet das Ribosom an den N-Terminus des Sec62, welches als Teil des Translokonkomplexes vorliegt, im speziellen mit dem Sec63 interagiert (Meyer et al. 2000b; Müller et al. 2010). Dieser Vorgang wird in Verbindung gesehen mit dem auf luminaler Seite durch Sec63 gebundenem BiP und einer dauerhaften Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit an das Translokon (Lang et al. 2012; Müller et al. 2010; Potter et al. 2001). Weiterhin ist dieser Transport auch ohne angelagertes Ribosom möglich, wobei hier Substrate mit einer verlängerten und weniger hydrophoben H-Region der Signalsequenz im Mittelpunkt stehen (Schorr et al. 2020). In der Hefe zeigte sich, dass vor allem Typ II Membranproteine mit einer gering hydrophoben Signalsequenz vom Komplex aus Sec62 und Sec63 während des cotranslationalen Transportes abhängig sind, im speziellen die Insertion der zweiten TMD von Sec62 (Jung et al. 2014; Reithinger et al. 2013). Dies konnte im humanen System bis dato nicht bestätigt werden.

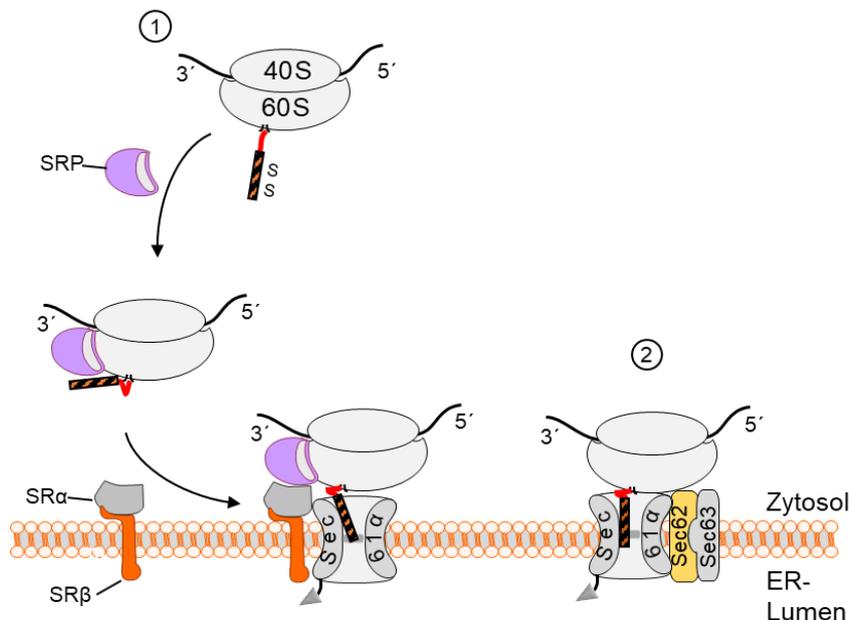


Abb. 4: Möglichkeiten des cotranslationalen Proteintransportes. 1: Proteine mit einer N-terminalen Signalsequenz werden durch den SRP erkannt, zum Rezeptor in der ER Membran geführt und am

Translokation positioniert. 2: Dauerhaft am Translokation angelagerte Ribosomen werden durch den Sec62/63 Komplex an den Komplex angelagert. Abbildung generiert mit Hilfe von Motifolio Inc.

Der Transport in/über die Membran erfolgt dementsprechend zeitgleich zur Translation, was den Namen cotranslational erklärt. Wie der darauffolgende Transport durch das Translokation erfolgt, wird in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

4.3.3. Variable Möglichkeiten des posttranslationalen Transportes

Während Substrate mit einer N-terminalen Signalsequenz in der Regel cotranslational in das ER überführt werden, werden Polypeptide ohne, oder mit einer schwach hydrophoben Signalsequenz vollständig im Zytosol synthetisiert und dann von zytosolischen Rezeptoren erkannt. Daher wird dieser Transportmodus als posttranslational bezeichnet. Für alle posttranslationalen Transportmöglichkeiten gilt, dass zytosolische Faktoren die Aggregation der Polypeptide im Zytosol verhindern und diese dadurch in einem transportkompetenten Zustand erhalten (Ast et al. 2013; Dudek et al. 2015; Zimmermann et al. 1988).

Einer der am besten untersuchten posttranslationalen Transportwege ist in allen Eukaryoten konserviert und wird als GET (*guided entry of TA proteins*) oder TRC40 (*transmembrane domain recognition complex 40 kDa ATPase subunit*) Transportweg bezeichnet (Asseck et al. 2021; Borgese et al. 2019). Dieser Transportweg agiert spezifisch für TA-Membranproteine, deren C-terminales Ende eine TMD beinhaltet. Deren Synthese muss dementsprechend vollständig abgeschlossen sein, bevor sie von zytosolischen Faktoren erkannt werden können (Kutay et al. 1993). Die exponierte, hydrophobe TMD wird von dem Protein SGTA (*Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha*) erkannt, welches im Folgenden mit dem Bag6 Proteinkomplex (bestehend aus Bag6, TRC35 und Ubl4A) interagiert (Benarroch et al. 2019; Mariappan et al. 2010; Mock et al. 2015; Winnefeld et al. 2006). Dieser Komplex interagiert mit dem zytosolischen TRC40 Chaperon, auf den das zu transportierende Substrat übertragen wird (Mariappan et al. 2010). Als heterodimerer Rezeptor in der ER-Membran fungieren in diesem Fall die Proteine CAML (*calcium modulating ligand*) und WRB (*tryptophan-rich basic protein*) (Vilardi et al. 2011; Vilardi et al. 2014). Beide Proteine stehen in einer hohen Abhängigkeit zueinander was Stabilität und Funktionalität betrifft (Inglis et al. 2019). Speziell für TA-Proteine agiert dieser Membrankomplex nicht nur als TRC40 Rezeptor, sondern auch als Insertase in die ER-Membran, ein Prozess der dementsprechend unabhängig von Sec61 verläuft, jedoch noch nicht vollständig verstanden ist (Colombo et al. 2016; Lang et al. 2012; McDowell et al. 2020; Wang et al. 2014; Yamamoto & Sakisaka 2012). Neuere Studien ergaben, dass der TRC40-Transportweg hauptsächlich von TA-Proteinen mit einer stark hydrophoben TMD in Anspruch genommen wird, während TA-Proteine mit moderater Hydrophobizität teils unabhängig von TRC40 vom *ER membrane protein complex* (EMC) in die Membran inseriert werden (Bai et al. 2020; Guna et al. 2018). Des Weiteren wurde gezeigt,

dass bestimmte TA-Proteine ebenfalls durch SRP erkannt, mit dessen Hilfe diese Proteine unabhängig vom Ribosom an die ER Membran geführt und mittels Sec61 inseriert werden können (Abell et al. 2004).

Bestimmte sekretorische Proteine besitzen durch die N-terminale Signalsequenz grundsätzlich die Möglichkeit cotranslational zum ER geführt zu werden, können diese Route aber aufgrund der Länge des zu transportierenden Proteins nicht nutzen. Der Transport dieser sogenannten kurzen sekretorischen Proteine (beispielsweise Apelin und Statherin) werden dementsprechend durch das dem Translokon zugehörige Sec62 unterstützt (Casson et al. 2017; Haßdenteufel et al. 2019; Lakkaraju et al. 2012b; Lang et al. 2012). Es konnte festgestellt werden, dass sekretorische Proteine mit weniger als 100 Aminosäuren schlicht zu kurz sind, um am Ribosom vom SRP erkannt zu werden. An dieser Stelle vermittelt Sec62 den Transport zum Translokon. Potenziell ermöglicht wird dies durch die Ribosombindestelle des Sec62 an dessen zytosolischen Terminus (Jadhav et al. 2015; Müller et al. 2010). Ähnlich wie beim cotranslationalen Transport ist auch hier die Verbindung zu Sec63 und damit zu BiP ein entscheidender Faktor, um den Sec61 Kanal für kleine sekretorische Proteine zu öffnen (Haßdenteufel et al. 2018; Haßdenteufel et al. 2019; Lakkaraju et al. 2012b).

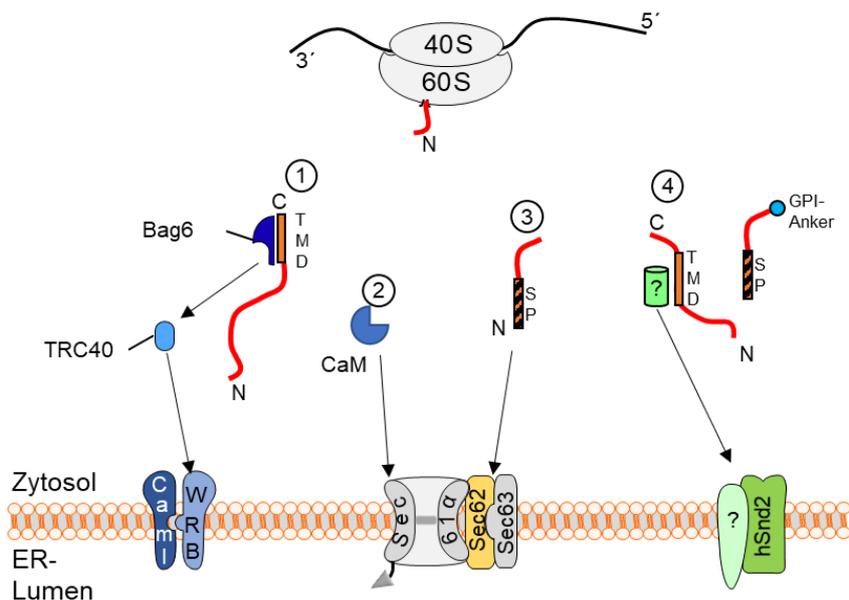


Abb. 5: Möglichkeiten des posttranslationalen Transportes. 1: TRC40-abhängiger Transport von TA-Proteinen mit C-terminaler TMD. 2: Transport vermittelt durch Chaperone. 3: Transport kurzer sekretorischer Proteine mit Signalsequenz, die nicht vom SRP erkannt werden. Die Proteine werden durch den Sec62/63 Komplex erkannt. 4: vermutliche Struktur des humanen SND-Transportweges. Identifiziert ist bisher nur das membranständige hSnd2 (Kapitel 4.3.4). Abbildung generiert mit Hilfe von Motifolio Inc.

Als weitere Form des posttranslationalen Transportes ist die Möglichkeit zu nennen, dass das zytosolische Chaperon Calmodulin direkt mit hydrophoben Domänen kurzer sekretorischer Proteine Verbindungen eingeht und diese so in einem transportkompetenten Zustand erhält.

Eine Orientierung zur ER-Membran hin erfolgt durch die Bindung von Calmodulin an die Calmodulinbindestelle (IQ-Motiv) am N-Terminus von Sec61 α (Erdmann et al. 2011; Shao & Hegde 2011c).

Die Insertion von Proteinen mit TMD in die Membran wird wie beschrieben von verschiedenen Insertasen/Translokasen unterstützt. Ein Einbau von Transmembranproteinen in membranartige Strukturen ohne eine Insertase konnte bisher nur in zellfreien Assays nachgewiesen werden (Cymer et al. 2015; Kalmbach et al. 2007). Die auch hier im Fokus stehende Insertase ist das Translokon. Die Öffnung des Kanals und die damit verbundene Insertion wird im Folgekapitel detailliert beschrieben.

4.3.4. Der SND abhängige Transportweg

Neben all der Spezialisierung der einzelnen Transportwege naszierender Polypeptidketten zum ER hin, gibt es auch verschiedene Überlagerungen dieser Wege, sozusagen Alternativrouten für die Substrate (Aviram & Schuldiner 2017). Als eben solche wurde 2016 erstmalig der SND-Transportweg (*SRP-independent*) in der Hefe beschrieben, dem zum jetzigen Zeitpunkt drei Proteine zugeordnet werden (Aviram et al. 2016). Initial entdeckt als eine mögliche Alternative zum cotranslationalen SRP- und dem posttranslationalen GET-Transportweg, ist nach wie vor nicht sicher charakterisiert, welchem dieser beiden Modi dieser Transportweg folgt (Aviram & Schuldiner 2017). Die drei Komponenten des Transportweges teilen sich in eine zytosolische und zwei membrangebundene Proteine auf. Snd1, ein zytosolisches, genauer ein an das Ribosom angelagertes Protein, ist funktionell oder strukturell nicht weiter untersucht (Fleischer et al. 2006; Huh et al. 2003). Snd2 und Snd3 hingegen sind als ER-Membranständige Proteine beschrieben mit vier bzw. einer TMD. Einen Bezug zum Proteintransport zeigte Snd2 (ENV10) bereits in einer Studie aus dem Jahr 2011, als es als eines der Proteine beschrieben wurde, welches die Reifung der Carboxypeptidase Y (CPY) beeinflusst, einer Protease in der Hefevakuole. Bei einer Deletion des Proteins wurden CPY Vorläufer akkumuliert, was auf einen Defekt im Proteintransport oder der Proteinreifung hinweist (Jung et al. 1999; Ricarte et al. 2011). Snd3 erfüllt mehrere Funktionen. Neben der hier im Fokus stehenden Beteiligung am Proteintransport in das ER (Aviram et al. 2016), wurde ebenfalls eine Funktion für den Phosphattransport (Yompakdee et al. 1996) und der Formierung von Verbindungen zwischen der nukleären Membran und der Vakuole beschrieben (Tosal-Castano et al. 2021). Speziell im zweiten Aspekt wurde untersucht, ob Snd1 und/oder Snd2 ebenfalls an diesem Effekt beteiligt sind, was nicht der Fall war. Snd3 scheint hier unabhängig von den anderen Proteinen eine nicht dem Proteintransport zuzuordnende Funktion zu erfüllen (Tosal-Castano et al. 2021). Zeitgleich besteht jedoch auch ein gewisses Maß an gegenseitiger Abhängigkeit, denn bei der Deletion eines der drei Proteine, kann es sowohl zur Misslokalisierung als auch zur Instabilität der zwei Partnerproteine

kommen (Aviram et al. 2016). In der genannten Publikation wird deutlich, warum die Identifizierung des Transportweges erst vor wenigen Jahren erfolgte und woher der Name stammt. Es konnte gezeigt werden, dass funktionelle Überlagerungen und Kompensationsmechanismen die Aktivität dieses Transportweges bisher verschleierten. Während die Überexpression von Snd2 oder Snd3 eine Letalität von Sec65 knock-out (KO) (als Teil des SRP-Transportweges in Hefen) verhindern konnte, wurden additiv negative Effekte bei gleichzeitiger Depletion von SND und GET Komponenten beschrieben. Die Daten aus der Hefe suggerieren, dass die Transportwege ein Netzwerk bilden, dessen Komplexität bisher noch nicht vollständig verstanden wurde. Das Substratspektrum des Transportweges selbst scheint sehr breit gestreut zu sein. Erste Studien in der Hefe und im humanen System führten zu der Hypothese, dass vornehmlich Proteine mit einer mittig liegenden Transmembrandomäne vom SND-Proteintargetingweg abhängig sind (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017; Pool 2016). Im Verlauf weiterer Studien konnte ebenso gezeigt werden, dass sowohl polytope Membranproteine, als auch GPI-Ankerproteine mit schwach hydrophober GPI-Sequenz durch einen Verlust des hSnd2 Proteins negativ beeinflusst waren (Talbot et al. 2019; Yang et al. 2021). Eine Erläuterung, welche spezifische Eigenschaft die Abhängigkeit vom SND-Proteintargetingweg generiert, konnte bisher noch nicht geleistet werden.

Im humanen System konnte bisher nur eine der möglichen drei Komponenten identifiziert werden (Abb. 5). Das Protein TMEM208, ab hier als hSnd2 bezeichnet, zeigt neben der Sequenzüberschneidung auch funktionell deutliche Parallelen zu dem Hefe-Ortholog Snd2. Neben Integration in die Membran des ERs, der Co-Lokalisation zu Proteinen, wie Sec61 (in Hefe und HeLa-Zellen), dessen akzessorischen Komponenten und EMC, die im Transport von Proteinen entscheidend sind, zeigen auch Effekte nach Knockdown des hSnd2 in HeLa-Zellen deutlich die Funktion im Transportnetzwerk im humanen System (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017; Talbot et al. 2019; Zhao et al. 2013). Die Kompensation zum SRP-Transportweg in humanen Zellen wurde nicht durch ein vermindertes Absterben der Zellen deutlich, so wie es in der Hefe der Fall ist, sondern durch die Steigerung der Proteinabundanz der Komponenten des jeweils anderen Transportweges nach der Depletion von hSnd2 oder SR α (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017). Die funktionelle Überlagerung wurde des Weiteren durch die Generierung additiv negativer Effekte nach Doppelknockdown (hSnd2+WRB) deutlich, die vor allem auf den Transport von TA-Proteine Einfluss nahmen (Casson et al. 2017; Haßdenteufel et al. 2017). In weiteren Studien wurde die Komplexität des Themenfeldes noch erweitert, indem gezeigt werden konnte, dass auch polytope Membranproteine in einer Abhängigkeit von hSnd2 stehen, ähnlich der Abhängigkeit dieser Membranproteine vom EMC-Komplex. Ein wechselseitiger Einfluss des hSnd2 auf EMC oder umgekehrt konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden, auch wenn EMC-Proteine

gemeinsam mit hSnd2 aufgereinigt werden konnten (Aviram et al. 2016; Talbot et al. 2019). Bisher erhobene Interaktionsdaten aus der Hefe und humanen Zellen suggerieren, dass das Sec61-Translokon als Insertase für den Transportweg agieren könnte, da Interaktionen mit diesem Protein und akzessorischen Komponenten nachgewiesen werden konnten (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017; Yang et al. 2021).

Ebenfalls ähnlich dem Hefeortholog hat auch hSnd2 Funktionen, die nicht direkt dem Proteintransport zugeordnet werden können. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Hypoxie die Expression des Proteins gesteigert wird und auch, dass eine gesteigerte Expression zu einer verminderten Autophagie, also einer verminderten Stressreaktion der Zelle führt (Lei et al. 2020; Zhao et al. 2013). Da jedoch die Stressreaktion auch über die Regulation des Proteintransportes erfolgen kann, sind diese Themen nicht unabhängig von einem Proteintransportweg zu sehen (Corazzari et al. 2017).

Von besonderem Interesse ist demnach die Fragestellung, wie der SND-Transportweg in humanen Zellen aufgebaut ist. Dies soll zu Teilen durch diese Arbeit beantwortet werden.

4.3.5. Proteininsertion verschiedener Substrate in das ER

Um den Transport der Proteine durch das Translokon zu ermöglichen, bedarf der Kanal einer gewissen Dynamik, um zwischen dem geschlossenen und geöffneten Zustand wechseln zu können. Diese Dynamik ist in hohem Maße von transient akzessorischen Komponenten bzw. den Transportsubstraten selbst abhängig (Pfeffer et al. 2015; Voorhees & Hegde 2016a). Diese akzessorischen Komponenten wie Ribosom, TRAP, BiP oder Sec63, binden an unterschiedliche Positionen des Sec61 α , was eine Konformationsänderung des Kanals zur Folge hat (Gumbart et al. 2009; Lang et al. 2019; Linxweiler et al. 2017; Voorhees et al. 2014). Der Komplex gelangt so in einen sogenannten „*primed*“ Zustand, im Folgenden am Beispiel des Ribosoms gezeigt (Voorhees & Hegde 2016a). Der N-terminale Anteil der Sec61 γ -Untereinheit, sowie weitere basische Aminosäuren in Loop sechs und acht des Sec61 α interagieren mit dem Ribosom und positionieren so das naszierende Protein direkt über dem zytosolischen Teil des Sec61 α (Ménétret et al. 2007; Voorhees et al. 2014). Die Konformationsänderung setzen sich über benachbarte Helices fort mit der Folge, dass zum einen das aus drei Aminosäuren bestehende polare Cluster destabilisiert wird, infolgedessen das *lateral gate* geöffnet werden kann, und zum anderen ein hydrophober Bereich im Zytosol zugewandten Teil des Sec61 α offen gelegt wird (Kater et al. 2019; Trueman et al. 2012; Voorhees et al. 2014; Voorhees & Hegde 2016b). Durch die hydrophoben Eigenschaften dieses Abschnittes wird eine Bindung mit anderen hydrophoben Domänen ermöglicht, wie zum Beispiel der H-Domäne von Signalsequenzen oder TMD der entsprechenden Transportsubstrate (Voorhees & Hegde 2016a). Diese werden an der Stelle der zweiten Helix des Sec61 α positioniert, die diese eigentlich im geschlossenen Zustand einnehmen würde,

also in das *lateral gate*. Durch diesen Schritt wird die abschließende Verschiebung zwischen der C- und N-terminalen Hälfte von Sec61 α ermöglicht, resultierend in der Ausdehnung des *pore rings* und die Verschiebung der *plug* Domäne, was die vollständige Öffnung des *lateral gates* und somit auch des Kanals zur Folge hat (Kater et al. 2019; Voorhees et al. 2014; Voorhees & Hegde 2016b). Der hydrophobe Ring im engsten Bereich der „Sanduhr“ legt sich während des daraus resultierenden Transports um das zu translozierende Protein und erhält so die Membranbarriere aufrecht (Gumbart & Schulten 2006). Ebenfalls wird vermutet, dass die geringe strukturelle Änderungen des *pore rings* zu einer weiteren Destabilisierung der *plug* Domäne führt, was zusammen mit den oben beschriebenen Änderungen der Kanalstruktur zur vollständigen Delokalisation des *plug* führt (Voorhees et al. 2014; Voorhees & Hegde 2016b). Damit können die translozierten Proteine entweder durch das *lateral gate* in die Membran entlassen werden, oder in das Lumen des ERs gelangen (Dudek et al. 2015; Voorhees & Hegde 2016a). Der hier beschriebene Prozess der Öffnung des Translokons ist nur eine der verschiedenen Möglichkeiten, wie dieser Kanal in der Membran geöffnet wird. Neben dem Ribosom gibt es weitere akzessorische Komponenten, die ebenfalls die Öffnung des Kanals begünstigen, und spezifisch für das jeweils zu transportierende Substrat agieren. Hier sind Proteine wie Sec62/63, TRAP oder auch TRAM zu nennen, sowie auf luminaler Seite BiP (Gemmer & Förster 2020; Lang et al. 2019; Zimmermann et al. 2011). Ebenso kann das Translokon wieder durch die Anlagerung anderer, oder auch identischer Komponenten verschlossen werden. Daraus resultierend ist eine funktionelle Membranbarriere. Dies erfolgt zum Beispiel durch die calciumabhängige Interaktion mit Sec62 und Calmodulin, wie auch wiederum durch BiP (Lang et al. 2012; Linxweiler et al. 2013; Schäuble et al. 2012). Insgesamt betrachtet ergibt sich also eine Öffnungskinetik, die einer enzymatischen Reaktion gleicht. Das Zusammenspiel mit den akzessorischen Komponenten führt zur Verringerung der Aktivierungsenergie, die für die Konformationsänderung benötigt wird und die Öffnung des Kanals begünstigt.

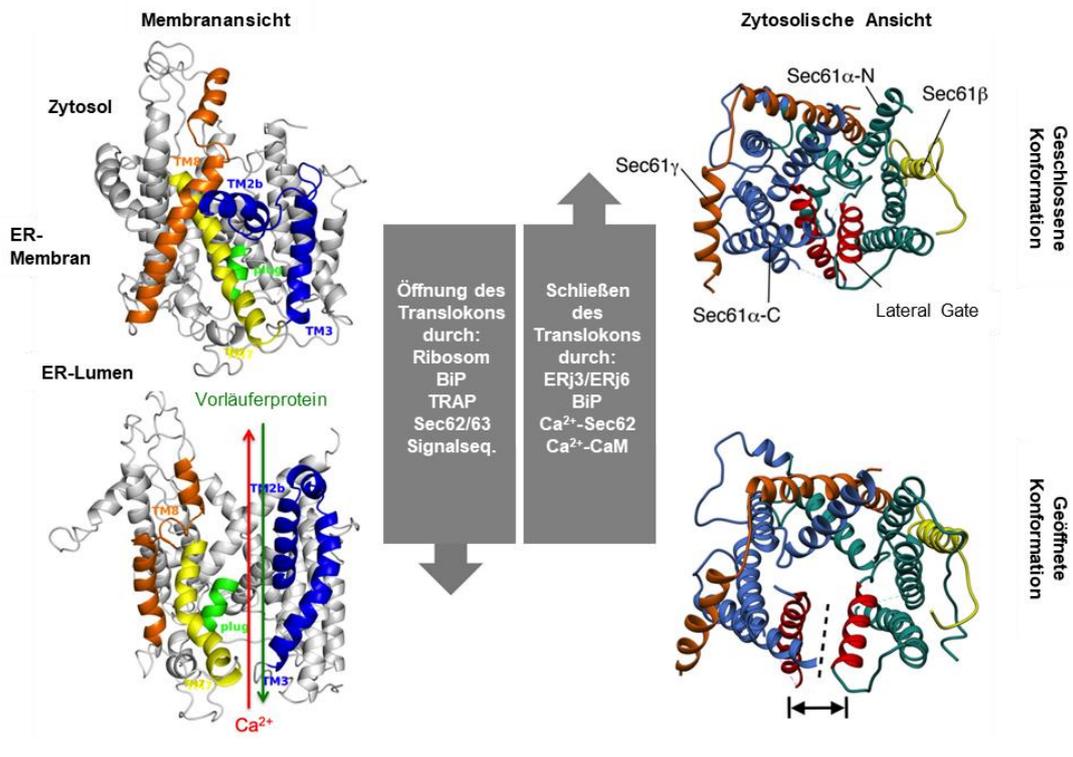


Abb. 6: Strukturelle Darstellung des Sec61 α -Komplex im geöffneten und geschlossenen Zustand. Dargestellt sind auf der linken Seite alle TMD des Sec61 α mit den besonders hervorgehobenen Helices 2, 3, 7 und 8, welche das *lateral gate* umgeben. Rechts ist die N terminale Hälfte des Proteins (TMD1-5) in blau eingefärbt, die C terminale Hälfte (TMD 6-10) in grün dargestellt. Die Helices 2b und 7 sind in rot dargestellt. Sec61 β und Sec61 γ wurden in gelb, bzw. braun eingefärbt. Die Öffnung des Kanals und damit des *lateral gates* wird durch verschiedene Komponenten unterstützt, ebenso wird das Schließen durch die Anlagerung vermittelt. Durch den geöffneten Kanal erfolgt der Proteintransport in das ER und der Calciumstrom aus dem ER. Die Abbildung wurde auf Basis folgender Quellen modifiziert (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2017; Sicking et al. 2021).

Die Orientierung der naszierenden Polypeptidketten in der Membran bzw. bereits im Translokation selbst, hängt von den Charakteristika der Signalsequenz/TMD ab. Der *positive inside rule* folgend, und übereinstimmend zu dem durch die Konformationsänderung freigelegten hydrophoben *patch*, werden Signalsequenzen mit einer positiv geladenen N-Domäne in einer sogenannten *hairpin* Struktur in das Translokation eingelagert. Die Translation wird fortgeführt und der neu synthetisierte Teil des Polypeptides wird an der Signalsequenz vorbei durch das Translokation geführt (Rapoport 2007; Shaw et al. 1988). Hierbei ist die Translation durch das Ribosom nicht der energetisch essenzielle Faktor, der den Transport über die Membran ermöglicht (Conti et al. 2015). Für das Prionprotein (PRP) wurde beschrieben, dass sowohl die zytosolische Interaktion der Signalsequenz mit dem Sec61 α , als auch die darauffolgende luminalen Interaktion mit dem TRAP-Komplex als „*pulling force*“ agieren und so eine Weiterführung des Prionproteins ermöglichen (Kriegler et al. 2020). Unterstützt wird dieser Vorgang zusätzlich auf luminaler Seite durch BiP, welches an naszierende Polypeptidketten bindet und so das Zurückdiffundieren durch den Kanal (molekulare Ratsche) verhindert (Matlack et al. 1999). Falls positiv geladene Aminosäurereste auf die Signalsequenz folgen, wird diese „*head first*“ in das Translokation inseriert. Der

darauffolgende Schritt ist im Wesentlichen von den Eigenschaften der darauffolgenden Aminosäuren abhängig. Sollten diese positiv geladen sein, erfolgt ein sogenannter „*flip turn*“ und der N-Terminus des reifenden Proteins wird zytosolisch orientiert (Shao & Hegde 2011b; Zhang & Miller 2012). Dies ist typischerweise für Typ II Membranproteine der Fall. Ist der C-Terminus des neu synthetisierten Proteins positiv geladen, was charakteristisch für Typ I oder Typ III Membranproteine ist, erfolgt kein *flip turn* und der N-Terminus wird luminal ausgerichtet (Devaraneni et al. 2011; Lang et al. 2017). Dass neu synthetisierte Proteine ihre korrekte Topologie erhalten, wird, ähnlich wie das Öffnen des Kanals selbst, ebenfalls durch akzessorische Komponenten unterstützt, wie es beispielhaft für den TRAP-Komplex gezeigt werden konnte (Bañó-Polo et al. 2017; Sommer et al. 2013). Die Insertion von Proteinen mit mehreren TMD erfolgt zu Beginn identisch zu den bereits beschriebenen Transmembranproteinen. Nachdem die Orientierung der ersten TMD festgelegt wurde, basierend auf deren Sequenz, erfolgt die weitere cotranslationale Insertion in der sich daraus ergebenden Orientierung (Cymer et al. 2015; Virkki et al. 2014).

Durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Membran fixierte Proteine werden ebenfalls anhand der N-terminalen Signalsequenz an und durch das Translokon hindurchgeführt. Nachdem die Signalsequenz abgespalten wurde, wird die Ankerstruktur durch eine Transamidase angebracht und das Protein auf luminaler Seite in der Membran verankert (Ohishi et al. 2001; Paulick & Bertozzi 2008; Zurzolo & Simons 2016).

McGilvary und Kollegen konnten zeigen, dass die Insertion von polytopen Membranproteinen, die cotranslational in das ER überführt werden, nicht von Sec61 als Insertase allein gesteuert wird. Sie postulieren, dass das TMCO1-Protein ebenfalls eine Insertase bildet für TMD, die nur schwach mit Sec61 α interagieren (Anghel et al. 2017; McGilvary et al. 2020). Ebenfalls wurde ein Zusammenspiel zwischen Sec61 und EMC als Insertase beschrieben. Hierbei ist die Anwesenheit des EMC-Komplexes vor allem für die richtige Orientierung der ersten TMD während des cotranslationalen Transportes entscheidend (Bai et al. 2020; Chitwood et al. 2018).

4.3.6. Molekulare Chaperone: BiP als Faltungshelfer und Kanalöffner

Die Gruppe der Chaperone ist eine äußerst vielseitige Gruppe von Proteinen, mit ebenso vielseitigen Funktionen. Diese unter dem Begriff „*heat shock protein*“ (Hsp) 70 und Hsp40 zusammengefasste Proteingruppe unterstützen die Proteinfaltung und den Erhalt der Proteinkonformation, Regulieren den zellulären Stress und unterstützen weitere zelluläre Prozesse. Diese Prozesse werden häufig durch den Verbrauch von Energie in Form von ATP ermöglicht. Die benannte Vielfältigkeit wird ebenfalls durch eine große Anzahl von Interaktionen der Hsp70-Proteine mit Hsp40- oder Hsp90-Proteinen gefördert (Buchner 2019).

Eines der wohl funktionell vielfältigsten Hsp70 Chaperone ist das luminal lokalisierte „*immunoglobulin heavy-chain binding protein*“ oder Grp78, welches aber vor allem unter dem Namen BiP bekannt ist (Haas 1994; Zimmermann & Lang 2020). Mit einer Konzentration von 8 μ M gehört es zu den abundantesten Proteinen in der HeLa-Zelle und ist gleichzeitig das abundanteste luminaire Protein in HeLa-Zellen nach Calreticulin (Hein et al. 2015). Wie es für ein Hsp70 Chaperone typisch ist, besteht auch BiP aus zwei Domänen die funktionell konserviert sind: Der N-terminalen Nukleotidbindedomäne (NBD) und der C-terminalen Substratbindedomäne (SBD) welche strukturell in eine acht β -Faltblätter umfassende α -Domäne und die helikale „*lid*“ β -Domäne unterteilt werden kann (Dudek et al. 2009; Pobre et al. 2019). Verbunden werden die NBD und SBD durch eine Linkerdomäne, die eine zentrale Rolle zum einen in der Interaktion der beiden Domänen, zum anderen auch für die Interaktion mit den J-Domänen der Hsp40 Co-Chaperone einnimmt (Kumar et al. 2011). Als Chaperon bindet die SBD von BiP an exponierte, hydrophobe Sequenzen von ungefalteten Proteinen. Diese werden dadurch vor Aggregation geschützt, bzw. wird die Faltung zur korrekten Konformation unterstützt, da diese Zwischenstufe, also die Bindung an BiP, dem energetisch günstigen Zustand eines korrekt gefalteten Proteins entspricht (Flynn et al. 1991). Dies erfolgt in Abhängigkeit davon, ob ATP oder ADP an der NBD gebunden ist, wodurch ein energieabhängiger Zyklus entsteht. Dieser Zyklus kann in vier Schritte mit mehreren Akteuren unterteilt werden. Zu „Beginn“ des Zyklus ist ATP an die NBD des BiP gebunden und die Substrataffinität des SBD ist gering und der „*lid*“ geöffnet. Erfolgt nun die Bindung an ein J-Domäne tragendes Hsp40, welche in einigen Fällen bereits an Substratproteine gebunden sind, wird die ATPase-Aktivität stimuliert und eine strukturelle Änderung des Chaperons sorgt für eine hohe Substrataffinität und ein Schließen des „*lid*“ und das Substrat wird gebunden. ADP wird vom der NBD gelöst durch die Interaktion mit einem Nukleotidaustauschfaktor, wie zum Beispiel Grp170 oder Sil1. Dadurch kann ATP wieder binden, die offene Konformation der SBD wird begünstigt und das Substrat wird entlassen (Mayer 2018; Mayer & Kityk 2015; Pobre et al. 2019). Die Hsp40-Proteine, die mit BiP interagieren, auch *ER-localized DnaJ cofactors* (ERdj) genannt, sind im ER durch insgesamt sieben Proteine (ERdj1-ERdj7) vertreten. Diese führen dazu, dass BiP in verschiedensten Prozessen wie Translokation und Faltung von Proteinen, aber auch bei der ER-assoziierten Proteindegradation Funktionen erfüllt (Otero et al. 2010; Pobre et al. 2019). Zudem wird BiP als Indikator genutzt, um den zellulären Stress zu identifizieren. Als Reaktion auf die „*unfolded protein response*“ (UPR) wird die Synthese von BiP erhöht, um Proteinaggregation zu verhindern und den Abbau fehlgefalteter Proteine zu unterstützen. Die Regulierung der Stressantwort selbst erfolgt ebenfalls durch BiP aufgrund von vorhandenen und nicht vorhandenen Interaktionen mit den UPR induzierenden Proteinen (Bertolotti et al. 2000; Dudek et al. 2009; Lewy et al. 2017; Vitale et al. 2019). Im direkten Zusammenspiel mit Sec61 α ergeben sich die zwei bereits

beschriebenen Funktionen (I) das Bilden einer molekularen Ratsche um den Rückfall von Polypeptidketten zu verhindern (Liebermeister et al. 2001; Matlack et al. 1999; Tyedmers et al. 2003). (II) Durch die direkt am Loop sieben des Sec61 α stattfindende Interaktion ermöglicht BiP das Öffnen und Schließen des Kanals (Schäuble et al. 2012). In allen Fällen wird die Funktion von BiP durch Co-Chaperone, die ErdJ/ Hsp40-Proteine unterstützt (Brodsky et al. 1995; Brodsky & Scheckman 1993; Schorr et al. 2015).

Ähnliche calciumregulatorische aber auch transportvermittelnde Funktionen sind von anderen Proteinen bekannt. Zu diesen gehört unter anderem das Chaperon Calnexin, welches ein Interaktionspartner des Ribosoms und des Translokons ist (Lakkaraju et al. 2012a). Dieses bildet als Membranprotein zusammen mit dessen luminalem Paralog Calreticulin und der ERp57 Isomerase einen Komplex, der die Qualitätskontrolle und die Faltung von Glykoproteinen im ER ermöglicht (Hebert & Molinari 2007). Durch die in Calnexin und Calreticulin präsente „*carbohydrate binding domain*“ können diese speziell an glykosylierte naszierende Proteine binden, woher die Bezeichnung Lektin-Chaperone stammt und diese vor einer Aggregation schützen (Pearse & Hebert 2010; Schrag et al. 2001). Durch eine jeweilige Calciumbindestelle sind beide Proteine ebenfalls maßgeblich an der Bindung und damit der Regulation der Calciumhomöostase im ER-Lumen beteiligt, wobei hier Calreticulin durch die höhere Calciumaffinität und höhere Abundanz eine gesteigerte Rolle einnimmt (Michalak et al. 2002).

Ein weiteres Calciumbindendes Protein mit Chaperonfunktion, welches mit Sec61 interagiert, ist das zytosolische Calmodulin, welches bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben wurde.

4.4. Die Calciumhomöostase der Zelle

Das sowohl vielseitigste als auch abundanteste Kation im humanen System ist das Calciumion (Ca^{2+}). Etwa ein Kilogramm Calcium befindet sich im Körper, hiervon sind jedoch 99 % in Knochen und Zähnen vorzufinden (Emkey & Emkey 2012). Die hohe Abundanz und Wechselwirkung mit Proteinen hat zur Folge, dass eine präzise Steuerung und Regulierung dieses Kations von essenzieller Bedeutung für die Zelle und den gesamten Organismus ist. Hier sind beispielhaft Prozesse wie Muskelkontraktion, Signalweiterleitung und Apoptose zu nennen, wobei Calcium im ER-Lumen auch eine entscheidende Rolle bei der Reifung von Proteinen spielt (Berridge et al. 2003; Bootman 2012; Clapham 2007). Da das ER selbst den Hauptspeicherort der Zelle darstellt, ist eine genauere Betrachtung dieses Systems für die Arbeit von hoher Relevanz.

4.4.1. Die Verteilung und Regulierung von Calcium in der Zelle

Calcium moduliert und kontrolliert in der Zelle und somit im gesamten Organismus unterschiedliche Prozesse, begonnen bei der Befruchtung, über die Muskelkontraktion bis hin

zur Steuerung der Apoptose (Kuo & Ehrlich 2015; Pinton et al. 2008). Das Ion ist omnipräsent, jedoch liegt es in den unterschiedlichsten Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle vor. Während im Zytosol in Ruhebedingungen eine Calciumkonzentration von 10^{-7} M herrscht, liegt die Konzentration im extrazellulären Raum bei ca. 10^{-3} M und im ER $1-5 \cdot 10^{-4}$ M (Bagur & Hajnóczky 2017). Diese Konzentrationsgradienten werden in der Zelle auf verschiedene, energetisch kostspielige, Weise reguliert, was sowohl den Transport als auch die Bindung von Calcium umfasst (Clapham 2007). Innerhalb der Zelle stellt das ER den Hauptspeicherort für Calcium dar (Abb. 7). Calcium wird dort unter anderem von Proteinen wie Calreticulin, PDI, Grp94 und BiP gebunden. Damit übt das Ion nicht nur einen direkten Einfluss auf diese Proteine aus, sondern nimmt auch sekundär auf die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine Einfluss (Coe & Michalak 2009; Milner et al. 1992). Eine in diesem Kontext häufig genannte Domäne ist die EF-Hand-Domäne, welche durch eine Helix-Loop-Helix Form charakterisiert ist (Capozzi et al. 2006). Diese ermöglicht es Proteinen Calcium an dem Loop zu binden und dadurch entweder die Menge an freiem Calcium zu modulieren oder durch bindungsabhängige Konformationsänderungen ein Signal weiterzuleiten (Nelson et al. 2002). Bezug auf das Translokon nehmend, ist hier vor allem Sec62 zu nennen, welches im Zusammenspiel mit Calmodulin im Zytosol in Abhängigkeit vom präsenten Calcium die Schließung des Translokons beeinflusst (Erdmann et al. 2011; Linxweiler et al. 2013). Aufgrund der Charakteristik als Kation, ist Calcium nicht membranpermeabel, was zur Folge hat, dass die Calciumhomöostase mit Hilfe unterschiedlicher Pumpen und Kanäle aufrechterhalten werden muss. In der Plasmamembran erfüllt diese Funktion unter anderem die ATP-abhängige *plasma membrane Ca²⁺-ATPase* (PMCA), welche durch die Bindung mit Calmodulin an deren C-Terminus bei erhöhter Calciumkonzentration im Zytosol aktiviert wird (Bruce 2018; Strehler & Treiman 2004). Des Weiteren ist ebenfalls die Gruppe der *Na⁺/Ca²⁺ exchanger* (NCX) als Kationenaustauscher zu nennen. Diese nutzen den elektrochemischen Gradienten, um die Ionen gegen das Konzentrationsgefälle zu transportieren (Import von 3 Na⁺, Export von 1 Ca²⁺). In der Plasmamembran wird der NCX ebenfalls durch interagierende Proteine reguliert, jedoch auch durch die Präsenz von Calcium allein (Besserer et al. 2007; Ruknudin & Lakatta 2007). Funktionell ähnlich, jedoch durch die Anwesenheit von Calcium und Kalium reguliert ist der *K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger* (NCKX) in der Plasmamembran, welcher zeitgleich Kaliumionen aus dem Zytosol führt (Hassan & Lytton 2020). In der Membran des Golgi-Apparats ist ein weiteres NCKX-Protein (Isoform 5) lokalisiert (Ginger et al. 2008), in Mitochondrien das durch Lithium regulierte NCLX-Protein (Kostic & Sekler 2019).

Das Wissen der calciumassoziierten Funktionen von Mitochondrien hat sich über die letzten sechzig Jahre stark erweitert und reicht heute von einer Calciumspeicherfunktion bis hin zur Autophagieregulation (Rizzuto et al. 2012). Dass diese Funktionen, wie auch der

Energiehaushalt der Zelle, eng an die Calciumhomöostase geknüpft sind, zeigen die unter anderem engen räumlichen Kontakte, sogenannte MAMs (*mitochondria associated membranes*) (Patergnani et al. 2011). Diese erlauben durch die Distanz von maximal 25 nm zwischen ER und äußerer Membran der Mitochondrien und der Anwesenheit von *mitochondrial Ca²⁺ uniporter* (MCU) eine direkte Kommunikation und eine Regulierung von Calciummikrodomänen (Marchi & Pinton 2014; Rizzuto et al. 2004; Rizzuto et al. 2009; Rizzuto & Pozzan 2006).

Der *inositol 1,4,5-triphosphate receptor* (IP₃R) ermöglicht den Austritt von Calcium aus dem ER, nachdem der Kanal durch eine Kombination aus dem *second messenger* IP₃ und Ca²⁺ aktiviert wurde (Prole & Taylor 2019; Taylor & Tovey 2010). Der zweite Ausstromkanal für Calcium aus dem ER ist der *ryanodine receptor* (RyR), welcher in drei Isoformen in der Zelle vorliegen kann. Dieser kann durch das pflanzliche Alkaloid Ryanodin blockiert werden und erlangt dadurch seinen Namen (Imagawa et al. 1987; McGrew et al. 1989). Im physiologischen Kontext jedoch kann der Kanal durch verschiedene Modulatoren beeinflusst werden, wie Ionen, Proteine oder kleine Moleküle (Lanner et al. 2010).

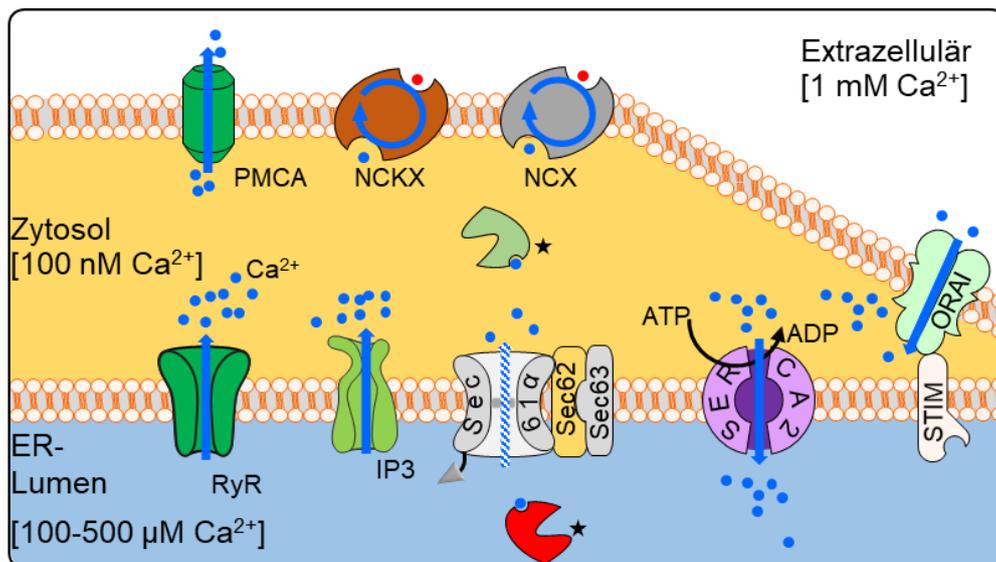


Abb. 7: Verteilung von Ca²⁺ in der Zelle und schematische Darstellung der Calciumregulatoren. Calcium wird mit Hilfe unterschiedlicher Pumpen aus dem Zytosol geführt, spezifisch durch SERCA in das ER (Kap. 4.4.4). Der Calciumgradient zwischen dem ER und dem Zytosol führt dazu, dass Calcium mittels regulierter Kanäle aus dem ER strömen kann. Sec61 α bildet einen Leckstrom aus dem ER hinaus (Kap. 4.4.2). SOCE vermittelnde Komponenten, STIM und ORAI, ermöglichen einen regulierten Einstrom von Calcium in das Zytosol (Kap. 4.4.3). *: symbolisiert Calcium-bindende Proteine im Zytosol und im ER. Der scharfzige Pfeil durch Sec61 α symbolisiert den als *leak* bezeichneten Leckstrom von Calcium. Abbildung generiert mit der Hilfe von Motifolio Inc.

4.4.2. Calciumleak: Ursprung und Funktion

Das Gleichgewicht von Calcium in der Zelle befindet sich nicht in einem starren Zustand, ebenso sind die beschriebenen Speicher, allen voran das ER, keine statischen Gebilde. Daher strömt Calcium aus dem Hauptspeicherorganell über sogenannte Leckströme. Dieses

Entweichen erfolgt jedoch nicht über einen der regulierten Calciumkanäle (Beecroft & Taylor 1998; Camello et al. 2002). Hierbei handelt es sich in der Regel um indirekte und unregulierte Ströme, die dem Konzentrationsgefälle folgen. Der *leak* selbst, kann je nach Zelltyp unterschiedlich sein und bis zu 100-200 $\mu\text{M}/\text{min}$ (HeLa) betragen (Barrero et al. 1997; Camello et al. 2002) oder ca. 60 $\mu\text{M}/\text{min}$ in HEK-Zellen (persönliche Kommunikation A. Cavalié/S. Lang). Einen Großteil dieses Calciumverlustes erfolgt durch den Sec61 Kanal. Hier wird, wie bereits beschrieben, Calcium nach den Transportereignissen aus dem ER entlassen (Lang et al. 2011). Neben dem Sec61-vermittelten Calciumleckstrom sind weitere Proteine bekannt, die ebenfalls in der Lage sind Calcium aus dem ER zu entlassen. Hier sind u.a. LRRC8B, Bcl-2, Pannexine, Presenilin-1 und Presenilin-2 sowie TMCO1 zu nennen (Abeelee et al. 2002; Bond & Naus 2014; Ghosh et al. 2017; Lemos et al. 2021; Tu et al. 2006; Wang et al. 2016). Hierbei erfüllt vor allem TMCO1 die Funktion eine zu hohe Calciumkonzentration im ER zu verhindern, indem es dimerisiert und den Calciumkanal ausbildet (Wang et al. 2016). Die Funktion als Insertase könnte den mit TMCO1 assoziierten Leckstrom erklären (McGilvray et al. 2020). Wie groß die Anteile der einzelnen Proteine am physiologischen Gesamtleckstrom sind, ist in der Literatur bisher nicht bekannt.

Die Funktion der Leckströme an sich sind bisher nicht eindeutig bestimmt. Im Zusammenhang mit Leckströmen aus nicht vollständig regulierten RyR werden Fehlfunktionen des Herzens gesehen (Bers 2014; George 2007). Eine Unterbrechung des Presenilin-abhängigen *leaks* in neuronalen Zellen steht in Verbindung zur Entwicklung von Alzheimer-Erkrankungen (Zhang et al. 2010). In Bezug auf den Calciumleckstrom, der durch das Sec61 Translokon vermittelt wird, wurde die Hypothese entwickelt, dass eine wechselseitige Regulation mit dem in der ER-Membran befindlichen ATP-Transporter AXER besteht. Wird der Leckstrom durch einen verstärkten Verbrauch von ATP im ER gesteigert, wird eine Signalkaskade aktiviert, die sowohl die Steigerung der ATP Produktion, als auch des Transportes in das ER zur Folge hat (Klein et al. 2018; Vishnu et al. 2014; Zimmermann & Lang 2020).

4.4.3. Der SOCE gleicht Calciummangel aus

Der Mechanismus des schnellen Calciumeinstroms in das Zytosol wurde erstmalig 1986 beschrieben. Als Auslöser dieses Prozesses wurde zum damaligen Zeitpunkt die Entleerung des ERs beschrieben (Putney 1986). Dieser Vorgang wird heute als *store operated Ca^{2+} entry*, kurz SOCE, bezeichnet und beschreibt den Eintritt von Calcium aus dem extrazellulären Raum (Targos et al. 2005). Als Folge der Depletion der Calciumspeicher erfolgt die Oligomerisierung von STIM-Proteinen, welche in der ER-Membran lokalisiert sind, und als Sensor agieren (Liou et al. 2005). Durch die Entleerung des ERs wird Calcium von dem EF-Hand Motiv des STIM gelöst, was zu einer Oligomerisierung des Proteins in der ER-Membran führt (Huang et al. 2006; Yu et al. 2013). Diese Oligomerisierung der STIM-Proteine findet an ER-

Plasmamembran-Verbindungen statt und führt zu der Bildung von STIM-ORAI1 Mikrodomänen, die eine Breite von ca. 8 nm in HeLa-Zellen einnimmt (Hogan 2015). Diese genannten ORAI1-Proteine, welche den zweiten Teil der funktionellen Mikrodomäne darstellen, formen durch die Rekrutierung mittels STIM1 Hexamere in der Plasmamembran und bilden dadurch eine Möglichkeit des Calciumeintritts (Hou et al. 2012; Lunz et al. 2019). In den vergangenen Jahren wurde weiterhin gezeigt, dass auch das Protein TRPC1 einen Beitrag zum SOCE leistet. Es wird durch den ORAI1 vermittelten Calciumeinstrom in die Plasmamembran eingelagert, um dort, reguliert durch STIM1 oder davon unabhängig, ebenfalls auf die Regulierung calciumspezifischer Prozesse einwirkt (Ambudkar et al. 2017; Choi et al. 2014). Die Bedeutung dieses Prozesses wird dadurch untermauert, dass der Grund verschiedener Erkrankungen in Mutationen oder Fehlfunktionen eines der Proteine zu finden ist (Cantonero et al. 2019; Lacruz & Feske 2015; Michelucci et al. 2018). Fälschlicherweise dem SOCE häufig zugewiesen, sind die TRP-Kanäle in der Plasmamembran. Diese Kanäle für Kationen werden jedoch auf unterschiedlichste Weise aktiviert (z.B. Spannung, Liganden) und entsprechen so nicht der Definition eines SOCE (Minke 2006; Samanta et al. 2018). Für TRPC1 steht diese Kategorisierung noch zur Diskussion, da es direkt mit STIM1 und ORAI1 interagiert und den SOCE moduliert (Dietrich et al. 2014; Liao et al. 2009).

4.4.4. SERCA als Calcium ATPase des ERs

Das im Zytosol befindliche Calcium hat das Potential unterschiedliche Effekte in der Zelle auszulösen, zu denen auch Effekte wie Apoptose oder Nekrose gehören. Daher ist es ein Bestreben der Zelle, überschüssiges Calcium aus dem Zytosol zu entfernen, mit dem Ziel es aus der Zelle oder in das ER zu führen (Berridge et al. 2000; Clapham 2007). Für die Überführung des Calciums in das ER ist in allen eukaryotischen Zellen die *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump*, kurz SERCA, vorgesehen. Diese P-Typ ATPase befördert pro verbrauchtem ATP-Molekül zwei Ca²⁺-Ionen in das ER und ermöglicht so das entsprechende Konzentrationsgefälle (Primeau et al. 2018). Von den insgesamt 13 unterschiedlichen Isoformen, welche auch teilweise in spezifischen Zelltypen exprimiert werden, zeigt SERCA2b, eine ubiquitär vorkommende Unterform, die höchste Affinität zu Calcium (Dally et al. 2010; Vandecaetsbeek et al. 2009; Wuytack et al. 2002). Die Effektivität dieses Proteins wird deutlich durch den Umstand, dass bis zu 92 % des zytosolischen Calciums aus Herzzellen bzw. 60-70 % in Pankreaszellen mittels SERCA aus dem Zytosol entfernt werden (Bers 1997; Chen et al. 2003). Wenn eine geringe Calciumkonzentration im Zytosol vorliegt, wird SERCA durch die direkte Bindung auf zytosolischer Seite durch die Membranproteine Phospholamban und Sarcolipin inhibiert (Asahi et al. 2003; Morita et al. 2008), während auf luminaler Seite das Protein Calreticulin einen hemmenden Einfluss ausübt (Baker et al. 2002; John et al. 1998). Für eine Splicevariante, die SERCA1 Isoform, wurde zudem beschrieben, dass diese den Calciumleckstrom aus dem ER fördert (Chami et al. 2001). Eine Blockade der SERCA

ermöglicht die spezifische Entleerung des ERs und gehört zu den zentralen Techniken dieser Arbeit. Dies erfolgte durch den Inhibitor Thapsigargin, welcher irreversibel an SERCA bindet und die Transportfunktion blockiert (Lytton et al. 1991; Thastrup et al. 1990). Dadurch wird die Rückführung von Calcium aus dem Zytosol in das ER verhindert und infolgedessen akkumuliert das aus dem ER strömende Calcium im Zytosol, bis es über die Plasmamembran abgeführt wird. Daraus resultierend folgt der Zelltod innerhalb von zwei bis vier Tagen nach der Behandlung (Sehgal et al. 2017).

Das Wechselspiel zwischen den einzelnen Komponenten der Calciumhomöostase ergibt ein Gleichgewicht, welches eine Vielzahl von Funktionen erlaubt, allerdings auch bei Unregelmäßigkeiten, ausgelöst durch beispielsweise eine Mutation einer der Komponenten, schwere Folgen für die Zelle und den Organismus haben kann.

4.5. ER-assoziierte Pathophysiologie

Ein Zugewinn von Wissen über Proteine und deren Funktion, erfolgt häufig, wenn diese verändert oder nicht mehr funktionell sind. Daher ist der Blick auf die aus Mutationen resultierende Pathophysiologie ein lehrhafter Bestandteil der Biologie. Hierbei liegt der Fokus auf der *autosomal-dominant tubulointerstitial kidney disease* (ADTKD), bisherige Erkenntnisse zu deren Verbindung zu Sec61 α 1 und weiteren Translokon-assoziierten Erkrankungen.

4.5.1. ADTKD: Ursachen und Symptomatik

Der Begriff ADTKD steht für eine seltene Gruppe genetischer Erkrankungen. Darunter sind nun Krankheiten zusammengefasst worden wie *medullary cystic kidney disease* Typ 1 und 2 (MCKD), *familial juvenile hyperuricemic nephropathy*, sowie *uromodulin-associated kidney disease* (Eckardt et al. 2015). Grund für die unterschiedliche Benennung war, dass die Krankheiten von verschiedenen Mutationen in den codierenden Genen für Renin (*REN*), *Hepatocyte Nuclear Factor-1-beta* (*HNF1B*), Uromodulin (*UMOD*) und Mucin-1 (*MUC1*) begründet sind, die alle einen ähnlichen Phänotyp auslösen (Ayasreh et al. 2017; Bleyer et al. 2017; Bleyer et al. 2014; Eckardt et al. 2015; Hart et al. 2002). Studien zeigten, dass im Fall von Renin über 60 % der Mutationen in der abspaltbaren Signalsequenz liegen und nur 15 % im reifen Protein (Živná et al. 2020). Als gemeinsames Charakteristikum der Krankheiten werden tubuläre Schäden, fibrotisches Interstitium und fortschreitender Verlust der Nierenfunktion beschrieben, welche in einer vollständigen Funktionslosigkeit und notwendigen Transplantation resultiert (Devuyst et al. 2019). Abhängig vom mutierten Gen und der Position der Mutation sind verschiedene weitere Symptome bekannt (siehe Tab. 1). Daher werden diese Erkrankungen nun unter dem Begriff ADTKD zusammengefasst und auf Basis von genetischen Analysen in Unterkategorien aufgeteilt. Dennoch können bisher nur 50-60 % der Erkrankungen auf Mutationen in *UMOD*, *REN*, *HNF1 β* oder *MUC1* zurückgeführt werden, was die enorme Variabilität der Krankheitsursache aufzeigt (Devuyst et al. 2019). Ebenfalls zur

Gruppe der ADTKD gehörend, obwohl hier eine Einschränkung der Niere nicht in jedem Fall gegeben ist, sind die Mutationen der *SALL1*, *JAG1* und *GATA3* Gene (Bleyer et al. 2017). Im Fall von Hnf1 β und Sec61 α sind neben der Niere auch andere Gewebe betroffen. Da Hnf1 β als Transkriptionsfaktor in der Niere, dem Pankreas, der Leber und dem Urogenitaltrakt agiert, sind bei dieser Mutation auch extrarenale Symptome zu beobachten (Clissold et al. 2015). Ein ähnlicher Effekt aufgrund der globalen Expression gilt für Mutationen, die zu einer Veränderung des Sec61 α führen (siehe 4.5.2.1). Da die Symptome diffus sind und einige auch im Verlauf der Krankheit entstehen, wird die Krankheit häufig falsch oder spät erkannt und erst im Kontext einer Stammbaumanalyse als ADTKD identifiziert (Chun et al. 2020). Um welchen Typ der Erkrankung es sich handelt ist in der Regel nur durch einen genetischen Test zu erreichen (Devuyst et al. 2019). Als weiterer negativer Effekt wird eine Belastung des ERs durch Stress hervorgehoben, der eine UPR auslösen kann, ausgelöst durch fehlgefaltete Proteine oder das Verbleiben der Proteine im ER (Bolar et al. 2016; Kemter et al. 2017; Živná et al. 2009).

Tab. 1 Übersicht über die Formen der ADTKD. Es wurde nicht zwischen einzelnen Mutationen der Unterklassen unterschieden, diese können sich weitergehend unterscheiden. Grundlegende Befunde wie interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophien und der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion sind charakteristisch für jede Form der ADTKD. Die Tabelle wurde erstellt basierend auf: (Ayasreh et al. 2017; Bleyer et al. 2007; Bleyer & Kmoch 2013; Devuyst et al. 2019; Eckardt et al. 2015; Kmoch et al. 2011).

Unterklas- sifizierung	Betroffenes Protein	Expression des Proteins	Protein Funktion	Klinische Befunde	Laborbefunde	Histologischer Befund
ADTKD- <i>UMOD</i>	Uromodulin (ehemals Tamm Horsefell)	Niere, dickwandige aufsteigende Henle-Schleife, Distaler Tubulus	-Regulation Blutdruck, Transport, Urinkonzentration, angeboren Immunität -Protektiv gegen Nierensteine und Infektionen	-Gicht im Jugendalter -Urinkonzentrationdef. -Zystenbildung -evtl. verkleinerte Nieren	-Hyperurikämie -geringe Uromodulinkonzentration im Urin -veränderter Urinstatus	-Einlagerung von Uromodulin in Zellen der Henle- Schleife
ADTKD- <i>MUC1</i>	Mucin 1	Sekretorisches Epithelgewebe	-Erhalt der Mucusbarriere -Signalweiterleitung -Immunregulierende Eigenschaften	-Gicht -möglicherweise Zysten in den Nieren	-Hyperurikämie	-Intrazelluläre Einlagerung von Muc1 in Zellen der Henle-Schleife und anderen Geweben
ADTKD- <i>HNF1B</i>	Hepatocyte Nuclear Factor 1β	Niere, Pankreas, Leber, Lunge, Interstitium, Urogenitaltrakt	-Transkriptionsfaktor der frühen Leber-, Niere-und Lungenentwicklung	-angeborene Nierenanomalien -Leberfunktions- -Diabetes -genitale Anomalien	-Hyperurikämie -Hyperkaliämie -Hypomagnesiämie -gestörte Leberfunktion	
ADTKD- <i>REN</i>	Renin	Niere, Juxtaglomerulärer Apparat	-Renin-Angiotensin- Aldosteronsystem -Nephrogenese	-Gicht im Erwachsenenalter -Anämie -Hypotonie -erhöhtes Risiko eines akuten Nierenversagens	-Anämie -Hyperurikämie -geringe Renin Plasmakonzentration -geringe Uromodulinausscheidung	-verringertes Reningehalt im Juxtaglomerulären Apparat
ADTKD- <i>Sec61A1</i>	Sec61α1	Ubiquitär	-Kanalformende Untereinheit des Translokons, -Proteintransport, -Calciumhomöostase	-Gicht -geringes Wachstum, intrauterine und postnatal -Gaumenspalte -Abszessbildung	-Leukopenie -Neutropenie -kongenitale Anämie	-Sec61α Fehllokalisation -eingeschränkte Nierenentwicklung im Zebrafisch

Die Behandlung dieser autosomal dominant vererbten Krankheit erfolgt symptomatisch und eine Umstellung der Ernährung ist erforderlich. Hierbei zeigte sich für ADTKD-*REN* und-*HNF1B* Patienten, dass eine frühe Behandlung im Kleinkindalter einen deutlich positiven Effekt hat (Eckardt et al. 2015).

4.5.2. Pathophysiologie im Kontext des Translokons

Durch die duale Funktion des Translokons, zum einen für den Proteintransport, zum andern für die Calciumhomöostase, kann hier die Ursache für eine Vielzahl von Krankheiten gefunden werden. Durch hohe Anzahl der Interaktionspartner des Translokons und deren verschiedenen Funktionen erweitert sich dieses Spektrum. Bisher deutet die Mehrzahl der Studien an, dass es sich bei Sec61 α um ein essentielles Protein handelt, wodurch erklärbar ist, warum es keine bekannten Krankheiten gibt, die auf einen völligen Verlust von Sec61 α zurückzuführen sind (Lang et al. 2012; Schuren et al. 2019; Sicking et al. 2021).

Im Folgenden soll ein Überblick über die sogenannten *Sec-Channelopathies* und die Effekte von Mutationen in akzessorischen Komponenten gegeben werden, wobei das Hauptaugenmerk auf den bisherigen Wissensstand zur ADTKD in Verbindung mit Sec61 gelegt werden soll.

4.5.2.1. Die *SEC61A1*-Mutationen V67G und T185A führen zu ADTKD

Die beiden im Fokus dieser Arbeit stehenden Mutationen sind die *missense*-Mutationen V67G und T185A des *SEC61A1*-Gens. Diese sind erstmalig 2016 in Patienten beschrieben worden, die an einer Subform der ADTKD erkrankt sind (Bolar et al. 2016). Auffällig ist, dass beide Mutationen in den funktionell wichtigen Bereichen des *plug* (V67G) und der als „*constriction ring*“ bezeichneten Region um den *pore ring* liegen (T185A) (Bolar et al. 2016; Van den Berg et al. 2004).

Für beide Mutationen wurde in Zellkulturexperimenten gezeigt, dass bei der Überexpression der FLAG-getaggten Mutante Sec61 α teilweise im Golgi-Apparat mislokalisiert vorliegt. Dies wurde ebenfalls in von Patienten gespendeten Proben für die ADTKD-T185A gezeigt. In Versuchen, die den Einfluss von Sec61 α während der embryonalen Nierenentwicklung von Zebrafischen adressierten, wurde dargestellt, dass Sec61 α einen entscheidenden Beitrag zur gesunden Entwicklung einer Niere liefert, den *SEC61A1*-V67G und -T185A nicht leisten konnten (Bolar et al. 2016).

Im Fall von T185A zeigten Patienten aus drei Generationen neben den beschriebenen typischen ADTKD-Symptomen (interstitielle Fibrose, Funktionsverlust der Niere und weitere siehe Tab. 1) zusätzlich Symptome der kongenitalen Anämie, sowie intrauterine und postnatale Wachstumsdefizite. Individuell konnten Begleitsymptome wie eine Gaumenspalte

oder leichte geistige Behinderungen auftreten. Die Nieren selbst zeigten im Ultraschall eine veränderte Gewebestruktur, jedoch keine Zysten und die mit der Niere in Zusammenhang stehenden Laborwerte wie beispielsweise Renin- oder Aldosteron Gehalt waren im unteren Normbereich. Durch Biopsien wurden ebenfalls verschiedene Änderungen in den Tubuli der Niere festgestellt. In der fortgeschrittenen Phase der Krankheit verliert die Niere vollständig ihre Funktion. Strukturell wird vermutet, dass durch den Aminosäureaustausch die Struktur des *pore rings* beeinflusst sein könnte, aufgrund von fehlenden Wasserstoffbrückenbindung. Auffällig in diesem Zusammenhang war auch die Abwesenheit von Renin in Juxtaglomerulären Zellen (Bolar et al. 2016). Der Fall einer weiteren Patientin mit einer *de novo* T185A Mutation zeichnet ein ähnliches Bild der Erkrankung. Auch hier wurden ein Nierenversagen, Anämie und ein geringes Körpergewicht festgestellt. Diese konnten jedoch maßgeblich durch spezifische Diäten normalisiert werden, wobei die glomeruläre Filtrationsrate weiterhin außerhalb der Norm ist (Espino-Hernández et al. 2020)

Bis dato sind lediglich zwei Verwandte *SEC61A1*-V67G-ADTKD-Patienten bekannt. Diese zeigen Symptome einer kongenitalen Anämie und Neutropenie, zusammen mit sich einer fortschreitenden Gicht und chronischer Nierenfunktionsstörungen. Wie bei ADTKD-T185A Patienten zeigten sich geringe Renin- und Aldosteron Gehalte, zusammen mit einem verringerten Uromodulingehalt im Urin. Zysten konnten beim älteren Patienten festgestellt werden (Bolar et al. 2016). Durch das eingebrachte Glycin im *plug* wird eine erhöhte Flexibilität des *plug* vermutet, was zu einer veränderten Calciumhomöostase und Translokationseffizienz führen könnte (Bolar et al. 2016). Ein weiterer Patient mit einer V67G Mutation wurde ebenfalls mit Neutropenie diagnostiziert, allerdings ohne auffällige Nierenbefunde. Dieser Phänotyp wird als *autosomal dominant severe congenital neutropenia* (ADSCN) bezeichnet (Van Nieuwenhove et al. 2020).

4.5.2.2. Weitere pathophysiologische Phänotypen nach Mutationen in *SEC61A1*

Die Anzahl der untersuchten Krankheiten, die auf Mutationen des *SEC61A1* und damit auf Fehlfunktionen des Kanals zurückzuführen sind, steigt stetig an. Die am längsten bekannte Mutation des *SEC61A1* in Säugern, die einen pathophysiologischen Phänotyp auslöst, ist die *SEC61A1-Y344H*-Mutante der Maus (Lloyd et al. 2010). Lokalisiert ist diese im Loop 7 von Sec61 α und hat zur Folge, dass eine Anlagerung auf luminaler Seite und damit eine Modulation des Kanals durch BiP nicht mehr möglich ist (Abb. 8). Dies führt zu einem verstärkten Ca²⁺-Ausstrom (Schäuble et al. 2012). Darin wird die Ursache für die Apoptose der β -Pankreaszellen vermutet, was schlussendlich im Mausmodell zu der Entwicklung eines Diabetes und Hepatosteatose führt (Lloyd et al. 2010; Schäuble et al. 2012). Wie in der Hefe gezeigt werden konnte, führt der vollständige Verlust dieses Loops des Sec61 α zu einer

erhöhten Sensitivität gegen Kälte und Stress (Tretter et al. 2013). Dies kann ebenfalls mit der Funktion des BiP Proteins erklärt werden (4.3.6).

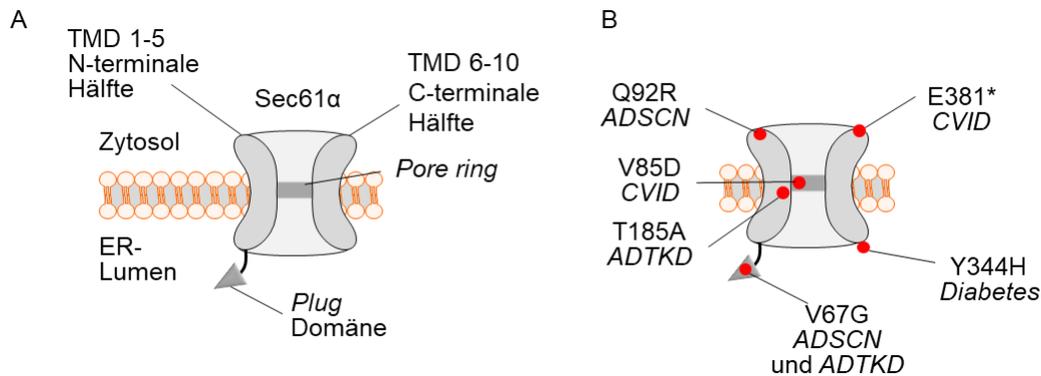


Abb. 8: Schematische Darstellung des Sec61 α -Kanals und Positionen der pathologischen Mutationen. **A:** Sec61 α wird in zwei pseudosymmetrische Hälften von TMD 1-5 (N-terminal) und TMD 6-10 (C-terminal) eingeteilt. *plug* und *pore ring*-Domäne sind eingezeichnet. **B:** Die Positionen und die ausgelösten Erkrankungen der jeweiligen Mutationen des Sec61 α sind schematisch eingezeichnet. ADSCN = *autosomal dominant severe congenital neutropenia*, CVID = *Common variable immunodeficiency*, ADTKD = *autosomal dominant tubular kidney disease*, * indiziert eine *nonsense* Mutation.

Zwei weitere Mutationen führen zu einem Phänotyp, der zur Gruppe der „*Primary Antibody deficiencies*“ (PAD) gezählt werden. Die bisher einzigen Patienten für die heterozygote E381* Nonsense-Mutation, die zu einem verfrühten Stopcodon und damit zu einem instabilen Sec61 α führt, zeigten ein geringes Immunglobulin-(Ig)-Level im Serum und teilweise im Kindesalter wiederkehrende Infektionen der oberen Atemwege (Schubert et al. 2018). Die molekularbiologischen Folgen, die die entstehende Haploinsuffizienz auslöst, sind bis auf die Feststellung einer geringeren Abundanz von Sec61 α in naiven B-Zellen nicht weiter untersucht. Die ebenfalls heterozygote Mutante V85D wurde in der gleichen Publikation untersucht. Auch hier ist bisher eine Familie mit dieser Mutation bekannt, die einen Antikörpermangel für IgM, IgG und IgA und wiederkehrende Infektionserkrankungen entwickelten. Interessant ist diese Mutation vor allem aufgrund ihrer Lokalisation, den V85 bildet normalerweise eine der sechs hydrophoben Aminosäuren des *pore rings*. Durch die Veränderung wird eine verringerte Stabilität dieser zentralen Komponente vermutet. Es sind sowohl der cotranslationale Transport von Polypeptidketten als auch die Calciumhomöostase in den Zellen gestört und ein dominant negativer Effekt entsteht, der vor allem die Funktion von Plasmazellen betrifft (Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020). In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass der Calciumausstrom durch Sec61 vermindert ist. Die jüngste untersuchte Mutation ist die Q92R Mutation, die in der zweiten Transmembrandomäne liegt (Van den Berg et al. 2004; Van Nieuwenhove et al. 2020). Die Vermutung ist, dass das Glutamin im offenen Zustand des Kanals mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit dem translozierenden Polypeptid interagiert. Die Mutation zu Arginin führt möglicherweise zu einer

Destabilisation der TMD 2 und die Interaktion mit neu synthetisierten Polypeptidketten könnte erschwert sein (Van Nieuwenhove et al. 2020). Phänotypisch zeigen die Patienten der Q92R Mutante Symptome einer schweren kongenitalen Neutropenie, also einem Mangel an Granulozyten, was sich durch wiederkehrende Infektionskrankheiten äußert. Es konnte ebenfalls eine geringe Sec61 α Proteinabundanz nachgewiesen werden, was auf eine verringerte Proteinstabilität des Sec61 α zurückzuführen sein könnte. Entgegengesetzt zur V85D Mutation zeigt sich hier aber ein Überschuss an Ig im Serum, des Weiteren konnte eine geringere Nierengröße festgestellt werden, die auch bei T185A Patienten beobachtet werden konnte (Bolar et al. 2016; Van Nieuwenhove et al. 2020).

In einigen weiteren Fällen sind die mutierten Proteine nicht die unmittelbare Ursache für die pathophysiologischen Effekte, die die Krankheit kennzeichnen. Dies zeigt sich unter anderem auch bei einer Form der Polyzystischen Lebererkrankung, die durch zwei Mutationen des *SEC61B* Gens ausgelöst wird. Für diese Krankheit konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation des *SEC61B* der Transport und damit der funktionelle Anteil von Polycystin-1 verringert wird (Besse et al. 2017). Somit kann die physiologische Rolle von Polycystin-1, der Verringerung der Zystenbildung, nicht mehr ausgeübt werden, wodurch Zysten in der Leber ausgebildet werden und diese auf Dauer ihre Funktion verliert (Fedeles et al. 2014). Im Fall von Sec61 γ konnte eine Verbindung zu Glioblastomen hergestellt werden. Hier zeigte sich, dass in einem Großteil der untersuchten Glioblastomen eine Überexpression der γ -Untereinheit, aber nicht der α - oder β -Untereinheit nachgewiesen werden konnte (Lu et al. 2009a). Diese Verbindung geht soweit, dass *SEC61G* als prognostischer Marker für den Verlauf der Tumorerkrankung genutzt werden kann, da eine Korrelation zwischen *SEC61G* Expression und dem Überleben der Patienten gezeigt werden konnte (Liu et al. 2019a). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte gezeigt werden, dass nach einer Depletion von Sec61 γ das Zellwachstum und die Proliferation verringert waren (Lu et al. 2009b).

4.6. Zielsetzung der Arbeit

Das Translokon ist ein zentraler Bestandteil des ERs und steht damit eng in Zusammenhang mit der Synthese von Proteinen und der Calciumhomöostase der Zelle. Hierbei wird deutlich, dass gerade im Bereich des Proteintransportes eine hohe Komplexität der Regulation und Vernetzung unterschiedlicher Komponenten vorliegt.

Das Ziel dieser Arbeit ist, zum einen die weitere Aufklärung des bisher nur aus der Hefe vollständig bekannten SND-Proteintransportweges, indem Interaktionspartner des hSnd2 identifiziert werden. Neben allgemeinen Topologiestudien geschieht dies mittels Co-IP-Versuchen sowie neu etablierten Interaktionsstudien in lebenden Zellen. Des Weiteren soll Sec61 α als „Schaltzentrale“ unterschiedlicher Prozesse besser charakterisiert werden. Dies erfolgt durch die Analyse von Zellen, die eine heterologe *SEC61A1* Expression vorweisen. Mit Hilfe dieser Zellen soll die pathophysiologische Situation in Patienten nachgeahmt werden, die entweder unter der Mutation V67G oder T185A des *SEC61A1* Gens leiden. Die molekularbiologische Charakterisierung dieser Erkrankung soll zum besseren Verständnis des Sec61 α beitragen und gleichzeitig erklären, auf welche Art diese pathologischen Phänotypen in der Zellkultur durch die Behandlung mit dem zugelassenen Pharmakon 4-PBA verbessert werden können. Hierbei wird die Calciumhomöostase durch die Anwendung von verschiedenen Modulatoren in *live-cell calcium* Messungen analysiert und der Einfluss der Mutationen auf den Transport neu synthetisierter Proteine durch das Sec61 α mittels *in vitro* Transporten gezeigt. Das Ziel ist es auch, die biochemischen Effekte auf den gesamten Organismus zu übertragen und so potenziell Erklärungen für Laborbefunde und Phänotypen zu ermöglichen.

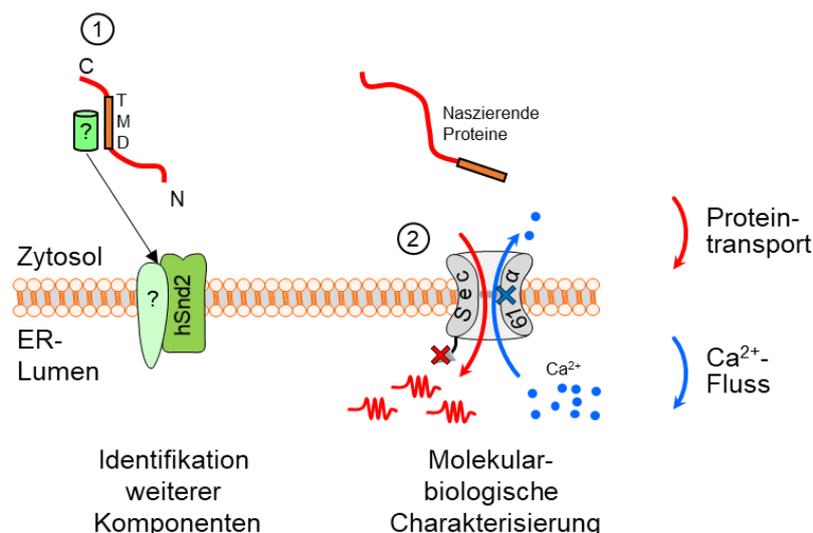


Abb. 9: Grafische Zusammenfassung der Zielsetzung der Arbeit. 1: Es werden die humanen Komponenten des SND-Proteintargetingweges gesucht, der in der Hefe aus drei Proteinen besteht. Bisher ist im humanen System nur hSnd2 bekannt. 2: Biochemische Charakterisierung der zwei Sec61 α -Mutanten V67G (rot) und T185A (blau). Beide lösen eine Form der ADTKD aus. Der Einfluss der Mutanten auf den Proteintransport sowie die Calciumhomöostase sind die zentralen Punkte der Arbeit.

5. Material und Methoden

Im Folgenden werden die für die Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt und die angewendeten Methoden beschrieben.

5.1. Material

Für die beschriebenen Materialien sind die Hersteller zum Zeitpunkt des Erwerbs des Gerätes, der Software oder der Chemikalie gelistet. Namensänderungen, Fusionierungen von Firmen oder ähnliches nach Erwerb der Materialien sind nicht berücksichtigt worden.

5.1.1. Geräte und Software

In der nachfolgenden Tab. 2 sind Verbrauchsmaterialien, Geräte und verwendete Softwares aufgeführt. Alltagsgegenstände, wie z.B. Kühl-, Gefrierschrank oder Mikrowellen werden nicht gelistet.

Tab. 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software.

Hersteller	Verbrauchsmaterial/Gerät/Software
Abena, Eberdingen	Handschuhe
Abimed, Düsseldorf	Gilson Pipetman Classic (2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl; 5000 µl)
ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA	xCELLigence [®] RTCA SP Instrument, E-Plate 96
Agilent Technologies Inc, CA, USA	RTCA Software 2.0
Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	qPCR-Cycler StepOnePlus [™] ; MicroAMP [™] optical adhesive covers and optical8-capstraps, <i>MicroAMP[™]96 well plate</i>
Andor Technology, Belfast, UK	EMCCD Kamera iXon EM+885 (ELYRA)
Beckmann, München	GS-6KR Zentrifuge, J2 MC Zentrifuge; Optima [™] MAX-E Ultrazentrifuge Rotoren: JA-10; JA-20; TLA100.3; GH-3.8 Polypropylen 1,5 ml Reaktionsgefäße
Bio-Rad, Feldkirchen	Trans-Blot [™] Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent
Braun, Melsungen	Spritzen, Kanülen
Corel Corporation, Ottawa, CAN	CorelDRAW [®] Graphics Suite 2018
Corning Ing., NY, USA	<i>Corning[®] 96 well plates clear bottom</i>
DNASTAR Inc, WI, USA	Lasergen Softwares (MegAline, SeqMan, SeqBuilder)
Duran, Wertheim	Laborglaswaren
Eppendorf, Hamburg	Kühlzentrifuge 5415R; 5430, Thermostat 5320, Thermomixer Comfort, Thermomixer 5436, Mixer 5432, Zentrifuge 5430; 5415C, Multistep pipette (Research Pro) 2 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß, Combitips [®]
Fröbel Labortechnik, Wasserburg	Rocky [®] Wipptisch, Sterilbank, Geltrockner

Hersteller	Verbrauchsmaterial/Gerät/Software
GE Healthcare, Uppsala, SWE	Electrophoresis Power Supply EPS 601, Storage Phosphor Screen, Image Eraser SF, Typhoon Trio™ (9410), Typhoon Scanner Control v5.0 Software, ImageQuant TL 7.0 Software, ImageQuant 5.1 Software, Image Scanner 3, Labscan Software
Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim	Sterilbank 82126
Genser Scientific Instruments MFG. CO. Rotenburg O. T:	JET 1-Automatic Vacuum System
GFL® Burgwelde	Rotationsschüttler 3019
Gilson, Middleton, WI, USA	Multipipette (Pipetman Concept 5-100 µl)
Greiner Bio-One-GmbH, Frickenhausen	CELLSTAR® Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²), CELLSTAR® TC Zellkulturschalen (3,5 cm und 6 cm), 96 Mikroplatte weiß/ flach
Heidolph Instruments, Schwabach	Laborrührer RZR2020
Heraeus, Hanau	Inkubationsschrank Hera Cell 150, Bactifuge
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	Pipetus®-Akku Pipettierhilfe
Infors, Bottmingen, CH	Inkubationsschüttler AJ112/110
Insightful Science LLC, CA, USA	SnapGene Viewer
Invitrogen, Darmstadt	Countess® Automated Cell Counter, Countess® Cell counting chamber slides
Isotherm KGW, Karlsruhe	Flüssigstickstoffbehälter
Janke& Kunkel KG, Staufen i. Breisgau	Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO
Julabo, Seelbach	Wasserbad VC 5
Marienfeld, Lauda-Königshofen	Taumel-Rollmischer
Memmert und Co KG, Schwabach	Brutschrank BE500
Microsoft, WA, USA	Office 365 Anwendung
Millipore Co, MA, USA	Immobilon-P PVDF Transfermembran (0,45 µm), Wasseranlage Milli-Q Plus 185
Neolab, Heidelberg	Eisbad 1-6031, magnetische Rührfische Deckgläser, rund ø 25 mm, 0,24 mm und 0,17 mm dick, Taumel Rollmischer
Peqlab, Erlangen	Nanodrop®ND-1000 UV/Vis, PCR-Cycler Primus 96, UV-Tisch ECX-20.L, Fusion SL Vilber Lourmat
Pharmacia Biotech AB, Freiburg	Spannungsgeräte, EPS 200, EPS500/400, EPS 600, EPS 601EPS 3500, Image Master® Gel Dokumentationssystem, MultiTemp II, Ultrospec 3000
Proteom Software Inc, Oregon USA	Scaffold Viewer 4
Sarstedt, Nürnberg	Pipettenspitzen (0,1-5000 µl) Reaktionsgefäße (1,5 ml, 15 ml, 50 ml) 96 well plate (klar/ flach), Transferpipetten
Sartorius, Göttingen	Feinwaagen BP61, BP4100, LA420, ED5201
Schütt, Göttingen	Autoklav, Typ Bioklav
Scientific Industries, NY, USA	Genie2™ Vortex Mixer
Serva GmbH, Dassel	Whatman® FP30/0,2 (0,2 µm)
Systat Software GmbH, Erkrath	SigmaPlot 14.0 Software
Systec GmbH, Wetzlar	Autoklav DX-65
Tecan, Männedorf, CH	Plate Reader Infinite® M200
Th. Geyer GmbH & CO. KG, Renningen	Pasteurpipetten Glas 150 mm

Hersteller	Verbrauchsmaterial/Gerät/Software
Thermo Fisher Scientific, Dreieich	Sterilbank MSC Advantage, Nalgene® Bottle-Top Filtereinheiten (150 ml und 500 ml), HERAcell 150i CO ² Inkubator
Till Photonics, Gräfeling	iMIC Mikroskop, Polychromator V, Live Acquisition Software, Offline Analysis Software Fura-2 Filterset: DCLP410 und LP470 GCaMP Filterset: DCLP490 und LP515
Waters-Millipore, Milford USA	Milliporewasseranalge Milli-Q
Wenzel Glaserei, München	Glasplatten
Werkstatt Medizinische Biochemie, Homburg	Elektrophoresekammern, Plexiglasröhren
WTW, Welheim	pH-Meter pH537
Zeiss, Jena	Binokular Axiolab; Fluar 20x/0,75 M27 Objektiv, Durchlichtmikroskop, Fluar 100x/0,75 M27 Öl-Objektiv
Ziegra, Isernhagen	Eismaschine

5.1.2. Chemikalien, Enzyme und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits sind in der nachfolgenden Tab. 3 aufgeführt. Die Zusammensetzung einzelner Lösungen und Puffer werden in den Abschnitten der jeweiligen Experimente beschrieben.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits mit Zuordnung zum Hersteller.

Hersteller	Artikel
AnaSpec Inc, CA, USA	SensoLyte 520 Renin Assay Kit
Applied Biosystems, Darmstadt	TaqMan Gene Expression Assays
Biofroxx, Einhausen	CrossFroxx Hintergrundminimierer, BSA Blockierungslösung
Bio-Rad, CA, USA	Bradford Reagenz
Biotium, Fermont, Can	GelRed Nucleic Acid Stain
Biospec Products, Bartlesville, OK, USA	Glasbeads 0,5 mm
Calbiochem – Merck, Darmstadt	Digitonin; Taurodeoxycholic acid (TUDCA), CHAPS
Carl Roth, Karlsruhe	Lysogeny Broth (LB) Agar, LB Medium, MOPS, Terrific Broth (TB) Medium, Magermilchpulver Blotting Grade, Agar-Agar, Super Optimal Broth (SOB) Medium, Agarose, Natriumhydroxid, Brilliant Blau G250, Brilliant Blau R250, HEPES, Trichloressigsäure (TCA), Glucose, Ethylenglycol-bis(aminothylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), Parafilm (H66.1), Albumin Fraktin V (BSA)
Eurofines MWG, Ebersberg	DNA Oligonukleotide
GE Healthcare Life Sciences, UT, USA	HyClone DMEM/F-12(1:1)
Invitrogen, Darmstadt	Trypan Blue Solution (0,4 %), Thapsigargin, Ionomycin, Fura-2 AM
LC Laboratories, MA, USA	Cyclosporin A
Merck, Darmstadt	Dinatriumhydrogenphosphat, Glycerin, Glycin, Kaliumchlorid, Natriumazid, Magnesiumacetat,

Hersteller	Artikel
	Natriumdihydrogenphosphat, Tunicamycin, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumchlorid, Natriumacetat, Salzsäure
MP Biomedicals, Illkirch, FRA	Trypsininhibitor
New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.	Alkaline Phosphatase
Perkin-Elmer, Boston, MA, USA	[³⁵ S]-Methionin (1000 Ci/mMol)
Pharmacia, Stockholm, SWE	Gemma Bind [®] G Sepharose, Protein A Sepharose [™] 4 Fast Flow
Promega Biotec, WI, USA	FuGENE [®] HD, DNA Purification Kit, SP6-Polymerase, T7-Polymerase, RNasin [®] , Rabbit Reticulocyte Lysate system (Nuclease treated L4960), TNT [®] T7 coupled Rabbit Reticulocyte Lysate L4600, NanoBiT [™] PPI MCS Starter System, PureYield [™] Plasmid Miniprep System
Qiagen, Hilden	HiPerFect [®] Transfektionsreagenz, siRNA Oligonukleotide, QIAquick PCR Purification Kit, DNeasy [®] Blood & Tissue Kit, Plasmid Midi Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, RNeasy [®] Mini Kit
Riedel de Haën, Hannover	Kaliumacetat, 2-Propanol
Roche, Mannheim	Nuklease S7, Trypsin, RNase A, DNase I, Nonidet P 40, DTT, Phosphoenol-pyruvate
Serva, Heidelberg	40 % Acrylamid, 2-Acrylamido-2-methylpropansulfonsäure (AMPS), Bromphenolblau, Calciumchlorid, TritonX-100, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), N, N'-Methylene-bisacrylamid 2x, Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)
Sigma-Aldrich, Steinheim	Ampicillin, β-Mercaptoethanol, Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Glucose, Dimethylsulfoxid (DMSO), Kanamycin, PepstatinA, Leupeptin, Antipain, Chymostatin, Natriumphanylbutyrate (4-PBA), Puromycin, Fetal Bovine Serum (F7542 Lot: BCCB3111), Fetal Bovine Serum (F7524 Lot 012M3397), Eeyarestatin I, Pyruvate Kinase/Lactic Dehydrogenase, Forskolin, ANTI-FLAG [®] M2 Affinity Gel, Tween 20
Thermo Fisher Scientific, Dreieich	0,05 % Trypsin-EDTA (1x), Gibco [®] DMEM + GlutaMAX [™] -I, 1x PBS, Opti-MEM [™] , Opti-MEM [™] ohne Phenolrot, Penicillin/Streptomycin, Generuler 50 bp/ 1 kb DNA Ladder, PAGERuler [™] Prestained Protein Ladder, Pfu-Polymerase, Geneticin, SuperSignal [™] West Pico PLUS, SuperScript [®] VILO [™]
Universität des Saarlandes; AG Jung	NYT
VWR International, Belgien	Calciumchlorid
Zeiss, Jena	Immersionsöl
Zentrales Chemikalienlager, Saarbrücken	Ethanol, Methanol, Essigsäure, Aceton

5.1.3. Antikörper

5.1.3.1. Primäre Antikörper

Zum Großteil wurden die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper hausintern hergestellt. Verantwortlich hierfür ist die Gruppe um Apl. Prof. Dr. Martin Jung (Universität des Saarlandes; Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie). Die Arbeitsschritte der Sequenzauswahl, Peptidgenerierung und –aufreinigung, der Immunisierung und regelmäßigen Blutentnahme der Kaninchen wurden von dieser Arbeitsgruppe durchgeführt.

In Tab. 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper genannt. Falls diese kommerziell erworben wurden, ist anstelle des verwendeten Blutes die Artikelnummer aufgeführt. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Verwendung zur immunologischen Detektion auf PVDF Membranen (Kap. 5.2.4) und erfolgten im Regelfall in TBS mit 2 % (w/v) BSA, im Falle ineffizienterer Antikörper in einem Hintergrund minimierenden Crossfrox-Puffer.

Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper.

Antikörper	Interne Kennung	Charakteristik	Ursprung/ Herkunft	Blut/ Nr.	Verdünnung
α -ASNA1	1233	Polyklonaler Peptidantikörper gegen eine zytosolische Komponente des GET Transportweges.	Kaninchen/ UdS	5	1/300
α -BiP	950	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das luminale ER Chaperon BiP/GRP78.	Kaninchen/ UdS	5	1/1000
α -CAML	1419b	Polyklonaler Peptidantikörper gegen eine ER membranständige Komponente des GET Transportweges.	Kaninchen/ UdS	7	1/500
α -FLAG	1341	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den artifiziellen DDK-tag.	Kaninchen/ UdS	2	1/1000
α -FLAG	α -FLAG	Monoklonaler Peptidantikörper gegen den artifiziellen DDK-tag.	Maus/ OriGene	TA5001 1-1	1/1000
α -GRP170	ABP150	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus des	Kaninchen/ UdS	Endblut	1/500

Antikörper	Interne Kennung	Charakteristik	Ursprung/ Herkunft	Blut/ Nr.	Verdünnung
		luminalen ER Chaperon GRP170.			
α -GRP94	GRP94	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das ER-luminale Grp94 Chaperon.	Kaninchen/ UdS	2	1/500
α -GST	α -GST	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den artifiziellen GST-tag.	Kaninchen/ UdS	Reinigung 2017	1/1000
α -hSnd2	1402	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das ER membranständige hSnd2 (C-term.).	Kaninchen/ UdS	14	1/250
α -LG	α -LgBiT	Antikörper zur Detektion des artifiziellen Large-BiT-tag von NanoBit-Konstrukten	Promega	N7100	1/1000
α -ORAI-1	α -ORAI-1	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das Plasmamembranprotein ORAI-1.	Kaninchen/ Sigma	O8264	1/500
α -Sec61 α 1	α -Sec61 α 1	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den C-Terminus der alpha Untereinheit des Sec61 Komplexes.	Kaninchen/ Göttingen		1/500
α -Sec61 β	Nast 179b	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der beta Untereinheit des Sec61 Komplexes.	Kaninchen/ UdS	15	1/300
α -Sec62	Nast 262b	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das ER membranständige Sec62.	Kaninchen/ UdS	20	1/250
α -Sec63	Δ N380	Polyklonaler Proteinantikörper gegen das ER membranständige Sec63.	Kaninchen/ UdS	3	1/500

Antikörper	Interne Kennung	Charakteristik	Ursprung/ Herkunft	Blut/ Nr.	Verdünnung
α -SERCA2	α -SERCA2	Monoklonaler Peptidantikörper gegen die zweite Untereinheit der ER membranständigen Calciumpumpe SERCA.	Maus/ Sigma	S1439	1/1000
α -SM	1736	Polyklonaler Peptidantikörper zur Detektion des artifiziellen Small-BiT-tags von NanoBiT-Konstrukten.	Kaninchen/ UdS	1736	1/300
α -SR α	NAST 178	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das membranassoziierte SR α .	Kaninchen/ UdS	10	1/250
α -SR β	NAST 510	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das membranständige SR β .	Kaninchen/ UdS	10	1/500
α -STIM1	α -STIM1	Monoklonaler Peptidantikörper gegen das ER membranständige Stim1.	Maus/ Proteintech	11565-1-1AP	1/1000
α -TMEM109	1620	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das ER membranständige TMEM109 (C-term.).	Kaninchen/ UdS	7	1/500
α -TMEM109	α -TMEM109	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das ER membranständige TMEM109.	Kaninchen/ Sigma	HPA01 1785	1/1000
α -TRAP α	1342	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den C-Terminus der α Untereinheit des ER membranständigen TRAP-Komplexes.	Kaninchen/ UdS	5	1/500
α -TRAP β	302	Polyklonaler Peptidantikörper gegen den N-Terminus der β Untereinheit des ER membranständigen TRAP-Komplexes.	Kaninchen/ UdS	4	1/500

Antikörper	Interne Kennung	Charakteristik	Ursprung/ Herkunft	Blut/ Nr.	Verdünnung
α -Ubiquilin 2	α -Ubiquilin 2	Monoklonaler Peptidantikörper gegen das zytoplasmatische Ubiquilin2 Protein.	Maus /Sigma	WH002 9978M3	1/1000
α - β -Actin	α - β -Actin	Monoklonaler Peptidantikörper gegen das als Ladekontrolle verwendete ubiquitär vorkommende β -Actin.	Maus/ Sigma	A5441	1/10000
α - β -Actin	1485	Polyklonaler Peptidantikörper gegen das als Ladekontrolle verwendete ubiquitär vorkommende β -Actin.	Kaninchen/ UdS	9	1/20000

5.1.3.2. Sekundäre Antikörper

Durch die Verwendung von sekundären Antikörpern, die an die jeweiligen primären Antikörper aus Maus oder Kaninchen binden, welche zur Erkennung eines Antigens auf der PVDF Membran dienten, wurden ebendiese visualisiert. Solange diese Detektion in einem linearen Bereich erfolgte, war eine densitometrische Auswertung und Quantifizierung dieser Signale möglich, um Proteinmengen auf der Membran zu bestimmen (Kap. 5.2.4; 5.2.12). Standardmäßig wurden die ECL™ Plex Antikörper verwendet, bei weniger effizienten Antikörpern oder geringen Proteinmengen wurde auf die Meerrettich-Peroxidase basierte Version zurückgegriffen. Die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper sind in der Tab. 5 aufgeführt

Tab. 5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Markierung	Ursprung/Herkunft	Artikelnummer	Verdünnung
α -Kaninchen-IgG	ECL™ Plex Cy5	Ziege/ GE Healthcare	PA45011	1/1000
α -Kaninchen-IgG	Meerrettich-Peroxidase	Ziege/ Sigma	A8275	1/1000
α -Maus-IgG	ECL™ Plex Cy3	Ziege/ Sigma	C2181	1/2500
α -Maus-IgG	Meerrettich Peroxidase	Ziege/Sigma	A9044	1/1000

5.1.4. Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Apl. Prof. Dr. Martin Jung und seinem Team an der Universität des Saarlandes in Homburg generiert. Diese wurden zum einen von

besagter Arbeitsgruppe genutzt, um Antikörper in Kaninchen zu generieren, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Zum anderen wurden die Peptide direkt im NanoBiT-System oder der Co-IP eingesetzt (Kap. 6.1.9). In der nachfolgenden Tab. 6 sind diese Peptide zusammen mit deren Peptidsequenz, Länge und Molekulargewicht aufgeführt. Gelöst wurden die Peptide in DMSO mit einer Stockkonzentration von 20 mM.

Tab. 6: Auflistung der direkt in der Arbeit verwendeten Peptide.

Peptid-Nr.	Peptidname	Sequenz	Länge	MW [g/mol]
1543	FLAG	DYKDDDDK	8	1013
1485	β -Actin	DDDIAALVVDNGSGM	15	1492
1736	SmBiT	CVTGYRLFEEIL	12	1443
1763	scr SmBiT	ERGTCLELYVIF	12	1443
1788	High affinity NanoBiT(HaBiT) Pep.	VSGWRLFKKIS	11	1321

5.1.5. DNA-Oligonukleotide (Primer)

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Hierbei handelte es sich um Sequenzen, die aus wenigen Nukleotiden aufgebaut waren und in Versuchen zur Detektion oder Manipulation von Nukleinsäuresequenzen Anwendung fanden.

Die folgende Tab. 7 zeigt die für die *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) verwendeten Primer der Firma ThermoFisher Scientific. Diese wurden zum gezielten Nachweis von mRNA einzelner Proteine eingesetzt.

Tab. 7: Liste der für die qRT-PCR-Versuche verwendeten DNA Oligonukleotide.

Gen	Nr.	Beschreibung
<i>ACTB</i>	Hs00357333_g1	Primer für die qRT-PCR von <i>ACTB</i> (β -Actin) als Kontrolle
<i>ATP2A2</i>	Hs00544877_m1	Primer für die qRT-PCR von <i>ATP2A2</i> (SERCA2)
<i>SEC61B</i>	Hs00273698_m1	Primer für die qRT-PCR von <i>SEC61B</i> (Sec61 β)
<i>SRPRA</i>	Hs01112418_g1	Primer für die qRT-PCR von <i>SRPRA</i> (SR α)
<i>SRPRB</i>	Hs00253639_m1	Primer für die qRT-PCR von <i>SRPRB</i> (SR β)

DNA Oligonukleotide die zur Mutagenese (Kap. 5.4.8) oder Sequenzierung (Kap. 5.4.12) verwendet wurden, sind in Tab. 8 aufgeführt. Diese Oligonukleotide wurden individuell für die spezifischen Versuche konstruiert und bei Eurofins Genomics Germany GmbH erstanden. Spalte O. (Orientierung) gibt die Richtung des bindenden Primers an, wobei + für einen forward Primer (5'→3') und - für einen reverse Primer (3'→5') steht. Die Sequenz ist immer in der standardmäßigen Leserichtung von 5'→3' angegeben.

Tab. 8: Liste der für die Sequenzierung und zur Mutagenese eingesetzten Primer. Diese wurden sowohl zur Generierung und Identifizierung von Mutationen in Plasmide und zum Nachweis von

integrierten Gensequenzen in genomischer DNA genutzt. Mit * gekennzeichnete Primer wurden verwendet, um PCR Produkte mit spezifischen Schnittstellen zu amplifizieren, die zur Generierung von Nanobit-Plasmiden dienen. Die intern genutzte Kennung RZ vor der Primer-ID wird nicht aufgeführt.

Primer ID/ Name	Target / Gen	O.	Sequenz (5'→3')	Verwendet für
686	<i>SEC61A</i> 1	+	GGCAATCAAATTTCTGGAAG	Amplifikation und Sequenzierung
747	T7 Primer	+	TAATACGACTCACTATAGG	Amplifikation und Sequenzierung
748	FLAG rev.	-	CTTGTCGTCATCGTCTTTGTA GTC	Amplifikation und Sequenzierung
749	<i>SEC61A</i> 1	-	CTCGGAAGCCCTGGAAATAG	Sequenzierung von transgenem <i>SEC61A1</i>
751	<i>SEC61A</i> 1	+	GAAACCATCGTATGGAAGG	Sequenzierung von <i>SEC61A1</i> Konstrukten
*752	<i>TMEM1</i> 09	-	GAGGGCCACGAGCTCTCTCC TCCTCCACAC	Insertion Sac1 Schnittstelle; C-Terminus
*753	<i>TMEM2</i> 08	-	TCCCGGTGCTCGAGTATAAC CGCTTCATCTG	Insertion Xho1 Schnittstelle; C Terminus
*754	<i>TMEM2</i> 08	+	GTGGCCCTCGAATTCGAGGA GATCTGCCG	Insertion EcoR1 Schnittstelle; N Terminus
*755	<i>TMEM2</i> 08	-	AGGGCCACTCTAGATTATAAC CGCTTCATC	Insertion Xba1 Schnittstelle; C-Terminus
758	/	+	GCATATTAAGGTGACGCGTG	Sequenzierprimer für Nanobit-Plasmide

759	/	-	CCTCCCCCTGAACCTGAAAC	Sequenzierprimer für Nanobit-Plasmide
760	<i>TMEM109</i>	+	GTGGAGGAGGAGTAACGTAC GCGGCCG	QC zur Entfernung des C-terminalen FLAG-tags
761	<i>TMEM109</i>	-	CGGCCGCGTACGTTACTCCT CCTCCAC	QC zur Entfernung des C-terminalen FLAG-tags
*772	<i>SSR1</i>	-	GGGCCACGAGCTCCCTCATC AGATCCCAC	Insertion Sac1 Schnittstelle; C-Terminus
*773	<i>SSR2</i>	-	GGGCCACGAGCTCCGTTCTT CTTCGTTTTG	Insertion Sac1 Schnittstelle; C-Terminus
*780	<i>SEC61A1</i>	+	AAGTGGCTAGCATGGCAATC AAATTTTC	Insertion Nhe1 Schnittstelle; N-Terminus
*781	<i>SEC61A1</i>	-	CCGTCTCGAGGTGAAGAGCA GGGCC	Insertion Xho1 Schnittstelle; C-Terminus
*782	<i>SEC61A1</i>	+	AGCGCTCGAGGATGGCAATC AAATTTTC	Insertion Xho1 Schnittstelle; N-Terminus
*783	<i>SEC61A1</i>	-	GCCGCTAGCTCAGAAGAGCA GGGCC	Insertion Nhe1 Schnittstelle; C-Terminus
*789	<i>SEC63</i>	+	GCCGGCTAGCATGGCCGGG CAG	Insertion Nhe1 Schnittstelle; C-Terminus
*790	<i>SEC63</i>	-	CCGCTCGAGCCGTCATCATC TTC	Insertion Xho1 Schnittstelle; C-Terminus
*791	<i>SEC63</i>	+	CGCCTCGAGCATGGCCGGG CAG	Insertion Xho1 Schnittstelle; N-Terminus

*792	SEC63	-	GCGGCTAGCTTAGTCATCAT C	Insertion Nhe1 Schnittstelle; N-Terminus
*798	SEC61A 1	-	CCGTGAATTCGTGAAGAGCA GGGCC	Insertion EcoR1 Schnittstelle; C-Terminus
*807	SEC61B	-	CGTCGAATTCCTCGAACGAG TGACTTGC	Insertion EcoR1 Schnittstelle; C-Terminus
*808	SEC61B	+	AGGAGAATTCGATGCCTGGT CCGACCCCA	Insertion EcoR1 Schnittstelle; N-Terminus
*809	SEC61B	-	CTCAGATCTTTACGAACGAGT GTACTION	Insertion Bgl2 Schnittstelle; N-Terminus

5.1.6. Plasmide

In der nachfolgenden Tab. 9 sind die Plasmide aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Anwendung bezog sich entweder auf *in vitro* Experimente, zur Generierung von Transportsubstraten (Kap. 5.3.2), oder in der Zellkultur, zur gezielten Expression von Plasmid-DNA in verschiedenen Experimenttypen (Kap. 5.5.3). Wenn nicht anders gekennzeichnet ist die humane Form des Proteins im Plasmid codiert.

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Plasmide für *in vitro* und *in cellula* Versuche. Die verwendeten Antibiotika zur Selektionierung waren Ampicillin (Amp.) und Kanamycin (Kan.). UdS = Universität des Saarlandes.

Name	Beschreibung	Resistenz	Herkunft	Besonderheit
ER-GCamp ₆₋₁₅₀	Calcium-Sensor im ER Lumen	Kan.	Addgene #86918 A. Cavalié; T. Ryan	/
N205	TMEM109-C _L	Kan.	UdS, diese Arbeit	TMEM109 Protein am C-Terminus mit dem LgBiT versehen
N206	TMEM109-C _S	Kan.	“	TMEM109 Protein am C-Terminus mit dem SmBiT versehen
N207	hSnd2-C _L	Kan.	“	hSnd2 Protein am C-Terminus mit dem LgBiT versehen
N208	hSnd2-C _S	Amp.	“	hSnd2 Protein am C-Terminus mit

Name	Beschreibung	Resistenz	Herkunft	Besonderheit
				dem SmBiT versehen
N209	hSnd2-N _L	Amp.	“	hSnd2 Protein am N-Terminus mit dem LgBiT versehen
N210	hSnd2-N _S	Amp.	“	hSnd2 Protein am N-Terminus mit dem SmBiT versehen
N211	TRAP α -C _L (mus musculus)	Amp.	“	TRAP α Protein am C-Terminus mit dem LgBiT versehen
N212	TRAP α -C _S (mus musculus)	Amp.	“	TRAP α Protein am C-Terminus mit dem SmBiT versehen
N213	TRAP β -C _L	Amp.	“	TRAP β Protein am C-Terminus mit dem LgBiT versehen
N214	TRAP β -C _S	Amp.	“	TRAP β Protein am C-Terminus mit dem SmBiT versehen
N215	Sec61 α -C _L	Amp.	“	Sec61 α Protein am C-Terminus mit dem LgBiT versehen
N216	Sec61 α -C _S	Amp.	“	Sec61 α Protein am C-Terminus mit dem SmBiT versehen
N217	Sec61 α -N _L	Amp.	“	Sec61 α Protein am N-Terminus mit dem LgBiT versehen
N218	Sec61 α -N _S	Amp.	“	Sec61 α Protein am N-Terminus mit dem SmBiT versehen
N224	Sec63-C _S	Amp.	“	Sec63 Protein am C-Terminus mit dem SmBiT versehen
N226	Sec63-N _S	Amp.	“	Sec63 Protein am N-Terminus mit dem SmBiT versehen
N227	Sec61 β -C _L	Amp.	“	Sec61 β Protein am C-Terminus mit dem LgBiT versehen

Name	Beschreibung	Resistenz	Herkunft	Besonderheit
N230	Sec61 β -N _s	Amp.	“	Sec61 β Protein am N-Terminus mit dem SmBiT versehen
NanoBit N202	rPKA-C _L	Kan.	Promega #N2014	regulatorische Untereinheit Proteinkinase A, (Positivkontrolle LgBiT)
NanoBit N203	cPKA-C _s	Kan.	Promega #N2014	Katalytische Untereinheit Proteinkinase A, (Positivkontrolle SmBiT)
NanoBit N204	Halo-C _s	Kan.	Promega #N2014	Halo-tag (Negativkontrolle SmBiT)
pCMV6-AC-IRES-GFP	Leervektor	Amp.	OriGene PS100027	/
pCMV6-AC-SEC61A1-IRES-GFP	Sec61 α 1	Amp.	Uni Freiburg, D. Schubert	/
pCMV6-Entry	Leervektor	Kan.	OriGene PS100001	/
pCMV6-Entry- <i>HSND2</i>	hSnd2	Kan.	UdS, M. Lerner	/
pCMV6-Entry- <i>HSND2-S150N</i>	hSnd2-S150N	Kan	UdS, M. Lerner	S150N Mutation
pCMV6-Entry- <i>HSND2-Myc-DDK</i>	hSnd2-FLAG	Kan.	OriGene RC200049	C-terminaler FLAG-tag
pCMV6-Entry-Sec61 β	Sec61 β	Amp	OriGene RC200247	C-terminaler FLAG-tag
pCMV6-Entry- <i>SSR1-FLAG</i>	TRAP α -FLAG (mus musculus)	Kan.	OriGene MR203901	FLAG-tag am C-Terminus
pCMV6-Entry- <i>SSR2-FLAG</i>	TRAP β -FLAG	Kan.	OriGene RC213580	FLAG-tag am C-Terminus
pCMV6-Entry- <i>SSR3-FLAG</i>	TRAP γ -FLAG	Kan.	OriGene RC201079	FLAG-tag am C-Terminus
pCMV6-Entry- <i>TMCO1-Myc-DDK</i>	TMCO1-FLAG (mus musculus)	Kan.	OriGene MR201773	C-terminaler FLAG-tag Maus-Version
pCMV6-Entry-TMEM109	Tmem109	Kan.	UdS, Diese Arbeit	/
pCMV6-Entry-TMEM109-Myc-DDK	Tmem109-FLAG	Kan.	OriGene PS201707	C-terminaler FLAG-tag
pCDNA5-Sec63	Sec63	Amp	UdS, R. Zimmermann	
<i>S-Reep5-Ops</i>	S-Reep5-Ops	Amp.	UdS, Jun-Prof. B. Schrul	S-tag am N Terminus und Opsin-tag am C Terminus

5.1.7. Raue Mikrosomen

Raue Mikrosomen (RM) sind membranumschlossene Vesikel, die das endoplasmatische Retikulum in einer isolierten und aufgereinigten Form darstellen. Gewonnen wurden diese durch Apl. Prof. Dr. Martin Jung (UdS) aus Hundepankreas nach einer etablierten Methode, die die Mikrosomen in einem funktionellen und transportkompetenten Zustand erhält (Walter & Blobel 1983). Dies führt dazu, dass zum einen mit diesen Mikrosomen Transportstudien durchgeführt werden können (Watts et al. 1983), zum anderen diese auch als Positivkontrollen für Western Blots verwendet werden können, da hier alle membranständigen und luminalen Proteine des ERs vorhanden sind. Der Vorteil hier liegt darin, dass diese ER-Membran oder luminalen Proteine in einer deutlich höheren Konzentration vorliegen und die Anzahl an Kreuzreaktionen mit den Antikörpern verringert ist, was dazu führt, dass RMs eine valide Kontrolle zur Funktionalität des Assays darstellen und eine Identifizierung des entsprechenden Proteinsignals im Western Blot ermöglichen.

5.1.8. Bakterien

In der Arbeit wurden verschiedene Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet. Diese wurden verwendet zur:

1. Amplifikation von Plasmiden, die in der Zellkultur verwendet wurden. Stamm DH5 α mit dem Genotyp:
F⁻, ϕ 80d/lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk-, mk+), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*.
2. Amplifikation von Plasmiden, die zur Synthese von *in vitro* Transportsubstraten, sowie neu generierter Plasmide nach Mutagenese genutzt wurden. Stamm JM101 mit dem Genotyp:
supE thi-1 Δ (lac-proAB)[F' traD36 proAB lacIqZ Δ M15]
3. Amplifikation von Plasmiden oder PCR-Produkten die nicht geeignet waren für die erstgenannten Stämme. Der verwendete XL1-Blue Stamm gilt als superkompetent und hat den Genotyp:
((*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]); (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

5.1.9. Zelllinien

In der Arbeit, wurden zwei Zelllinien verwendet, spezifisch für das jeweilige Teilprojekt. Diese wurden kommerziell erstanden, oder von Kollaborationspartnern zu Verfügung gestellt.

5.1.9.1. HeLa-Zellen

Zum Studium des hSnd2-Proteins und dessen Interaktionspartnern im SND-Transportweg, wurde die humane Epithelzelllinie HeLa verwendet. Diese immortalisierte Zelllinie, die seit der

Mitte des letzten Jahrhunderts in zahllosen wissenschaftlichen Studien verwendet wurde und wird und zur Entdeckung medizinischer Meilensteine beitrug, wurde aus einem Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks (HeLa) entnommen (Skloot 2010). Charakteristisch für die hier verwendete Krebszelllinie (ATCC, Nr. CCL-2™) ist der hypertriploide Status der Zellen (3n+) mit einer unterschiedlichen Gesamtanzahl an Chromosomen je Zelle (76-80) (Landry et al. 2013). Während der andauernden Kultivierung zeigten die Zellen eine genetische Stabilität, wodurch die HeLa-Zellen ein geeignetes Modell in der Zellkultur sind (Macville et al. 1999). Die Zellen wurden in dieser Arbeit sowohl für die plasmidgetriebene Überexpression von Proteinen, die siRNA vermittelte Stilllegung von Proteinen als auch Proteininteraktionsstudien verwendet. Hierbei muss trotz der bahnbrechenden Erfolge dieser Zelllinie immer bedacht werden, dass es sich um entartete Zellen handelt und eine direkte Übertragung auf das „gesunde“ humane System nicht eins zu eins möglich sein muss.

Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in Gibco® DMEM+ GlutaMAX™-I Medium, das mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde. Standardmäßig wurden die Zellen in einer 75 cm² Flasche in 14 ml Medium kultiviert und in regelmäßigen Abständen geteilt, wodurch ein stetiges Wachstum ermöglicht wurde. Abweichungen sind in den jeweiligen Beschreibungen der Experimenten vermerkt.

5.1.9.2. HEK293-Zellen

Für die Untersuchung der ADTKD assoziierten *SEC61A1* Mutationen wurden HEK293-Zellen (im weiteren als HEK-Zellen bezeichnet) verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney*) die mit DNA des Adenovirus Typ 5 transfiziert wurden (Graham et al. 1977). Um welches nierenspezifische Gewebe es sich bei den Zellen handelt und ob diese immortalisierten Zellen bereits den Krebszellen zuzuordnen sind, wird in der Literatur weiterhin diskutiert (Kavsan et al. 2011; Stepanenko & Dmitrenko 2015). Zur Verfügung gestellt wurden diese spezifischen HEK-Zellen freundlicherweise von Stanislav Knoch und Martina Živná (Charles University, Prag). Erstellt wurden die Zellen, durch eine Plasmidtransfektion, mit der Folge dass heterolog ein FLAG markiertes Sec61α exprimiert wird. Die Zellen wurden mittels PCR, Sequenzierung und Western Blot verifiziert (Kap. 6.2.1 und 6.2.2.). Die Entscheidung zur Nutzung dieser Zellen war darin begründet, dass die HEK-Zellen in direktem Bezug zu dem in ADTKD-Patienten am stärksten betroffenen Organ, der Niere, stehen. Ein weiterer Grund war es, dass die von der Prager Arbeitsgruppe generierten Zellen, die entsprechenden Mutationen des Sec61α permanent neben der endogenen, gesunden, Version exprimieren. Diese künstlich eingebrachte Variante war durch einen FLAG-tag am C-Terminus des Proteins vom endogenen Sec61α unterscheidbar. Eine transiente Transfektion war daher nicht erforderlich.

Dadurch wurde in der Zellkultur der heterozygote Phänotyp der Patienten möglichst genau nachgeahmt, um die biochemischen Grundlagen dieser Erkrankung zu charakterisieren.

Anders als die verwendeten HeLa-Zellen, wurden die HeK-Zellen mit einem Antibiotikum kultiviert, um einen Selektionsdruck zugunsten der transgenen Zellen zu erzeugen und so den Ausschluss der eingebrachten Mutationen zu verhindern. Hierfür wurden 0,8 mg/ml des Antibiotikums Geneticin (G-418) verwendet, welches die Proteinbiosynthese hemmt (Davies & Jimenez 1980). Zusätzlich wurde dem Hyclone DMEM/F-12 Medium 10 % (v/v) FCS zugegeben. Die Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, in 25 cm² Flaschen in 5 ml Medium kultiviert und in regelmäßigen Abständen verdünnt.

5.2. Methoden der Proteinbiochemie

Methoden, die zu biochemischen Analysen in dieser Arbeit genutzt wurden, werden in dem nachfolgenden Kapitel beschrieben. Dem Bedarf entsprechende Optimierungen der Standardmethoden sind vermerkt.

5.2.1. Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford-Assay)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde der Bradford-Assay angewendet. Hierbei wurde sich das Prinzip der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 zu Nutze gemacht, was aus der Bindung des Farbstoffs an die basischen und aromatischen Aminosäurereste resultiert (Bradford 1976). Im ungebundenen Zustand liegt dessen Maximum bei 495 nm, wenn Proteine und damit die besagten Aminosäurereste in der Lösung vorliegen, verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum zu 595 nm. Diese Farbreaktion kann mit bloßem Auge beobachtet werden und mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrometers ebenfalls im 96 *well* Maßstab mit einem hohen Durchsatz quantifiziert werden. Standardmäßig wurden zur Bestimmung der Kalibriergeraden als auch in der Konzentration unbekannte Proben in Triplikaten vermessen. Die Kalibriergerade wurde aus Proben mit einer definierten Konzentration von BSA (0-3 mg/ml in KHM) erstellt. Zur Vorbereitung wurde eine Lösung aus 25 % Bradford Reagenz und 75 % H₂O_{bidest} erstellt, von der jeweils 200 µl in jedes *well* vorgelegt wurde. Hinzugefügt wurden 3 µl der definierten BSA Lösungen oder der Proben mit unbekannter Proteinkonzentration. Die Reaktion wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 595 nm vermessen. Hierbei ist die Absorption bei 595 nm direkt proportional zu der enthaltenen Proteinmenge. Die Absorption wurde im Verhältnis zur Proteinkonzentration in einem Diagramm aufgetragen. Die daraus resultierende Geradengleichung ermöglicht es, die gemessenen Absorptionen der jeweiligen Proben in die Proteinkonzentration umzurechnen. Verwendet wurde diese Methode nach der Präparation von semi-permeabilisierten Zellen, (Kap. 5.5.5) um für darauffolgende Experimente, wie SDS-PAGE (Kap. 5.2.2) oder *in vitro* Transporte (Kap. 5.3), gleichwertige Proteinmengen einzusetzen.

KHM

CH ₃ CO ₂ K	110 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	2 mM
HEPES/KOH; pH 7,2	20 mM
In H ₂ O	bidest

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

Um einzelne Protein aus Zellysaten bzw. Proteingemischen oder *in vitro* Transportexperimenten identifizieren und darstellen zu können, wurde die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei wurde zur Auftrennung der Proteine eine Gelmatrix aus Polyacrylamid genutzt, welche die Laufstrecke der Proteine beeinflusste. Für Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht wurden Gele mit höherer Polyacrylamidkonzentration genutzt als für Proteine mit einem höheren Molekulargewicht, da ein geringes Molekulargewicht eine schnellere Wanderung durch das Gel erlaubt als ein hohes Molekulargewicht. Die Laufeigenschaft der Proteine ist jedoch nur indirekt von deren Größe abhängig. Da es sich hierbei um eine Elektrophorese handelt, also einer spannungsabhängigen Auftrennung des Proteingemisches, musste die Eigenladung der Proteine vereinheitlicht werden. Dies erfolgt unabhängig von vorangegangenen Experimenten Mithilfe des Laemmli-Puffers (Laemmli 1970). Dieser bewirkt eine Denaturierung der Proteine in mehrfacher Form. Zum einen wurden Disulfidbrücken innerhalb des Proteins durch die reduzierende Eigenschaft des enthaltenen β -Mercaptoethanol aufgebrochen. Zusätzlich wurden noch bestehende Tertiär- oder Quartärstrukturen aufgelöst durch ein Erhitzen der Probe für 10 min bei mindestens 56 °C. Das anionische Detergens SDS unterstützte ebenfalls die Denaturierung, der im Vordergrund stehende Effekt war jedoch, dass es eine Ladungsänderung des Proteins bewirkte. Durch die Interaktion der hydrophoben Alkylketten des SDS mit den, im denaturierten Zustand vollständig exponierten, hydrophoben Aminosäurereste, wurde die Nettoladung des Polypeptid-SDS-Komplexes negativ und die Eigenladung des Polypeptids maskiert (Weber & Osborn 1969). Erfahrungsgemäß reagieren etwa 1,4 g SDS mit 1 g Protein, wodurch schlussendlich für alle Proteine ein gleichmäßiges Masse-zu-Ladung Verhältnis entstand (Smith 1984). Dadurch entsprach die Ladung dem Molekulargewicht und die Proteine konnten der Größe nach aufgetrennt werden, wobei kleinere Proteine im selben Zeitintervall weiter durch die Gelmatrix zur Kathode wanderten als große Proteine.

Die in dieser Arbeit genutzten SDS-PAGE Gele wurden diskontinuierlich gegossen. Dies bedeutet, dass auf das Trenngel, welches zur Auftrennung der Proteine dient, ein Sammelgel gegossen wurde. Dadurch wurde eine Verdichtung, und damit Fokussierung, der Proben am Übergang zwischen diesen beiden Gelen erreicht, was im weiteren Verlauf zu eindeutigeren Banden führte. Die Gele wurden je nach benötigter Bedingung in verschiedenen

Konzentrationen angefertigt und wurden bei 4 °C gelagert. Gegossen wurden die Gele in einen Hohlraum zwischen zwei Glasplatten (14 x 11 cm), wobei der Hohlraum durch 0,1 cm dicke Abstandhalter erzeugt wurde, die links und rechts zwischen den Glasplatten platziert wurden. Der untere Teil der Glasplatten wurde in einem Standfuß mit 2 % Agarose abgedichtet. Die Komponenten des Gels wurden nach Tab. 10 kombiniert. Zu Beginn wurde das Trenngel vorbereitet, das Sammelgel nach der Polymerisation des Trenngels auf ebenjenes aufgegossen. Hierbei wurde vor der Polymerisation des Sammelgels in dieses ein Kamm eingesetzt, um später Taschen zur Probenauftragung zu formen. Die Gele wurden in einer vertikalen Elektrophoresekammer fixiert, Anoden- und Kathodenseite mit 1x Elektrophorese-Puffer befüllt, sodass ein Stromfluss durch das Gel hindurch erfolgte. Die Proben wurden durch die Aufnahme in Laemmli-Puffer entweder auf eine definierte Zellzahl oder eine definierte Proteinkonzentration eingestellt und dann in die Taschen des SDS-Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 5 mA oder für 3 h bei 40 mA. Neben den Proben wurde ein Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) aufgetragen, der Proteine mit definiertem Molekulargewicht beinhaltet und so eine größenspezifische Zuordnung der Proben ermöglicht.

Tab. 10: Schema zur Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten gegossen und die Polymerisierung des Gels abgewartet, bevor das Sammelgel darauf aufgegossen wurde. Die Gele konnten für einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

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

Eine Färbung des Proteingemisches, welches durch das Gel aufgetrennt wurde, erfolgte anschließend mittels Coomassie direkt im Gel (Kap. 5.2.3), alternativ wurden die Proteine per Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen (Kap. 5.2.4). Sollten radioaktiv markierte Proteine verwendet worden sein, wurden die Gele getrocknet und durch Phosphorimaging detektiert (Kap. 5.3.3).

1x Laemmli-Puffer

Tris/HCl	60 mM
Glycerin	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

1 x Elektrophorese-Puffer

Glycin	384 mM
Tris	50 mM
SDS	0,1 % (w/v)
In H ₂ O _{bidest}	

In H₂O_{bidest}

5.2.3. Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau

Die Färbung der aufgetrennten Polypeptide direkt im Gel erfolgte mit den Farbstoffen Coomassie-Brilliantblau R-250 und G-250. Hierbei interagieren die Farbstoffe mit den Seitenketten basischer Aminosäuren und färben diese somit blau an, vergleichbar mit der Funktion im Bradford-Assay (Kap. 5.2.1). Genutzt wurde diese Technik vor allem, um die gleichmäßige Konzentration der semi-permeabilisierten Zellen (SPZ) Proben zu kontrollieren, oder nach einer Co-IP die Gesamtheit der aufgereinigten Proteine zu visualisieren. Hierfür wurde das Gel in der Coomassie-Färbelösung für 1 h Stunde schüttelnd inkubiert, darauffolgend für 15 min in Entfärberlösung 1 gewaschen und dann so lange in Entfärberlösung 2 gelagert, bis die Banden deutlich zu erkennen waren und der Hintergrund minimal war. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Während dieses Prozesses wurde die Lösung mehrfach gewechselt. Abschließend konnte das Gel gescannt und ausgewertet werden, da das Verhältnis der Farbintensität einer Bande mit der Konzentration des Proteins proportional ist (Meyer & Lamberts 1965; Neuhoff et al. 1988)

Coomassie Färbung:

Färbelösung

Coomassie-Brilliantblau R250	0,2 % (w/v)
Coomassie Brilliantblau G250	0,005 % (w/v)
Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
	In H ₂ O _{bidest}

Entfärber 2

Methanol	10 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
	In H ₂ O _{bidest}

Entfärber 1

Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
	In H ₂ O _{bidest}

Durch eine geänderte Zusammenstellung der Färbelösung, vor allem durch die Zugabe von Aluminiumsulfat, kann die Sensitivität der Färbung deutlich erhöht werden (Kang et al. 2002). Bei dieser, als kolloidalem Coomassie bezeichneten Färbung, wurden die Proteine im Gel zu Beginn für 30 min mit Hilfe einer Fixierlösung im Gel fixiert, über Nacht mit der Färbelösung eingefärbt und abschließend mit H₂O_{bidest} entfärbt. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass die Färbung der Banden reversibel war, sodass gefärbte Banden ausgeschnitten werden konnten, was beispielsweise eine Analyse einer Gesamtprobe oder einer einzelnen Bande durch Massenspektrometrie ermöglichte.

Kolloidale Coomassie Färbung:

Lösung A

Phosphorsäure	0,255 M
Ammoniumsulfat	0,945 M
	In H ₂ O _{bidest}

Lösung C

Lösung A	98 %
Lösung B	2 %

Lösung B

Coomassie Brilliantblau	5 % (w/v)
	In H ₂ O bidest

Färbelösung

Lösung C	80 %
Ethanol technisch	20 %

Fixierlösung

Ethanol	40 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
	In H ₂ O bidest

5.2.4. Western Blot und immunologische Proteindetektion

Für die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine war eine Übertragung aus der Polyacrylamidmatrix auf eine andere Trägermatrix nötig. Dieser Transfer erfolgte mittels eines Nass-Blot Systems (Trans-Blot™ Cell von Bio-Rad) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran als neue Trägermatrix. Diese Membran eignet sich für verschiedene Färbungen, darunter Immunfärbungen, und ist mechanisch und chemisch stabil (Gültekin & Heermann 1988). Die Übertragung der Proteine wird durch ein Spannungsfeld ermöglicht, wodurch die negativ geladenen Polypeptide aus dem Gel heraustreten und auf die Membran übertragen und dort durch hydrophobe Interaktionen fixiert wurden. Dies erfolgte in wässriger Lösung, weswegen die Membran zu Beginn in Methanol äquilibriert werden musste, um diese für die wässrigen Lösungen zugänglich zu machen. Der Aufbau erfolgte folgendermaßen: Schwammtuch, *Whatmanpaper*, Gel, PVDF-Membran, *Whatmanpaper*, Schwammtuch. Hierbei wurde sichergestellt, dass sowohl Schwammtuch als auch *Whatmanpaper* mit Transfer-Puffer durchtränkt waren und der Aufbau luftblasenfrei erfolgte. So wurde ein gleichmäßiger Stromfluss gewährleistet. Dieses „Sandwich“ wurde in eine Kassette gespannt und in eine gekühlte Blotkammer eingesetzt, die vollständig mit Transfer-Puffer gefüllt wurde. Das Gel war der Kathode zugewandt, die Membran der Anode, da die nach wie vor negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode wandern. Das Blotten erfolgte bei 14 °C und 400 mA für mindestens 2,5 h im Falle kleiner Proteine, bei größeren 3 h oder sogar über Nacht. Die Proteine auf der Membran wurden darauf folgend auf verschiedene Weisen, zum Beispiel wie im nächsten Abschnitt beschrieben durch Antikörper, oder Ponceau S, nachgewiesen.

Transfer-Puffer

Glycin	96 mM
Tris/HCl	12,4 mM
	In H ₂ O bidest

Zur Visualisierung und Quantifizierung von Proteinen, die per SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 5.2.2) und per Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen wurden, wurde die immunologische Detektion genutzt. Die hierbei genutzte Bindung zwischen Protein (Antigen) und Antikörper erfolgte spezifisch und stabil. Die Membran mit den immobilisierten Proteinen

wurde zu Beginn mit einer Blockierlösung, die zu 3 % aus BSA bestand, inkubiert. Dies sorgte dafür, dass alle bisher ungesättigten Flächen der Membran mit unspezifischem Albumin blockiert wurden und reduzierte damit die Menge der Hintergrundsignale. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in der gleichen Lösung allerdings enthielt diese die nach Tab. 4 aufgeführte verdünnte Menge Antikörper und dauerte mindestens 90 min unter dauerhaftem Schütteln. Hierauf folgten jeweils fünfminütige Waschschriffe, im Wechsel mit TBS-, TBS-T und erneut TBS-Puffer. Der Zusatz von Tween im zweiten Waschschriff erhöht die Stringenz dieses Schrittes und reduziert erneut die Menge an Hintergrundsignalen durch die Entfernung von weniger stark interagierenden Verbindungen. Die Verbindung zwischen Polypeptid und dem primären Antikörper wurde sichtbar gemacht durch einen zweiten Antikörper, der gegen den F_c-Terminus des primären Antikörpers gerichtet war, in diesem Fall gegen Hasen- oder Mausantikörper. Der sekundäre Antikörper (Verdünnung siehe Tab. 5) wurde ebenfalls für mindestens 90 min auf die Membran gegeben, die danach erneut nach dem genannten Schema gewaschen wurde. Da es sich um Fluorophor-gekoppelte sekundäre Antikörper handelte, erfolgten die Inkubationsschritte unter Lichtausschluss. Bei der Verwendung von Cyanin (Cy) gekoppelten sekundären Antikörpern wurde die Membran getrocknet und anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzimagings Typhoon Trio™ detektiert. Hierbei wurde der an den sekundären Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff mit der jeweiligen spezifischen Wellenlänge angeregt, detektiert und resultierend daraus die Menge des vorhandenen Proteins semiquantitativ bestimmt.

Bei geringen Proteinmengen oder schwachen Antikörpern konnte auf zwei alternative Methoden zurückgegriffen werden. Die Nutzung von spezialisierter Blockierlösung und Antikörperlösung mit Hintergrundminimierer (BioFroxx) kann in diesem Fall zur verbesserten Quantifizierung führen, wobei das experimentelle Vorgehen identisch ist. Als weitere Alternative wurden POD-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet, die mit Hilfe eines Imagers detektiert wurden, der die Lumineszenz der Peroxidase nach Zugabe von ECL misst. Auch hier sind Vorgehen und Verdünnungen der Antikörper nicht verändert, allerdings wurde der Blot vor der Detektion nicht getrocknet. Die Zusammensetzung der ECL-Lösung war eins zu eins der beiden Stocklösungen.

TBS-Puffer

NaCl 150 mM
Tris/HCl; pH 7,4 10 mM
in H₂O bidest

TBST-Puffer

Tween-20 0,05 % (w/v)
in TBS-Puffer

Blockierlösung

BSA 3 % (w/v)
in TBS-Puffer

Antikörperlösung

spezifischer Antikörper nach Tab. 5
und Tab. 7
in Blockierlösung

5.2.5. Fixieren und Trocknen von SDS PAGE Gelen

Zur Detektion von radioaktiv markierten Transportsubstraten mussten die verwendeten SDS-PAGE Gele nach der Probenauftrennung getrocknet werden. Hierfür wurden die Gele für mindestens 15 min in der Fixierlösung äquilibriert, danach folgte eine Neutralisierung und Entwässerung des Gels über 30 min in einer Lösung mit 50 % Methanol (Neutralisierungslösung). Die Gele wurden auf einem mit Wasser befeuchteten *Whatmanpaper* platziert und auf einen beheizten Trockner (90 °C) gelegt. An diesen wurde eine Vakuumpumpe angeschlossen, wodurch die Flüssigkeit aus den Gelen entfernt wurde. Danach wurden die Gele zur Exposition auf Phosphorimaging Platten platziert und die entsprechenden Kassetten eingespannt (Kap. 5.3.3).

Fixierlösung

Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
	In H ₂ O <i>bideest</i>

Neutralisierungslösung

Methanol	50 % (v/v)
Glycerin	1 % (v/v)
	In H ₂ O <i>bideest</i>

5.2.6. Immunpräzipitationen

Die in dieser Arbeit angewendeten Immunpräzipitationen (IP) erfolgten auf eine sehr ähnliche Weise wie die Aufreinigung eines definierten Proteins. Auch war das Ziel ein ähnliches, jedoch wird bei der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) nicht nur das aufgereinigte Protein von Interesse analysiert, sondern auch die entsprechend mit aufgereinigten Interaktionspartner. Dadurch ermöglichte die Co-IP Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen.

Aus diesem Grund wurde eine Co-IP gewählt, da diese unter möglichst nativen Bedingungen durchgeführt werden konnte und sie eine hohe Flexibilität für Folgeexperimente ermöglichte. Das Ziel war es, dass durch die milden Bedingungen der Lyse während der IP die Interaktionen zwischen den Proteinen möglichst unbeeinflusst blieben und durch die spezifische Aufreinigung des Zielproteins (*bait*) dessen physikalischen Interaktionspartner (*prey*) ebenfalls im Eluat angereichert wurden. Die grundlegenden Voraussetzung für die hier verwendete Co-IP wurde in der von mir angefertigten Masterarbeit etabliert und spezifisch auf die Bestimmung der Interaktionspartner des hSnd2 angepasst (Sicking 2017). Diese Form der Co-IP basierend auf der Expression eines FLAG markierten Proteins (*bait*) wurde in dieser Arbeit ebenfalls angewendet. Erweitert wurde diese Technik durch den alternativen Einsatz von Antikörpern gegen das endogene *baitprotein*, wodurch die Expression eines markierten, artifiziellen Proteins nicht mehr nötig war. In beiden Fällen wurden die Zellen geerntet und gezählt. Der Lyse-Puffer wurde in Abhängigkeit der Zellzahl zugegeben (100 µl pro 2*10⁶ Zellen), die Zellen darin resuspendiert und zur vollständigen Lyse für 45 min bei 4 °C geschüttelt. Zur Auftrennung von solubiliserten Bestandteilen und Zelltrümmern (P) wurden die Proben für 25 min bei 4 °C und 68000 rpm zentrifugiert (Optima™ MAX-E Ultrazentrifuge). Um festzustellen, wie

erfolgreich das *baitprotein* aus der Membran gelöst wurde, und wie effizient später die Bindung an die Matrix erfolgte, wurde von dem hier erzeugten Überstand eine Probe für den späteren Vergleich abgenommen (-IP entspricht vor der IP). Der Überstand wurde im Falle von FLAG-markierten Proteinen mit *beads* versetzt, mindestens 50 µl, oder 10 % des Lysevolumens. An die verwendeten ANTI-FLAG® M2 *Affinity Beads* war kovalent ein α-FLAG-Antikörper gebunden, sodass Proteine mit einer FLAG-Sequenz mit diesen interagierten. Diese Bindung erfolgte über Nacht unter Rotation bei 4 °C. Im Falle von unbehandelten Zellen wurde der Überstand anstatt mit ANTI-FLAG® M2 *Affinity Beads* mit Antikörpern gegen das *baitprotein* versetzt. Es wurden 2 µl Antikörperserum für je 100 µl Überstand verwendet und die Probe ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert, währenddessen die F_{ab}-Region des Antikörpers mit dem *baitprotein* interagiert. Darauf folgend wurde den Proben Protein A und Protein G Sepharose zugefügt, je 5 % (v/v) des Gesamtvolumens und die Proben weiter unter Rotation für 4 h bei 4 °C inkubiert. Die Protein A/G Sepharose hat eine hohe Affinität zur F_c-Region der Antikörper, wodurch die Antikörper schlussendlich als Brücke zwischen den *beads* und dem Protein von Interesse dient. In folgenden Zentrifugationsschritten wurden die Proteine durch diese Bindung an die *beads* mit diesen sedimentiert. Für beide Probearten erfolgte die Zentrifugation der *beads* in der gekühlten Tischzentrifuge für 2 min bei 2000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt (+IP entspricht nach der IP). Es erfolgten drei Waschschriffe, die mit je 200 µl Lyse-Puffer durchgeführt wurden, wobei der Überstand von jedem Schritt aufbewahrt wurde (W). Die mittels FLAG-*tag* aufgereinigten Proteine wurden in drei Schritten durch eine kompetitive Peptidelution mit einem FLAG-Peptid von den *beads* gelöst, wobei immer 50 µl einer konzentrierten Peptidlösung (5 mg/ml) verwendet wurde. Für Proteine ohne Tag wurde eine saure Elution angewandt, bei der je 100 µl einer Lösung von 0,2 M Glycin (pH 2,2 in Lyse-Puffer) eingesetzt wurde. Die Proben wurde durch die Zugabe des entsprechenden Volumens 1 M Tris pH 7 wieder neutralisiert. Die Eluatfraktionen (E) wurden gepoolt, sodass eine TCA-Fällung zur Konzentrationserhöhung der Probe durchgeführt werden konnte (Kap. 5.2.7). Die verbleibenden *beads* wurden in Laemmli aufgekocht, wodurch auch noch an den *beads* verbliebene Protein gelöst wurden (B). Die Proben wurden abschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 5.2.2) und per Immunodetektion (Kap. 5.2.4) oder Massenspektrometrie analysiert.

Lyse/Wasch-Puffer (CCP400)

HEPES/KOH, pH 7,5	20 mM
KCl	400 mM
MgCl ₂	2 mM
EDTA	1 mM
DTT	2 mM
Glycerin	30 % (v/v)
PMSF	0,1 mM
PLAC	1/2000
CHAPS	0,65 %

Elutions-Puffer mit Peptid

Peptid	10 mg/ml in H ₂ O
	1 zu 2 in CCP400

Elutions-Puffer pH-Shift

Glycin	2M (pH 2,2) in H ₂ O
	1 zu 10 in CCP400

Neutralisierungs-Puffer

Tris	1M (pH 7)
------	-----------

In H₂O bidestIn H₂O bidest

Zur Kontrolle der Spezifität der Aufreinigung wurden im Abgleich zu den funktionellen Antikörpern, die direkt gegen das *bait*protein gerichtet waren, α -GST-Antikörper eingesetzt. Dieser interagiert nicht mit zellulären Proteinen und stellt damit eine Kontrolle zu den funktionellen Antikörpern dar. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Proteine nicht unspezifisch zum Beispiel an die *beads* banden und so falsch positive Ergebnisse generiert wurden. In Abb. 10 ist das Etablierungsexperiment dargestellt, bei dem α -hSnd2 als funktioneller Antikörper und α -GST als Kontrolle verwendet wurde. Im Falle einer immunologischen Detektion mit α -hSnd2 Antikörper (Abb. 10A) wurde nur in den Proben hSnd2 detektiert, in denen hSnd2 als Antikörper zur Aufreinigung verwendet wurde. Bei der Verwendung von α -GST-Antikörpern war eine solche Detektion nicht möglich. Gleiches gilt für die unspezifischere Kontrolle, bei der eine Färbung mit Coomassie durchgeführt wurde. Hier war bei der Verwendung von α -GST-Antikörpern (Abb. 10C) keinerlei aufgereinigtes Protein im Eluat oder der *beads* Fraktion (Spur E und B) festzustellen. Es war möglich durch die Verwendung des α -hSnd2-Antikörpers, weitere interagierende Proteine mit diesem aufzureinigen (Abb. 10B, markiert durch Kästchen).

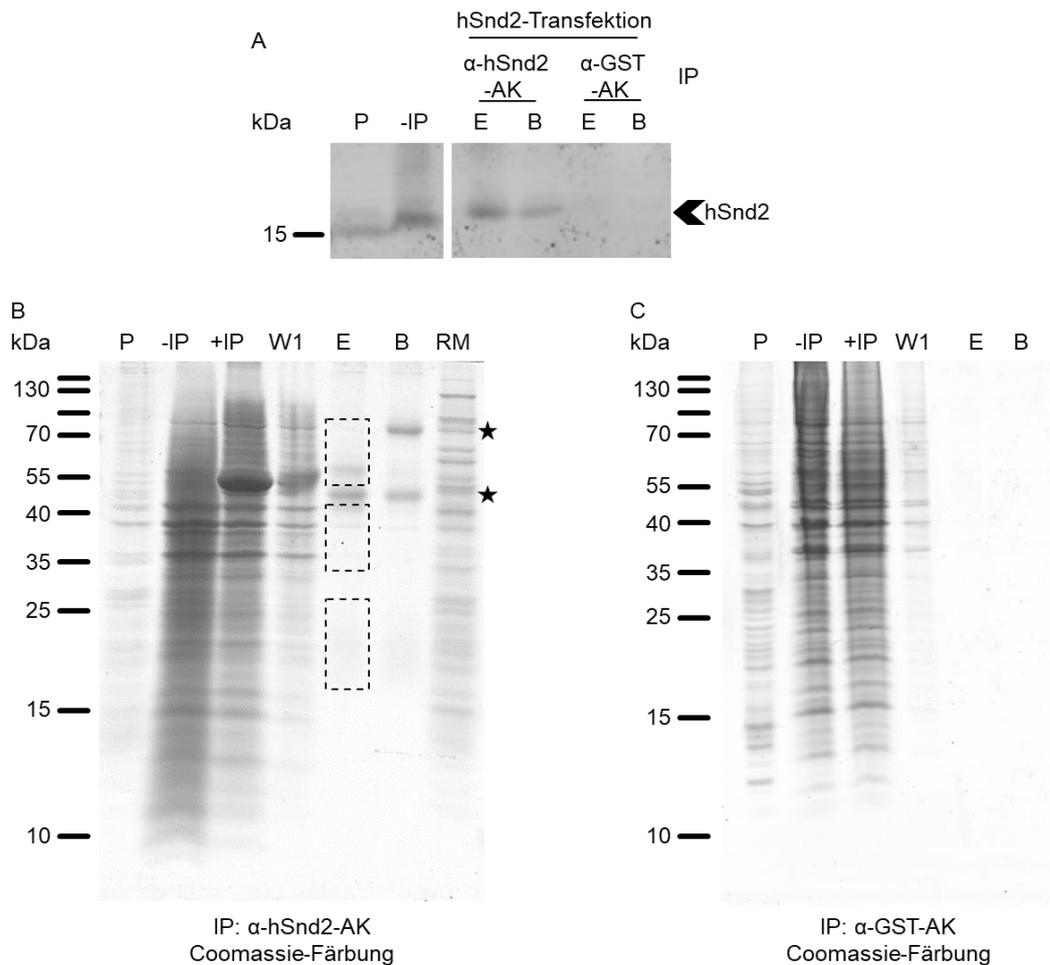


Abb. 10: Kontrolle der Spezifität der Co-IP, durchgeführt mit Antikörpern gegen endogenes hSnd2 Protein. Verwendet wurden hier untransfizierte HeLa-Zellen, die wie in 5.2.6 beschrieben verarbeitet wurden. Ausgewertet wurden die Proben auf unterschiedliche Weise. **A:** Nach der immunologischen Detektion mit α-hSnd2 Antikörpern konnte hSnd2 in den Proben, in denen der α-hSnd2-Antikörper zur Immunpräzipitation verwendet wurde, nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle, aufgereinigt mit α-GST-Antikörpern, ist kein hSnd2 festgestellt worden. **B:** Identischer experimenteller Aufbau der funktionellen Co-IP mit α-hSnd2-Antikörpern mit abschließender Färbung durch Coomassie zur Detektion des gesamten aufgereinigten Proteoms. Es sind Proteinbanden in der Eluatfraktion zu erkennen, die auf eine Aufreinigung weiterer Proteine hinweisen, siehe Kästchen. **C:** Kontrollexperiment zu B, bei dem α-GST-Antikörper zur Aufreinigung genutzt wurde. In diesem Fall wurden keine Proteine aufgereinigt. P: Pellet; -IP: Überstand vor der Zugabe der *beads*; +IP: Überstand nach der Inkubation mit den *beads*; W: erster Waschschrift; E: Elution; B: *beads* in Laemmli ausgekocht; RM-Raue Mikrosomen; aufgetragen wurden $2 \cdot 10^5$ Zelläquivalente pro Spur mit Ausnahme von E mit $1 \cdot 10^6$ Zelläquivalenten. Mit Sternen sind schwere und leichte Ketten markiert, die durch die verwendeten Antikörper generiert wurden.

5.2.7. Fällung von Proteinen durch TCA

Bei einer zu geringen Abundanz des Proteins in der Zelle, oder bei einer geringen Konzentration in einer Probe durch die Elution und Umpufferung in verhältnismäßig großen Volumina, war es möglich, dass die Proteinmenge unter der Nachweisgrenze des immunologischen Nachweises lag. Daher wurden die Polypeptide in diesen Proben gefällt. Diese Fällung hatte das Ziel, die Proben in geringeren Volumina aufzukonzentrieren. Dafür wurde der Effekt der Aussalzung genutzt. Hierbei wurde durch die Zugabe von 50 %iger

Trichloressigsäure (TCA) im Verhältnis 1:5 zur Probe, den Proteinen Wasser entzogen, worauf die Proteine präzipitierten. Dies geschah innerhalb einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Durch die Zentrifugation bei 4° C, 12800 rpm für 25 min wurden die Proteine pelletiert und der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde mit 100 % Aceton für 30 min bei -20 °C gelagert und erneut zentrifugiert, wodurch die TCA-Reste entfernt wurden. Verbliebenes Aceton wurde durch Wärmezufuhr verdampft und das Pellet in Laemmli-Puffer aufgenommen. Infolgedessen wurde eine definierte Probenkonzentration erreicht und die Proben für die SDS-PAGE (Kap. 5.2.2) verwendet.

TCA Lösung

Trichloressigsäure	50 % (v/v)
	In H ₂ O <i>bideest</i>

5.2.8. SERCA-Aktivitätsassay

Da die Abundanz eines Proteins nicht zwangsläufig eine Abschätzung der Aktivität des gesamten Pools dieses Proteins erlaubt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Assay etabliert, der spezifisch die Aktivität der ATP-abhängigen SERCA-Pumpe misst. Die theoretischen Grundlagen für diesen Assay wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Thomas Simmen (University of Alberta, Canada). Das Ziel des Assays war es, anhand des durch die SERCA verbrauchten ATP, die Aktivität der SERCA zu bestimmen. Hierfür wurden tagesaktuell SPZ hergestellt (Kap. 5.5.5), deren Konzentration mittels Bradfordassay bestimmt und auf 2 µg/µl eingestellt wurde (Kap. 5.2.1). Diese SPZ wurden in 2x-Puffer A umgepuffert, wobei hier gleichzeitig eine Verdünnung auf 2 µg Protein pro 50 µl-Puffer A erfolgte. 50 µl der Suspension wurden pro Kavität einer 96 *well* (flacher Boden, klar) Mikrotiterplatte vorgelegt. Durch die unmittelbar vor Beginn des Experiments erfolgte Zugabe von 47,5 µl des frisch vorbereiteten-Puffers B1 oder B2 und 2,5 µl der Pyruvatkinase (PK)/Lactatdehydrogenase (LDH) wurde die Reaktion gestartet (Abb. 11). Die Messung erfolgte automatisiert im UV-VIS-Plate Reader bei 37 °C, für 150 min mit einem Messintervall von 60 Sekunden, wobei vor jedem Intervall die Mikrotiterplatte kurz geschüttelt wurde. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm, da NADH hier eine spezifische Absorption im Vergleich zu NAD⁺ vorweist (Bernofsky & Wanda 1982; Horecker & Kornberg 1948). Dadurch konnte live die Abnahme der NADH-Menge in der Probe verfolgt werden und in Abhängigkeit zum zeitlichen Verlauf dargestellt werden. Die verbrauchte Menge an NADH ist direkt proportional der verbrauchten Menge ATP, da die Regenerierung des verbrauchten ATP direkt gekoppelt ist an den Verbrauch von NADH (Reaktionsschema Abb. 11).

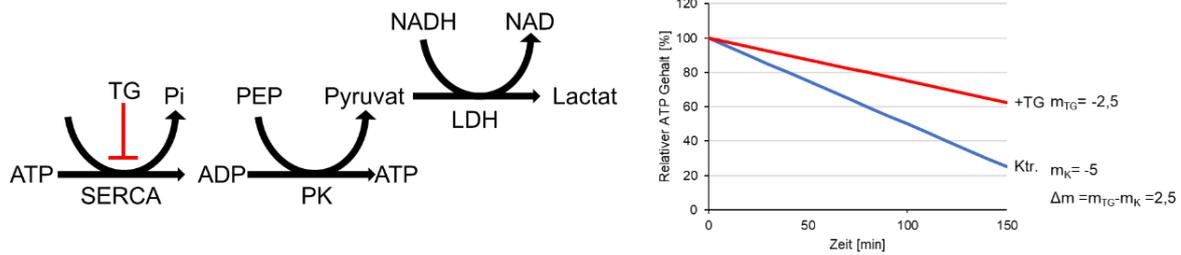


Abb. 11: Enzymatisch gekoppelte Reaktion und Auswertungsschema des SERCA-Aktivitätsassays. Durch die Zugabe von Thapsigargin (TG) wurde die Funktion der SERCA irreversibel inhibiert und damit deren ATP Verbrauch gestoppt. Um die Menge des verbrauchten ATPs auszulesen, wurde das aus dem Verbrauch entstehende ADP und dessen Regeneration an die Reduktion von NADH zu NAD gekoppelt. Durch die spezifische Absorption von NADH bei 340 nm im Vergleich zu NAD wurde die Abnahme der NADH Menge in der Lösung über die Zeit vermessen. Diese ist proportional zur verbrauchten ATP Menge. Die Steigung des Kurvenverlaufs wurde bestimmt. Die Differenz zu der DMSO behandelten Kontrolle, bei der SERCA weiterhin ATP verbraucht, stellt die Menge des ATPs dar, welches spezifisch durch SERCA umgesetzt wurde. Durch den Abgleich mit der SERCA-Proteinmenge wurde die relative Menge des verbrauchten ATP bestimmt.

Durch den Einsatz von TG in Puffer B1 wurde in diesen Proben die SERCA-Aktivität irreversibel gehemmt (Rogers et al. 1995; Thastrup et al. 1990). Dadurch erfolgte der ATP Verbrauch langsamer als in den mit DMSO behandelten Kontrollproben. Die Werte wurden auf den Anfangswert normiert, wodurch dieser als 100 % der ATP-Menge in der Lösung definiert wurde. Durch die Bestimmung der Steigung der Trendlinie beider Kurven, der Bildung des Deltas der Steigungen und der Normalisierung auf die relativen Proteinmengen die in vorhergegangenen immunologischen Experimenten ermittelt wurde, konnte der ATP-Verbrauch pro SERCA-Molekül ermittelt werden.

2x-Puffer A

Hepes, pH 7,2	50 mM
NaCl	250 mM
MgCl ₂	10 mM
CaCl ₂	0,2 mM
	In H ₂ O bidest

2x-Puffer B

DTT	2 mM
NADH	1,2 mM
ATP	4 mM
Phosphoenolpyruvat	2 mM
	In H ₂ O bidest

Puffer B1

Thapsigargin	20 µM
	In Puffer B

Puffer B2

DMSO	1 %
	in Puffer B

Pyruvatkinase / Lactatdehydrogenase

Pyruvatkinase:	600-1000 U/ml
Lactatdehydrogenase:	900-1400 U/ml

Messprotokoll:

Messdauer: 150 min
 Messintervall: 1 min
 Schütteln vor jeder Messung: 5 s; 2 mm orbital
 Wellenlänge: 340 nM
 Flashes: 10

5.2.9. Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in vitalen Zellen mit Hilfe des NanoBiT-Systems

Proteininteraktionen sind häufig sehr empfindlich und nur unter nativen, zellulären Bedingungen stabil. Daher war es trotz sorgfältigster Vorbereitung möglich, dass durch den Prozess der Probenverarbeitung Interaktionen zwischen Proteinen verloren bzw. aufgelöst werden und so ein unvollständiges Bild des Interaktoms entsteht. Dies sollte mit Hilfe des *NanoLuc Binary Technology* (NanoBiT) Systems verhindert werden, da Interaktionen in lebenden, intakten Zellen vermessen wurden. Grundlage für dieses System bildet ein Komplementationassay, welcher erstmalig 2016 in der Literatur Erwähnung fand (Dixon et al. 2016; Oh-hashi et al. 2016). Das von der Firma Promega entwickelte System beruht auf einer Abwandlung der ATP-unabhängigen Luciferase des *Oplophorus gracilirostris*, eines Tiefseekrebses, die in zwei Untereinheiten aufgeteilt und biotechnologisch optimiert wurde. Diese zwei Untereinheiten wurden an die Proteine von Interesse fusioniert, für die ein Interaktionsnachweis beabsichtigt war. Durch deren räumliche Nähe bilden die beiden Untereinheiten eine funktionelle Luciferase aus. Bezeichnet wird diese als NanoLuc Luciferase, welche das Substrat Furimazine umsetzt (England et al. 2016). Durch die enzymatische Aktivität der Luciferase erfolgte die Oxidation des Furimazine und es entstand ein nicht-reaktives Endprodukt sowie ein Lichtsignal, welches detektiert wurde (Greer III & Szalay 2002; Hall et al. 2012; Shimomura et al. 1978). Die Affinität der großen Untereinheit (LgBiT; 18kDa) zur kleinen Untereinheit (SmBiT; 11 Aminosäuren) ist mit einer Dissoziationskonstante (Kd) von 190 μ M schwach, wodurch keine funktionelle Luciferase auf Basis der zwei Untereinheiten spontan entsteht. Ein weiterer Vorteil gegenüber Interaktionsmessungen in Zelllysaten oder Crosslinks ist, dass die Verbindung zwischen den Untereinheiten spezifisch modulierbar ist, was bedeutet, dass Änderungen in der Proteininteraktion der Proteine von Interesse live nachverfolgbar sind (Dixon et al. 2016). Durch den schwachen HSV-TK Promotor vor den jeweiligen Gensequenzen wird keine Überexpression in den Zellen provoziert, was ebenfalls das Messen von falsch-positiven Signalen durch eine Überexpression der Reporterproteine verhindern soll (Ali et al. 2018).

In der Praxis bedeutet dies, dass zunächst Untereinheiten der Reporterstruktur als *tag* an die jeweiligen Termini der Proteine von Interesse kloniert wurden. Die Zellen wurden mit dem Plasmid transfiziert und wenn die markierten Proteine in räumlicher Nähe zueinander in der Zelle liegen, interagieren SmBiT und LgBiT miteinander und geben Auskunft über die Proteininteraktion bzw. die gemeinsame Lokalisierung durch die Generierung eines Lichtsignals. Die zwischen Protein und *tag* befindliche Linkersequenz ist 13-15 Aminosäuren lang, was etwa 5 nm entspricht (Ainavarapu et al. 2007). Gemessen wurde dieses Lichtsignal durch die Verwendung des UV-Vis-Spektrometers mit Mikrotiterplatten. Etabliert wurde das System durch die Verwendung der Positiv- (cPKA-C_S & rPKA-C_L) und Negativkontrolle (Halo-

C_S & rPKA-C_L), die von Promega bereitgestellt wurden (Schematisch Abb. 12A). Bei den Proteinen der Positivkontrolle handelt es sich zum einen um eine Isoform der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase A (rPKA) und eine der drei katalytischen Untereinheiten (cPKA). Diese bilden zusammen eine Form der funktionalen Proteinkinase A, die als cAMP abhängige Proteinkinase in der Zelle unterschiedlichste Funktionen erfüllt (Døskeland et al. 1993; Keil et al. 2016). Hierfür wurden Zellen am Tag bevor das Experiment begann in der üblichen Weise gesplittet. Die Zellen wurden am ersten Tag des Experimentes geerntet, mittels Cytometer gezählt und eine Lebendzellzahl von 20000 Zellen in 100 µl pro Kavität ausgesät. Hierbei war zu beachten, dass eine weiße 96 well plate verwendet wurde, die einen flachen Boden besitzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Plasmidtransfektion nach diesen 24 Stunden wurde nach dem folgenden Schema pipettiert.

Mit zwei Plasmiden (funktional)

Opti-MEM™ ohne Phenolrot	25,1 µl
Plasmid #1 (0,1 µg/µl)	1,9 µl
Plasmid #2 (0,1 µg/µl)	1,9 µl
FuGENE®HD	1,1 µl

mit einem Plasmid (Kontrolle)

Opti-MEM™ ohne Phenolrot	27,6 µl
Plasmid #1 (0,1 µg/µl)	1,9 µl
FuGENE®HD	0,56 µl

Mit drei Plasmiden (Kompetition)

Opti-MEM™ ohne Phenolrot	22,7 µl
Plasmid #1 (0,1 µg/µl)	1,9 µl
Plasmid #2 (0,1 µg/µl)	1,9 µl
Plasmid #3 (0,1 µg/µl)	1,9 µl
FuGENE®HD	1,7 µl

Der Transfektionsmix wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren durchmischt und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Das Medium in den wells wurde zur Transfektion nicht ausgetauscht. Durch die Zugabe von 8 µl des Transfektionsmixes pro well wurde eine Endkonzentration von 50 ng/well für jedes Plasmid erreicht. Die Zellen wurden erneut für 24 h Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

Da die Messungen über einen Zeitraum von bis zu zwei Stunden erfolgen können, wurde der Mikroplate-Reader bereits vor Beginn der Messung auf 37 °C erwärmt, um für die Zellen konstante Bedingungen zu erzeugen. Kurz vor Beginn des Experiments wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und durch 100 µl vorgewärmtes (37 °C) Opti-MEM™ ohne Phenolrot ersetzt. Das Substrat, welches die Generierung des Lichtsignals durch die Luciferase ermöglicht, wurde für jedes Experiment neu vorbereitet. Dies bestand aus einem 1/20 Verhältnis aus Nano-Glow Live Cell reagent und Nano-Glow Live Cell Substrate Dilution Buffer. 20 µl dieser Lösung wurden in jede einzelne Vertiefung gegeben und anschließend die Lumineszenzmessung gestartet. Die Messparameter waren wie folgt eingestellt.

Settings:

Messdauer: individuell

Messintervall: 1 min
Schütteln vor jeder Messung: 2 s; 2 mm orbital
Integration time: 1000 ms
Settle time: 50 ms

Die Messung wurden nach Belieben pausiert und unterschiedliche Substanzen appliziert. Die Auswertung der relativen Lichtstärke erfolgte standardmäßig mit der ermittelten Lichtintensität vier Minuten nach Substratzugabe im Vergleich zur Kontrollkombination, die aus dem jeweiligen LgBit-Konstrukt und Halo-C_s bestand. Nach diesen vier Minuten war sichergestellt, dass durch das Schütteln der Platte alle Zellen mit Substrat gesättigt waren und das Signal nicht weiter anstieg.

Verwendete Chemikalien (finale Konzentration im well)

Digitonin (5,5 %)	0,002 %
Trypsin (10 mg/ml)	50 ng/ml
Peptide (20 mM)	1 nM – 100 µM

Alle benötigten Vorverdünnungen und Verdünnungsreihen wurden in Opti-MEM ohne PhenolRot vorbereitet. Die Behandlung mit Digitonin wurde mit der entsprechenden Menge des Lösemittels DMSO kontrolliert, H₂O wurde für Trypsin als Lösemittelkontrolle eingesetzt. Die unterschiedlichen Peptide wurden in DMSO gelöst und tagesaktuell eingewogen auf eine Stockkonzentration von 20 mM in DMSO.

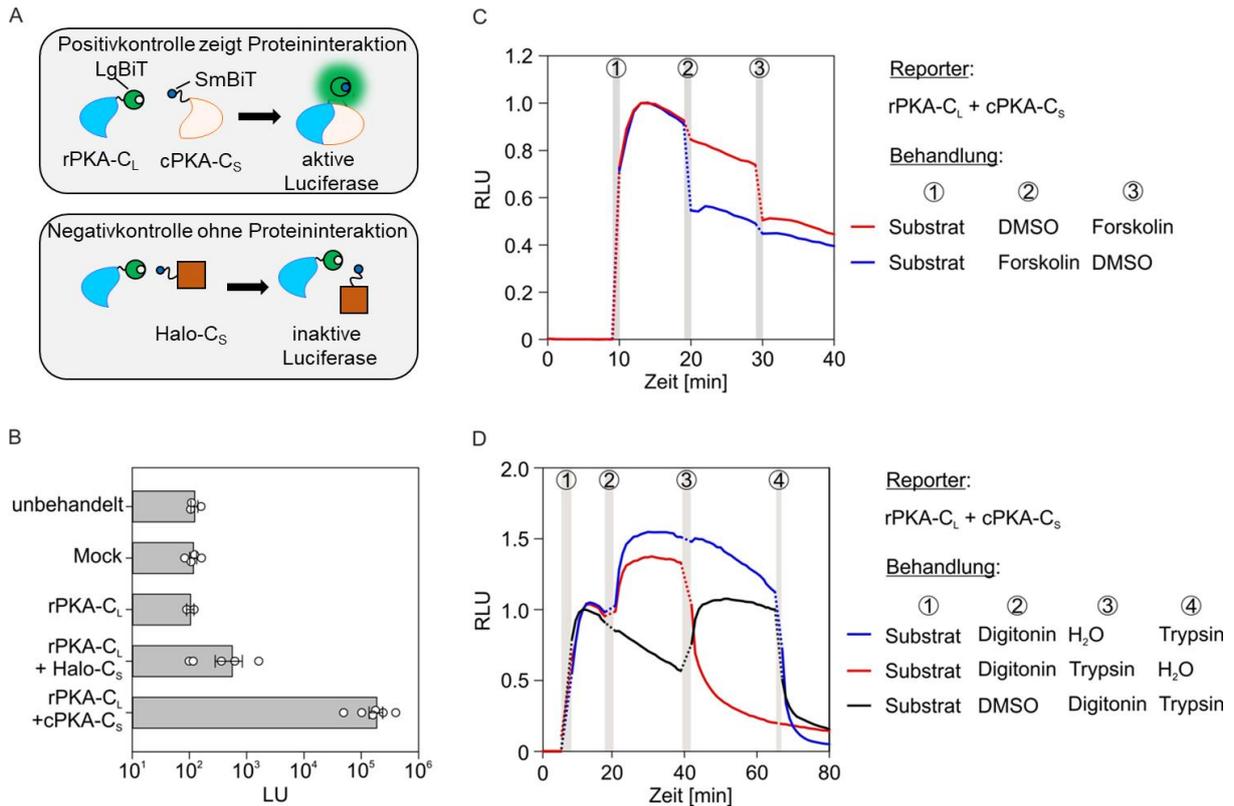


Abb. 12: Grundlage des NanoBiT-Systems. **A:** Die zu untersuchenden Proteine wurden durch eine Plasmidtransfektion gezielt in der Zelle exprimiert (Kap. 5.5.3). Die zur Positivkontrolle genutzten Proteine waren entweder mit dem LgBiT-Konstrukt (rPKA-C_L) oder dem SmBiT (cPKA-C_S) markiert. Wenn die markierten Proteine miteinander interagierten, wurden auch die BiT-Konstrukte in räumliche Nähe zueinander positioniert, wodurch diese komplementierten und ein Lichtsignal generierten. Das daraus resultierende Lichtsignal wurde mit Hilfe des Mikroplate-Readers quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde das Halo-Protein mit einem SmBiT am C-Terminus (Halo-C_S), welches keine relevante Affinität zu rPKA-C_L aufweist, verwendet. Dadurch, dass das Halo-Konstrukt nicht mit dem rPKA-C_L interagiert, entsteht keine räumliche Nähe bzw. Interaktion zwischen den tags. Da jedoch eine minimale Affinität zwischen SmBiT und LgBiT besteht, wurde diese Interaktion in allen Experimenten als Normierungswert angesehen. **B:** Auswertung des Experiments zur Etablierung des Systems mit Hilfe der bereitgestellten Positiv- und Negativkontrollen. Im Vergleich zu der Kombination aus rPKA-C_L und Halo-C_S, zeigen Zellen ohne Konstrukt oder nur dem rPKA-C_L-Protein eine geringere Lumineszenz. Die Positivkontrolle generiert durch die Interaktion ein etwa 600-fach stärkeres Lichtsignal. Die Detektion des Signals erfolgte 24 Stunden nach Plasmidtransfektion und vier Minuten nach Substratzugabe. **C:** Verifizierung des Systems durch die live Modulierung der rPKA-C_L + cPKA-C_S Kombination mit Hilfe von Forskolin (FS). Die eingesetzte Endkonzentration betrug 15 µM Forskolin. DMSO wurde als Lösemittelkontrolle verwendet. Forskolin hemmt reversibel die Interaktion der zwei Proteine. Die Daten sind relativ zum Wert vier Minuten nach Substratzugabe berechnet. **D:** Verlaufsmessung zur Prüfung der Lokalisierung der zur positiv Kontrolle genutzten Reporterproteine. Es sind die relativ gemessenen Messwerte dargestellt, nach der Normierung auf den Messwert vier Minuten nach Substratzugabe. Die Farbverläufe codieren die verschiedenen Behandlungen mit Substanzen. Die Kurven zeigen einen Abfall der Lichtintensität, nur wenn die Plasmamembran durch Digitonin (0,002 % finale Konzentration) permeabilisiert wurde und darauf folgend Trypsin eingesetzt wurde (50 µg/ml finale Konzentration). Daraus lässt sich folgern, dass die Reportproteine zytosolisch lokalisiert waren. Graue Balken symbolisieren den Applikationszeitraum der unterschiedlichen Substanzen, in denen nicht gemessen werden konnte. Die gepunkteten Linien stellen daher den angenommenen Messverlauf in dieser Zeit dar. In Abb. 12 sind die zur Etablierung verwendeten Kontrollen dargestellt, wie diese nach einer Interaktion das Lichtsignal generieren und deren Quantifizierung. Die Auswertung in Abb. 12B erfolgte wie beschrieben vier Minuten nach dem Beginn des Experiments. Die Verwendung der Positivkontrollen führten zu einer 600-fach höheren Lumineszenz, im

Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle mit dem nicht interagierenden Proteinpaar (rPKA-C_L+ Halo-C_S). Es zeigt sich, wie vom Anbieter beschrieben, dass der SmBiT und LgBiT gering miteinander interagieren, was im Vergleich zur Expression des LgBiT allein, oder Mock und unbehandelten Kontrolle deutlich wurde. Laut Hersteller kann ein Signal als spezifisch anerkannt werden, wenn die Signalstärke mindestens fünf bis zehnmal so stark ist wie die entsprechende Kontrolle. Des Weiteren wurde die Spezifität der Interaktion nachgewiesen, indem eines der Plasmide in der unmarkierten Form exprimiert wurde (Plasmid #3) und so die Interaktion des LgBiT und SmBiT abschwächen sollte, oder ein Inhibitor zugegeben wurde, der die Interaktion auflöst. Dabei wurde eine der Stärken, die live Nachverfolgbarkeit des Assays deutlich, wie hier in Abb. 12C-E gezeigt. In Abbildungsteil C ist der Einsatz des indirekten PKA Aktivators Forskolin dargestellt, der zur einer Trennung der katalytischen und regulatorischen Untereinheit führt. Nachdem für zehn Minuten der basale Messwert ermittelt wurde, wurde das Substrat zugegeben, um die Lichtreaktion zu ermöglichen. Nach weiteren zehn Minuten wurde Forskolin (15 µM finale Konzentration) oder zum Vergleich die Lösemittelkontrolle DMSO zugegeben. Während auf die Behandlung mit DMSO ein geringer Verlust, aber ein daraufhin weiterhin regelmäßiger Abfall der Signalintensität folgte, konnte der Signalverlust nach Zugabe des Aktivators Forskolin direkt verfolgt werden. Dieser betrug ca. 40 %. Dieser Effekt war weiterhin zu beobachten, wenn Forskolin nach der DMSO Behandlung eingesetzt wurde (Dixon et al. 2016). Zum Nachweis der Lokalisierung der beiden verwendeten Proteine wurde ein System ähnlich zur Sequestrierung genutzt, wie sie in Kapitel 5.2.10 beschrieben wird. Ziel war es zu zeigen, dass beide Proteine und deren *tags* im Zytosol lokalisiert waren, (Døskeland et al. 1993; Keil et al. 2016). Um dies zu testen, wurden *wells*, die alle mit der beschriebenen Positivkontrolle transfiziert wurden, auf verschiedene Weise weiterbehandelt. Dies sollte zur Folge haben, dass ein Signalabbau erfolgte, sobald Trypsin im Zytosol anwesend war. Der Verlauf der Messung ist in Abb. 12D dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte auf den Messwert von vier Minuten nach Substratzugabe normiert. Zu Beginn war kein Signal zu messen, da noch kein Substrat zugegeben wurde. Dieses wurde nach fünf Minuten zugegeben, was ein starkes Lichtsignal zur Folge hat. Durch die darauffolgende Zugabe von Digitonin (0,002 %, rot und blau), wurde des Signal zusätzlich verstärkt, ein Effekt, der bei der Behandlung mit DMSO (schwarz) nicht beobachtet wurde. Die gesteigerte Lichtintensität durch die Zugabe von Digitonin lässt sich vermutlich durch die gesteigerte Substratzugänglichkeit erklären, da dieses so ebenfalls besser in das Zytosol gelangen kann, sobald die Zelle durch den Einsatz von Digitonin semi-permeabilisiert wurde. Im nächsten Behandlungsschritt wurden die durch die rote Kurve repräsentierte Probe mit Trypsin (50 µg/ml finale Konzentration) behandelt, wodurch das Signal massiv abgebaut wurde. Zur Kontrolle wurde die blaue Probe mit H₂O behandelt, was keinen Einfluss auf den Kurvenverlauf nahm. Die schwarze Probe wurde erst zu diesem Zeitpunkt mit Digitonin

behandelt, wodurch auch nach der vorausgegangenen Behandlung mit DMSO erneut eine Steigerung des Signals festgestellt werden konnte. Die Abschließende Behandlung der schwarzen und blauen Probe mit Trypsin zeigte den schon zuvor beobachteten Effekt eines starken Signalverlustes. Dadurch, dass das Lichtsignal erst nach der aufeinanderfolgenden Zugabe von Digitonin und Trypsin verringert wurde, ließ sich zeigen, dass die Fusionsproteine, die als Reporterproteine dienen, im Zytosol lokalisiert waren.

Da die Funktionalität der Luciferase darauf beruht, dass das LgBiT durch den SmBiT komplettiert wird, war die Überlegung, ob diese Vervollständigung auch auf einem künstlichen Wege herbeigeführt werden konnte. Hierbei war es das Ziel einen Expressionsnachweis für LgBiT-Konstrukte zu generieren, da diese durch den HSV-TK Promotor nur schwach synthetisiert wurden und daher per Western-Blot schwer nachweisbar sein würden. Zu diesem Zweck wurden vier Peptide synthetisiert (Kap. 5.1.4; Tab. 6; M. Jung, UdS) die ein unterschiedliches Bindungsverhalten zum LgBiT aufweisen sollten. Dabei handelte es sich zum einen um ein identisches Peptid zum SmBiT-tag (K_D zum LgBiT = 190 μM), die dazu passende Kontrolle in einer zufälligen Sequenzreihenfolge (*scrambled*) und ein affineres Peptid, das HaBiT (High affinity BiT, K_D zum LgBiT = 700 pM). Die Sequenz des HaBiT-Peptides ist um eine Aminosäure kürzer und unterscheidet sich an sechs der elf Positionen im Vergleich zum SmBiT Peptid, am auffälligsten im N-terminalen Bereich durch zwei positiv geladene Aminosäuren (Dixon et al. 2016). Zur Kontrolle wurde ein Peptidabschnitt des omnipräsenten Proteins β -Actin genutzt. Dieses besitzt etwa die gleiche molare Masse wie das SmBiT Peptid und beinhaltet ebenfalls einen positiv geladenen Patch. Mit Hilfe dieses Peptides sollte eine zufällige Komplementation durch einen Bestandteil der Zelle beispielhaft ausgeschlossen werden. Der experimentelle Aufbau erfolgte ähnlich zu der Kontrolle der Lokalisation der Proteine, jedoch wurde in diesem Fall nur das LgBiT markierte Konstrukt rPKA-C_L in den Zellen synthetisiert, dargestellt in Abb. 13.

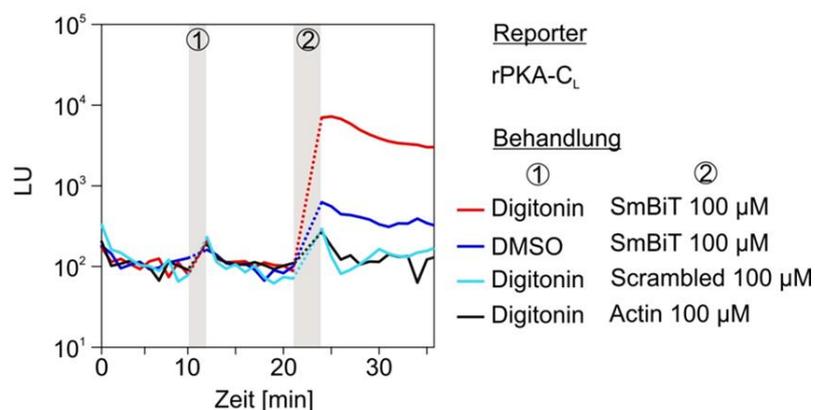


Abb. 13: Etablierung der synthetischen Peptidkomplementation zum Nachweis der LgBiT markierten Proteine. Durch die alleinige Synthese des rPKA-C_L als Reporterkonstrukt war die Generierung eines Lichtsignals nicht möglich. Dies wird auch nicht durch die darauf folgende

Behandlung mit Digitonin (0,002 %) oder DMSO beeinflusst. Durch die Applikation unterschiedlicher Peptide (100 μ M) im zweiten Behandlungsschritt wurde die Luciferase vervollständigt und so ein Lichtsignal generiert (SmBiT, roter und blauer Verlauf), oder durch Kontrollpeptide eine ungerichtete Interaktion mit anderen Peptiden ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass für eine effiziente Komplementation die Plasmamembran zu Beginn durch Digitonin semi-permeabilisiert werden musste, bevor das SmBiT effektiv den LgBiT komplementieren konnte, dargestellt durch den roten Verlaufsgraphen.

Nach Beginn der Messung und der Substratzugabe war es dementsprechend nicht möglich ein Lichtsignal zu generieren. Die Plasmamembran wurde anschließend durch den Einsatz von Digitonin semi-permeabilisiert (roter Verlauf), bzw. zur Kontrolle dieses Schrittes mit DMSO behandelt (blauer Verlauf). Die darauffolgende Applikation mit dem SmBiT Peptid ermöglichte die Generierung eines Lichtsignales, welches etwa 10-mal stärker war als die entsprechende DMSO Kontrolle in welcher die Plasmamembran nicht permeabilisiert wurde. Die Zugabe des β -Actin- oder des *scrambled*-Peptides (schwarz und hellblau) führte zu keinerlei Signalausbildung. Dementsprechend wurde gezeigt, dass eine Vervollständigung der Luciferase ebenfalls möglich war durch die Zugabe eines synthetischen Peptides. Für eine effektive Komplementation musste zuvor die Plasmamembran durch Digitonin semi-permeabilisiert werden.

Dieses Wissen wurde genutzt um durch Titration die optimale Konzentration der beiden Peptide, die mit dem LgBiT interagieren, SmBiT und HaBiT zu auszuloten, so dass in Folgeexperimenten die Anwesenheit der LgBiT-markierten Konstrukte direkt in der lebenden Zelle nachweisbar wurde. Ausgearbeitet wurde dieses System erneut mit der zytosolischen Positivkontrolle rPKA-C_L. Diese wurde ohne Interaktionspartner in den Zellen synthetisiert, die Zellen im Folgeschritt durch Digitonin semi-permeabilisiert und abschließend mit den unterschiedlichen Peptiden komplementiert (Abb. 14A).

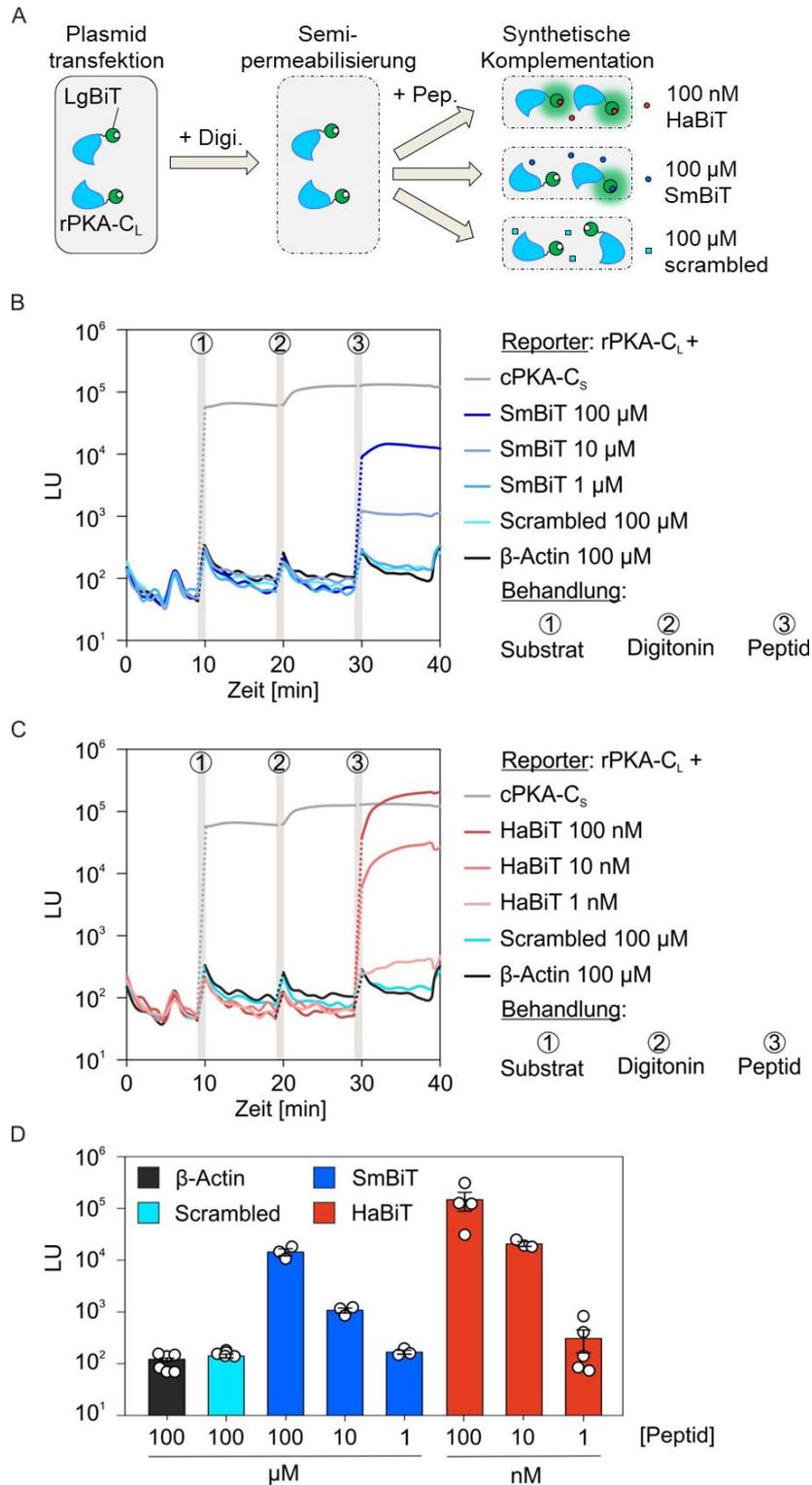


Abb. 14: Etablierung der synthetischen Komplementation durch die Verwendung unterschiedlicher Peptide. **A:** Der experimentelle Verlauf basiert auf den Beobachtungen von Abb. 13. Nach der 24 stündigen Expression des rPKA-C_L Reporterkonstrukts wurden die Zellen mittels Digitonin (0,002%) semi-permeabilisiert und darauffolgend mit verschiedenen synthetischen Peptiden behandelt, um eine Komplementation der Luciferase zu erreichen. **B:** Titration des SmBiT-Peptides. Durch die Zugabe des SmBiT Peptides wurde konzentrationsabhängig eine Vervollständigung der Luciferase erreicht und damit deren Aktivität ermöglicht. Es wurden Konzentrationen von 1-100 μM des Peptides eingesetzt. Zur Kontrolle fungierten die Peptide *scrambled* und Actin (schwarz, hellblau je 100 μM), sowie die funktionelle Interaktion zwischen rPKA-C_L und cPKA-C_S um die ordnungsgemäße Funktion des Assays sicherzustellen. **C:** Identische Systematik zu B, hier wurde jedoch das affinere

HaBiT-Peptid verwendet (rote Verläufe), welches in einer Konzentration von 1-100 nM eingesetzt wurde. Die Kontrollen sind identisch zu den in B dargestellten Kontrollen. Alle Verläufe stellen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Messungen dar. **D:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Abbildungen B und C zum direkten Vergleich der unterschiedlichen Peptide. Das HaBiT (rot) interagiert deutlich stärker mit dem LgBiT im Vergleich zum SmBiT (blau). Actin (schwarz) und *scrambled* Peptid (hellblau) zeigen keine Interaktion zum LgBiT woraus kein Lichtsignalbildung erfolgt.

Die Digitonin und Peptidzugabe entspricht den Behandlungspunkten zwei und drei in den Abbildungsteilen B und C. In Abbildung B wurden nach der Permeabilisierung Konzentrationen von 1-100 μM des SmBiT Peptides verwendet, während für das HaBiT Peptid 1-100 nM verwendet wurden. Zur Kontrolle wurden sowohl *scrambled* als auch Actin Peptide verwendet in jeweils 100 μM finaler Konzentration (schwarz und hellblau). Zum Nachweis der Funktionalität des Assays wurde ebenfalls eine reale Interaktion zwischen rPKA-C_L und cPKA-C_S überprüft (grau). Die Kontrollmessungen sind zur direkten Vergleichbarkeit identisch in Abbildung B und C. In beiden Verläufen zeigt sich eine gesteigerte Intensität des Signales bei steigender Peptidzugabe. Die höhere Affinität des HabiT zum LgBiT wurde ebenfalls bestätigt, da die Signalintensität bei einer Konzentration von 10 nM des HaBiT-Peptides der von 100 μM SmBiT Peptid entspricht. In Abbildung D sind diese als Lumineszenzeinheiten im Vergleich direkt nebeneinander aufgetragen.

Während dieser Arbeit wurde eine Plasmidkollektion generiert (Kap. 5.1.6; 5.4.8), die zum einen als funktionelle Kontrolle des Systems, als auch dem Nachweis von unbekanntem Interaktionen dienen sollte.

5.2.10. Sequestrierung von Proteinen zum Orientierungsnachweis

Der Nachweis der Orientierung eines Proteins durch dessen Sequestrierung erfolgt dadurch, dass geprüft wird, welche Domänen eines Proteins vor einem zielgerichteten Abbau geschützt sind. Dieser Schutz erfolgt dadurch, dass diese Domänen beispielsweise im ER gelagert, sprich luminal, sind. Durch die Verwendung von Antikörpern, die an die spezifischen Domänen binden, kann dann am Ende der Behandlung nachgewiesen werden, ob die gesuchte Domäne zuvor durch den Einsatz von Trypsin abgebaut wurde oder nicht. Für dieses Experiment wurden in der Regel $0,6 \cdot 10^6$ Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Durch die Transfektion eines Plasmids (Kap. 5.5.3), wurde ein später zu analysierendes Protein für 24 Stunden in den Zellen exprimiert. Die Zellen wurden auf die übliche Art geerntet (Kap. 5.5.1) und mittels Cytometer gezählt (Kap. 5.5.2). Nach einer Zentrifugation, um die Pelletierung der Zellen zu erreichen, wurden diese in KHM-Puffer aufgenommen, sodass eine Konzentration von 20000 Zellen pro 1 μl Puffer erreicht wurde. Pro $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden je 0,5 μl Digitonin (40 mg/ml) pipettiert, gevortext und dann für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Durch diesen Schritt wurde spezifisch die Plasmamembran permeabilisiert, was einen Zugang zum Zytosol zur Folge hatte (Frenkel et al. 2014; Litvinov et al. 2018). Die behandelten Zellen wurden im gleichen Verhältnis mit den vorbereiteten

Sucrose-Puffern gemischt. Durch die Verwendung der Sucrose-Puffer wurden unterschiedliche Effekte erzielt. Da dem reinen Sucrose-Puffer keine Proteinase zugegeben wurde, sollte in diesen Zellen kein Proteinabbau stattfinden, wodurch der Puffer als Kontrolle angesehen wurde. Das in dem Sucrose/Trypsin-Puffer befindliche Trypsin stellt ein Enzym dar, welches Proteine spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin in Peptiden spaltet (Keil 1992; Rick 1974). Dadurch wird das Protein von Interesse abgebaut, solange es im Zytosol lokalisiert ist, jedoch nicht, wenn es geschützt im ER-Lumen liegt, da das Trypsin aufgrund der intakten ER-Membran keinen Zugang zum Lumen hat. Dieser Zugang wird jedoch durch das Detergens TritonX-100 im dritten verwendeten Puffer gewährleistet, sodass das Trypsin hier alle Proteinbestandteile abbauen sollte. Die Zellen wurden für eine Stunde in den besagten Puffern inkubiert und in regelmäßigen Abständen gevortext. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von PMSF (2 µl) und PLAC (2 % v/v). Durch eine anschließende Analyse per SDS-PAGE, Western Blot und immunologischem Nachweis wurde dann anhand der Laufhöhe, bzw. der Anwesenheit einer Bande festgestellt, wie die jeweils untersuchte Domäne in der Zelle vorliegt. Grafisch wurde dieser Vorgang in Abb. 15 zusammengefasst.

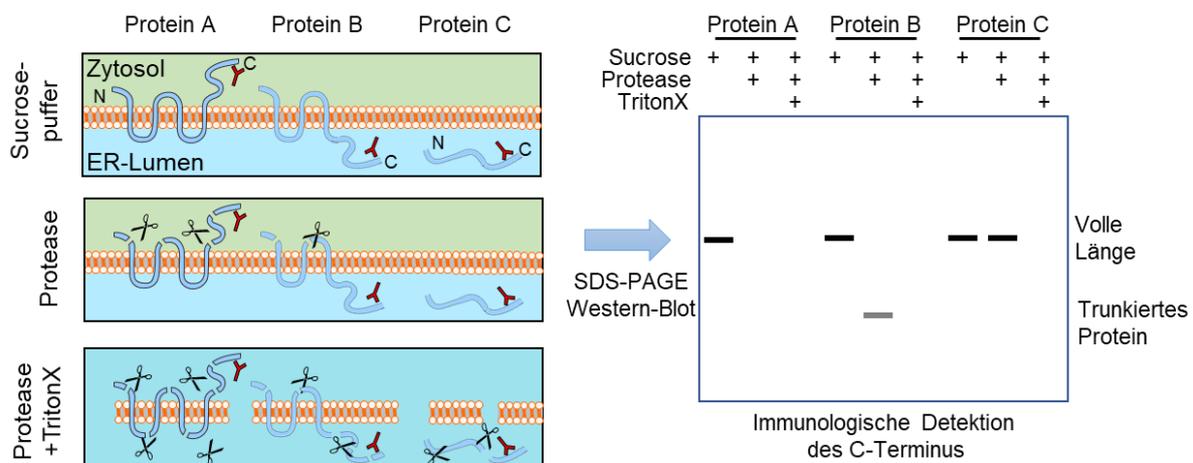


Abb. 15: Grafische Zusammenfassung der Sequestrierung zur Überprüfung der Proteintopologie. Nachdem die Plasmamembran durch die Behandlung mit Digitonin permeabilisiert wurde, wurden die Zellen für eine Stunde in drei verschiedenen Puffern inkubiert. Während im Sucrose-Puffer kein Proteinabbau erfolgte, wurde das Protein durch das Trypsin (symbolisiert durch die Scheren) im Protease-Puffer auf zytosolischer Seite abgebaut. Das Protein wurde vollständig abgebaut, sobald der Puffer TritonX-100 beinhaltete, denn durch dieses Detergens wurde die ER Membran ebenfalls aufgelöst. Die Protease wurde durch Inhibitoren und Kochen der Probe inaktiviert. Die so behandelten Proben wurden per Western Blot und spezifische Antikörper analysiert. In diesem Beispiel wurden Antikörper verwendet, die den C-Terminus der einzelnen Proteine erkennen und so eine Aussage über die Lokalisation des C-Terminus zulassen.

Das hier in Abb. 15 gezeigte Beispiel lässt die Aussage zu, dass der C-Terminus von Protein A zytosolisch orientiert ist, aufgrund der fehlenden Bande in der Protease behandelten Probe, während der C-Terminus von Protein B luminal vorliegt, da hier die Bande erst durch die Behandlung mit Triton vollständig verschwindet und vorher nur eine Trunkierung des Proteins

erfolgt. Eine Trunkierung des Proteins C ist nicht zu beobachten, wenn kein TritonX anwesend ist, weswegen in diesem Schritt keine Massenänderung im Western Blot zu beobachten ist. Darauf folgend wird das Protein durch den Einsatz von TritonX der Protease zugänglich und vollständig abgebaut. Der Versuchsaufbau konnte für die Analyse von Proteinen des ER identisch auf RMs angewendet werden, wobei hier keine Permeabilisierung mit Digitonin von Nöten war, da keine Plasmamembran vorhanden war.

<u>KHM</u>		<u>Sucrose-Puffer</u>	
CH ₃ CO ₂ K	110 mM	Sucrose	162,5 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	2 mM		In H ₂ O <small>bidest</small>
HEPES/KOH; pH 7,2	20 mM		pH 7,2 mit HEPES/KOH
	In H ₂ O <small>bidest</small>		
<u>Sucrose/Trypsin-Puffer</u>		<u>Sucrose/Trypsin/Triton-Puffer</u>	
Sucrose	162,5 mM	Sucrose	162,5 mM
Trypsin	100 µg/ml	Trypsin	100 µg/ml
	In H ₂ O <small>bidest</small>	TritonX-100	0,4 % (w/v)
	pH 7,2 mit HEPES/KOH		in H ₂ O <small>bidest</small>
			pH 7,2 mit HEPES/KOH

Die Funktionalität des experimentellen Aufbaus wurde in Abb. 16 nachgewiesen. Zur Überprüfung, ob die ER Membran in Anwesenheit der Protease und Abwesenheit des Detergens TritonX-100 noch intakt ist, wurden die ER-luminalen Proteine PDI und GRP170 analysiert (Abb. 16A). Diese zeigten, durch den Abbau des Signals nach der TritonX-100 Behandlung, dass die ER-Membran bis zu diesem Zeitpunkt intakt war. Eines der beiden Proteine wurde in allen Sequestrierungen parallel analysiert, wird jedoch in folgenden Abbildungen nicht mehr dargestellt. Als Beispiel für polytope Membranprotein wurde hier TRAPy genutzt, dessen Topologie in Abbildungsteil B dargestellt ist (Bañó-Polo et al. 2017). Vergleichend wurde das Experiment mit Hilfe von RMs und HeLa-Zellen durchgeführt. In beiden Fällen zeigte sich, dass TRAPy trunziert wird und eine proteaseresistente Domäne im Zytosol aufweist. Die entsprechende Kontrolle des C-Terminus, mit Hilfe einer FLAG markierten Variante, zeigte einen unmittelbaren Abbau nach Trypsinbehandlung und damit eine zytosolische Lokalisierung des C-Terminus an (Abb. 16D).

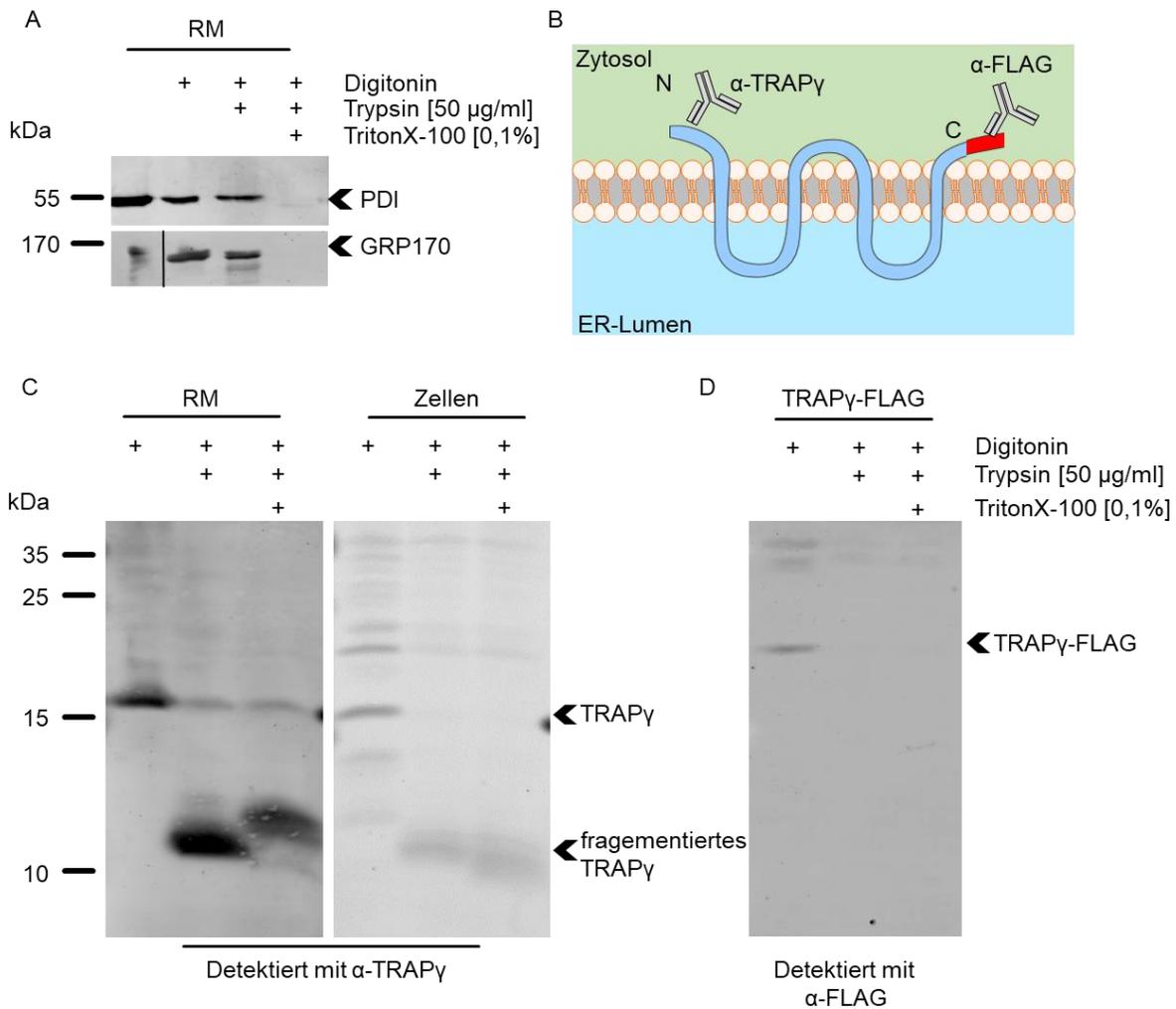


Abb. 16: Etablierung der Sequestrierung am Beispiel des TRAP γ Membranproteins. Um die Funktionalität der Vorgehensweise zu testen, wurde die Sequestrierung mit dem ER-Membranprotein getestet, dessen Topologie bereits bekannt ist. **A:** ER-luminale Proteine GRP170 und PDI wurden verwendet, um die Integrität des ERs nachzuweisen, bevor das Detergens TritonX-100 zugegeben wurde. Ein Abbau dieser Proteinbestandteile erfolgte erst wenn die ER-Membran im letzten Schritt durch TritonX-100 aufgelöst wurde. **B:** Bestätigte Struktur von TRAP γ - in der ER-Membran. **C:** Vergleich der Sequestrierung zwischen RMs und HeLa-Zellen. Die Proben wurden wie im vorhergegangenen Text beschrieben behandelt und analysiert. Es zeigt sich, dass der N-Terminus des TRAP γ Proteins zytosolisch lokalisiert ist. **D:** Kontrolle der Lokalisation des C-Terminus mit Hilfe eines C-terminal FLAG markierten Konstruktes (Kap. 5.5.3). Dieser ist ebenfalls zytosolisch lokalisiert.

5.2.11. Massenspektrometrische Analysen

Um Interaktionspartner des *baitprotein* aus der Co-IP zu bestimmen, die nicht mit Hilfe der immunologischen Detektion identifiziert wurden, aufgrund der geringen Präsenz des Proteins innerhalb der Probe oder nicht vorhandenen Antikörpern, wurde die Massenspektrometrie (MS) genutzt. Hierfür wurden die Proben auf einem industriell, steril gegossenem 10 % „Mini-PROTEAN[®]“ Gel von Bio-Rad aufgetragen. Die Gele liefen bei 100 V in MOPS-Puffer, bis die Lauffront an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert war. Dadurch das der Lauf der Gelelektrophorese zu diesem Zeitpunkt abgestoppt wurde, wurde die Probe als schmale Bande aufkonzentriert. Das Gel wurde mit einer Fixierlösung für 30 min inkubiert und darauffolgend dreimal in fünfminütigen Schritten mit H₂O_{bidest} gewaschen. Die Färbung mit

kolloidalem Coomassie erfolgt unter Schütteln über Nacht (Kap. 5.2.3). Entfärbt wurden die Gele durch Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, bis definierte Banden zu erkennen waren. Diese Banden wurden ausgeschnitten und Frau Dr. Claudia Fecher-Trost (Pharmakologie und Toxikologie UdS) zur Weiterverarbeitung der Proben und Durchführung der MS überreicht (Fecher-Trost et al. 2013). Ausgewertet wurden die Ergebnisse durch das Programm ScaffoldViewer 4.

<u>MOPS-Puffer</u>		<u>Fixierlösung</u>	
MOPS	50 MM	Ethanol	40 % (v/v)
Tris/Base	50 mM	Essigsäure	10 % (v/v)
EDTA	1 mM		In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
SDS	0,1 % (w/v)		
	In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		

5.2.12. Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung von Coomassie-Färbungen, immunologischen Detektionen oder radioaktiven Signalen wurde die Software ImageQuant TL 5.1 verwendet. Hierbei wird von der Software die Farbintensität/Farbdichte pro Fläche ausgewertet, wodurch ein Vergleich zwischen den Proben erfolgen konnte. Entscheidend hierbei ist, dass die Intensität in einem linearen Bereich bleibt, die Probe dementsprechend während des Scannens nicht zu intensiv angeregt wird und damit übersättigt wäre. Die Zahlenwerte wurden in Microsoft Excel übertragen, verrechnet und zur grafischen Darstellung in Sigma Plot und CoreIDRAW verarbeitet.

5.3. *In vitro* Protein Synthese und Transport

Das Arbeiten *in vitro* bedeutet, dass nicht mit intakten Zellen gearbeitet wird, bietet aber in diesem Fall den großen Vorteil spezifisch den Transport einzelner Proteine verfolgen zu können. Das bedeutet hier, dass mit selbst hergestellten SPZ gearbeitet wurde, in denen die Translokation von einzelnen Polypeptiden über die ER Membran untersucht wurde. Dies konnte entweder gekoppelt oder unabhängig von der Transkription der mRNA geschehen, sowie unter co- oder posttranslationalen Bedingungen. Schlüsseltechnik war hier die radioaktive Markierung der zu transportierenden Proteine während deren Synthese.

5.3.1. Synthese von mRNA mittels T7 oder SP6 Polymerase

Im *in vivo* System geht der Translation von genetischer Information (mRNA) in ein Polypeptid der Schritt der Transkription voraus, bei der eine Abschrift von der DNA in Form von mRNA transkribiert wird. Diese mRNA enthält dann die nötigen Informationen zur Bildung des Polypeptids (Zentrales Dogma der Molekularbiologie (Crick 1970)). Da durch die Verwendung von SPZ dieser Ablauf nicht mehr möglich ist, da zuvor durch die Nucleasebehandlung sowohl

DNA als auch RNA abgebaut wurde, wurde eine *in vitro* synthetisierte mRNA in die SPZ eingebracht. Diese wird dann spezifisch translatiert und es befindet sich nahezu ausschließlich nur dieses Transportsubstrat in der semi-intakten Zelle. Durch den Einsatz von Polymerasen und einem Plasmid mit der Gensequenz für das spezifische Transportsubstrat wurden ebendiese mRNAs, auch Transkripte genannt, generiert. Hierbei war es wichtig, dass den Sequenzen entweder ein SP6- oder ein T7-Promotor vorgelagert war, da diese beiden Promotoren jeweils den Bindungspunkt für die Phagen RNA-Polymerasen SP6 oder T7 bieten, die sehr spezifisch agieren und die mRNA bilden (Axelrod & Kramer 1985; Chamernlin & Ring 1973; Melton et al. 1984). Die Synthese erfolgte für 3 h bei 40 °C im Wasserbad, nach dem folgenden Pipettierschema. Die Reaktion wurde durch das Einfrieren im flüssigen Stickstoff abgestoppt. Die Transkripte wurden entweder direkt verwendet, oder bei -80 °C gelagert.

Pipettierschema:

Prämix A	30 µl
Plasmid-DNA	1 µg
m ⁷ GpppG (Cap)	2,5 µl
RNasin (40 U/µl)	1,5 µl
SP6 / T7 Polymerase (20 U/µl)	1 µl
H ₂ O <small>bidest</small>	ad 50 µl

Lösungen:

<u>10x Salzlösung</u>	
HEPES/KOH;pH7,4	400 mM
MgAc ₂	60 mM
Spermidin	20 mM
	in H ₂ O <small>bidest</small>

<u>Prämix A</u>	
10x Salzlösung	10 %
BSA	0,16 mg/ml
DTT	10 mM
Nukleotid-mix	0,5 mM
GTP	0,1 mM
	in H ₂ O <small>bidest</small>

Nukleotid Mix

Je ATP, UTP, CTP	je 50 mM
In HEPES/KOH; pH 7,4	10 mM

m⁷GpppG-Lösung

m ⁷ GpppG	5 U
In 10 mM HEPES/KOH; pH 7,4	300 µl

5.3.2. *In vitro* Transport und radioaktive Markierung von Substraten

Um den *in vitro* Transport von Polypeptiden zu ermöglichen, wurde Zugang zur Zelle benötigt. Dies wurde durch die Präparation der SPZ (Kap. 5.5.5) erreicht, was allerdings dazu führte, dass die zytosolischen Komponenten der Zelle aus ebendieser entfernt wurden. Als zytosolischer Ersatz wurde ein „*Rabbit Reticulocyte Lysate System Nuclease Treated*“ von der Firma Promega verwendet. Dieses Lysate wurde aus Reticulocyten gewonnen, der finalen Vorstufe von Erythrozyten, die weder Zellorganellen noch Nukleus, jedoch alle zur Translation benötigten Komponenten beinhalten (Koepke & Koepke 1986). Durch die Behandlung mit Nuclease wurde ebenfalls die in den Reticulocyten enthaltenen Nukleinsäuren abgebaut, sodass eine störungsfreie *in vitro* Synthese ermöglicht wurde (Pelham & Jackson 1976). Für das Experiment konnten verschieden vorbehandelte Zellen verwendet werden, die beispielhaft

mit einem Plasmid transfiziert wurden (Kap. 5.5.3) Neben dem Lysat und den SPZ wurden dem Reaktionsmix weiterhin die spezifische mRNA des Proteins von Interesse, zu dessen Schutz den RNase-Inhibitor RNasin, ein Aminosäuremix ohne Methionin und ^{35}S markiertes Methionin zugegeben (Pipettierschema Tab. 11). Das radioaktive ^{35}S -Methionin wurde während der Synthese des Polypeptids in dieses eingebaut. Somit wurde ein radioaktiv markiertes Protein generiert. Der Transport über die ER-Membran wurde durch eine Größenänderung nach der posttranslationalen Modifikation angezeigt, dessen Effizienz durch den Vergleich zwischen der Abundanz der transportierten Form und des Gesamtproteins ermittelt wurde. Die besagten posttranslationalen Modifikationen können auf zwei Weisen erfolgen: (i) Durch die Abspaltung der Signalsequenz wird das Polypeptid nach dem Eintritt in das ER verkürzt und die molekulare Masse wird und/oder (ii) das Polypeptid wird im ER glykosyliert, was eine Steigerung des Molekulargewichts zur Folge hat (Zimmermann et al. 2011).

Der Transport konnte in zwei unterschiedlichen Modi erfolgen. Während im cotranslationalen Transport die Membranfraktion (d.h. SPZ) zeitgleich zur Translation vorhanden war und ein simultaner (cotranslatinaler) Transport ablief (60 min; 30 °C), wurden beim posttranslationalen Transport die Schritte von Translation und Translokation getrennt. Dazu wurde die Translation nach 30 min durch die Zugabe von RNase A (Abbau der mRNA (Messmore et al. 1995)) und Cycloheximid (Blockierung der Translation am Ribosom (McKeehan & Heardesty 1969)) abgestoppt und erst dann die Membranfraktion, in Form von SPZ, für weitere 30 min zugegeben. Durch die abschließende Zugabe von 15 μl 2x Laemmli und dem Erhitzen für 5 min bei 95 °C wurde sowohl die Reaktion abgestoppt als auch die Proben für die folgende SDS-PAGE vorbereitet. Die Gele wurden im Anschluss getrocknet (Kap. 5.2.5) und mit Hilfe von Autoradiographie (Kap. 5.3.3) ausgewertet.

Tab. 11: Pipettierschema einer *in vitro* Transportreaktion je unter co- oder posttranslationalen Bedingungen.

Komponente	Cotranslational [μl]	Posttranslational [μl]
Reticulocytenlysat	2,5	2,5
Aminosäuremix-Met (1 mM)	0,1	0,1
RNasin (40 U/ μl)	0,1	0,1
mRNA (1 μg)	0,2	0,2
^{35}S -Met (1000 Ci/mMol)	0,2	0,2
H ₂ O [μl]	0,3	0,3
		Inkubation 30 min, 30°C <u>Translation</u> , dann RNase A 0,25 μl Cycloheximid 0,25 μl Inkubation 5 min, 30 °C <u>Translationsstopp</u>
SPZ (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1,6	1,6
Inkubation	60 min, 30°C	30 min, 30 °C

	Translation und Transport	Transport
--	---------------------------	-----------

5.3.3. Autoradiographie

Zur Visualisierung der Radioaktivität, die im Rahmen von *in vitro* Transporten zur Markierung von Transportsubstraten genutzt wurde, wurden sogenannte Phosphorimaging-Platten verwendet. Hierbei handelt es sich um mit Europium (Eu^{2+}) beschichtete Platten, die mit den getrockneten SDS-PAGE-Gelen in direkten Kontakt gebracht wurden. Die gelaufenen Gele mussten dazu zunächst getrocknet werden (Kap. 5.2.5), um zum einen die Beschichtung der Platten nicht zu beschädigen, der Hauptgrund ist jedoch, dass die Flüssigkeit in den Gelen zu einer Abschwächung des Signals führen würde (Westermeier & Marouga 2005). Während diesem 6-48 h stündigen Kontakt, auch Exposition genannt, wird durch die vom ^{35}S -Methionin ausgehende β -Strahlung (Energie) das Eu^{2+} zu Eu^{3+} oxidiert und das abgegebene Elektron in der Phosphorschicht gespeichert. Die Expositionszeit hängt von der Expressionseffizienz und dem Methioningehalt im Transportsubstrat ab, da dieser die eingebaute Radioaktivmenge bestimmt. Die Speicherung der Energie erfolgt in Abhängigkeit der Stärke des radioaktiven Signals, welches definiert wurde durch die Menge des transportierten Proteins (Kap. 5.3.2), was die Quantifizierung der transportierten Proteine durch Bestimmung der gespeicherten Energie ermöglichte (Johnström et al. 2012). Nach der Exposition wurde durch den Einsatz eines roten Lasers während des Scannens das gespeicherte Elektron wieder freigesetzt, Eu^{3+} zurück zu Eu^{2+} reduziert und die Energie als blaues Licht abgegeben. Dieses wurde direkt detektiert und liefert eine digitale Abbildung über Lokalisierung und Intensität der gespeicherten Energie. Dieser Prozess erfolgte mit dem TyphoonTrio™, wodurch das radioaktive Signal in ein digitales Signal umgerechnet und darauf folgend quantifiziert wurde.

5.3.4. Modifikation durch 4-PBA Behandlung

Die *in vitro* Transporte konnten experimentell durch die Behandlung mit Modifikatoren erweitert werden. In diesem Fall wurde das chemische Chaperon 4-PBA verwendet. Durch die Behandlung der SPZ mit 4-PBA sollte die Faltungskapazität und damit die Transporteffizienz der Zellen erhöht werden (Iannitti & Palmieri 2011). Hierfür wurde 1 mM 4-PBA dem Transportansatz direkt zugegeben und das Transportexperiment in der üblichen Weise durchgeführt (Kap. 5.3.2).

5.3.5. Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation

Durch die Verwendung des „TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System“ der Firma Promega konnte sowohl Transkription als auch Translation in einem Schritt und einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Hierbei wurde anstelle von mRNA als Ausgangsmaterial DNA verwendet, die ebenfalls einen SP6 oder T7 Promotor vor der codierenden Sequenz des Polypeptids trug. Diese Form des *in vitro* Transports wurde für die verschiedenen Formen von

Uromodulin und Renin verwendet, da diese in diesem System eine höhere Effizienz zeigten. Neben den aus Kapitel 5.3.2 beschriebenen Komponenten wurde diesem System zusätzlich die Polymerase sowie der entsprechende Puffer zugegeben. Die synthetisierten Proteine wurden ebenfalls mit radioaktivem ^{35}S -Methionin markiert und wurden durch die Autoradiographie ausgewertet.

Pipettierschema

TNT [®] Reticulozytenlysat	2,5 μl
TNT [®] -Puffer	0,2 μl
SP6- / T7- RNA Polymerase (20 U/ μl)	0,2 μl
^{35}S -Methionin (1000 Ci/mMol)	0,2 μl
Plasmid DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,2 μl
RNasin (40 U/ μl)	0,1 μl
AS Mix ohne Methionin (1 mM)	0,1 μl
SPZ (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1,0 μl
H ₂ O	0,5 μl

Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 30 °C, die Reaktion wurde durch die Zugabe von 15 μl 2x Laemmli abgestoppt. Bevor die Proben auf das SDS-PAGE Gel geladen wurden, wurden sie für 10 min bei 95 °C erhitzt. In dieser Arbeit wurde diese Art der Synthese und des Transportes für die Transportsubstrate Renin und Uromodulin verwendet.

5.4. Methoden der DNA-Manipulation

Die in den folgenden Abschnitten aufgeführten Techniken dienen der *in vitro* Mutagenese von DNA-Fragmenten mittels PCR oder Restriktionsverdau. Ebenfalls werden die Vorgehensweisen beschrieben, die zur Gewinnung und Analyse dieser DNA benötigt werden.

5.4.1. Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen

Unter der Transformation von *E. coli* Zellen versteht man die Aufnahme von Plasmiden, zirkulären DNA-Fragmenten, die dem Organismus per se fremd sind. Da Bakterien von sich aus eine geringe Transformationskompetenz aufweisen, wird diese durch die Behandlung mit den beiden aufgeführten Puffern gesteigert. Hierbei war die Behandlung und die Lagerung mit Calciumchlorid versetzten Puffer von zentraler Bedeutung, denn dieses erhöht die Permeabilität der Zellmembran (Hanahan 1983).

Um zu garantieren, dass genetisch identische Zellen in den Experimenten verwendet werden, wurden bestehende kompetente *E. coli*-Zellen in einem Verdünnungsausstrich auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 10 ml *lysogeny broth* (LB)-Flüssigmedium überführt. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht im Rotationsschüttler wurde durch das Übertragen von 2 ml dieser Vorkultur ein größeres Volumen von 200 ml LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 kultiviert und dann bei 4 °C für 5 min bei 6000 rpm (JA-20 Rotor) zentrifugiert. Das überstehende LB-Medium wurde verworfen, das Pellet in 80 ml

gekühltem Puffer 1 aufgenommen und für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 8 ml Puffer 2 aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen aliquotiert (100 µl) und direkt mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um die Transfektionskompetenz der Zellen zu definieren, wurden 100 µl der *E. coli*-Suspension mit 10 pg Bluescript-DNA transformiert (Kap. 5.4.2). Die Bakterien wurden auf einer LB Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die bis zum nächsten Tag gewachsene Anzahl Kolonien definiert die Transfektionskompetenz der Zellen. Diese sollte mindestens bei $1 \cdot 10^6$ liegen.

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

5.4.2. Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen mit Plasmid

Bakterielle Zellen wurden in dieser Arbeit nur zum Zweck der Plasmidamplifikation eingesetzt. Wenn neu klonierte Plasmide (Kap. 5.1.6) zum ersten Mal in *E. coli*-Zellen transformiert wurden, wurden JM101-Zellen verwendet. Zur Amplifikation von Plasmiden welche im weiteren Verlauf für die Transfektion von Zellen verwendet wurden (Kap. 5.5.3) wurden *E. coli* des Genotyps DH5α verwendet.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg der DNA versetzt und dann für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit sollte die Plasmid DNA von den kompetenten Bakterien aufgenommen werden, was zusätzlich durch einen anschließenden Hitzeschock bei 42 °C gefördert wurde. JM101 Zellen wurden für 90 Sekunden, DH5α für 60 Sekunden dieser Hitze ausgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde danach erneut eine Minute auf Eis gelagert, darauffolgend mit 500 µl LB Medium versetzt und bei 37 °C für 60 min rotiert. Abschließend wurden 100 ml Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum vorbereitet (1/1000 verdünnt) und mit der Bakteriensuspension inokuliert. Dadurch wurden die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, während der mindestens 24 h dauernden Wachstumsphase selektioniert. Abschließend wurden aus den Bakterien die vervielfältigte Plasmid-DNA isoliert, wie im Folgekapitel beschrieben (Kap. 5.4.3).

Wenn neue Plasmide generiert wurden, wurden die für eine Stunde inkubierten transformierten JM101-Zellen abzentrifugiert, 500 µl Überstand abgenommen und die verbliebenen 100 µl auf einer LB-Platte ausgestrichen, die mit Selektionsantibiotikum versetzt war. Aufgrund des

dadurch entstehenden Selektionsdrucks sollten nur Zellen wachsen, die ein Plasmid mit der entsprechenden Resistenz aufgenommen hatten. Dadurch konnten einzelne Bakterienkulturen auf der Platte ausgewählt werden, wodurch sichergestellt wurde, dass im Folgenden mit einem Plasmid gearbeitet wurde, und keine unterschiedlichen Plasmidvarianten vorlagen.

<u>LB-Medium</u>		<u>Antibiotika</u>	
LB-Medium	2,5 %	Kanamycin	25 mg/ml
	In H ₂ O <small>bidest</small>	Ampicillin	100 mg/ml
			jeweils in H ₂ O <small>bidest</small>

<u>LB-Platten</u>	
LB Medium	2,5 %
LB Agar	1,5 %
Antibiotikum	1/1000
	In H ₂ O <small>bidest</small>

5.4.3. Präparation von Plasmid DNA

Zur Gewinnung der Plasmide aus den transformierten *E. coli*-Kulturen (Kap. 5.4.2) wurden verschiedene Kits nach Herstellerangaben verwendet. Diese unterscheiden sich hauptsächlich in dem für die Präparation verwendeten Volumen der *E. coli*-Kultur und werden in Mini-(2 ml) oder Midi-Kits (100 ml) eingeteilt.

Das Prinzip des Mini- oder Midi-Kits ist identisch. Die Bakterienkultur wurde per Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Resuspensions-Puffer aufgenommen, in welchem RNase zum Abbau der bakteriellen RNA diente. Die vollständige Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe einer SDS-NaOH-Lösung. Bakterielle Bestandteile und Zelltrümmer wurden durch das Hinzufügen des Neutralisierungs-Puffers ausgefällt und im anschließenden Zentrifugationsschritt pelletiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde auf eine Säule gegeben, in der die DNA an eine Kieselgelmatrix band und mehrfach gewaschen wurde. Im Fall einer Midi-Prep wurde die DNA durch einen Hochsalzelutionsschritt von der Matrix gelöst und in Isopropanol aufgefangen, zentrifugiert und mittels Ethanol gereinigt. Nachdem das aus DNA bestehende Pellet getrocknet wurde, wurde es in TE-Puffer oder in H₂O_{bidest} aufgenommen. Durch eine Mini-Prep aufgereinigte DNA wurde direkt mit Wasser von der Matrix eluiert. Bestimmt wurden Reinheit und Konzentration der Proben mittels Nanodrop (Kap. 5.4.4). Die DNA konnte bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert werden. Angaben über verwendete Volumina und Inkubationszeiten können in den Handbüchern des Promega PureYield™ Plasmid Miniprep Systems und des Qiagen Plasmid-Midi-Kits entnommen werden.

TE-Puffer

Tris; pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
	In H ₂ O _{bidest}

5.4.4. Bestimmung der DNA-Konzentration und-Reinheit

Zur Analyse der Qualität und Quantität von Nucleinsäure wurde das Nanodrop-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet. Hier werden geringe Mengen einer Probe auf ihre Absorption bei spezifischen Wellenlängen analysiert. Da Nucleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und aromatische Aminosäuren von Proteinen bei 280 nm besitzen, kann sowohl die Menge der DNA, als auch die Reinheit der Probe durch diese photometrische Messung bestimmt werden. Die Menge der DNA wird durch die Umrechnung der Absorption bei 260 nm mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt, während die Reinheit der Probe durch die Bildung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gebildet wird (Hauk 2013). Hierbei steht ein Wert von 1,8 für reine DNA, bei einem Wert kleiner 1,8 beinhaltet die Probe viel Protein, bei einem Wert größer als 1,8 viel einzelsträngige Nucleinsäure, also RNA. Diese zeigt eine deutlich stärkere Absorption als die doppelsträngige DNA.

Die Reinheit und die Konzentration der gemessenen Probe wurden automatisch ausgegeben. Zur weiteren Verwendung wurde die jeweilige Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

5.4.5. Isolation von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation und Reinigung der genomischen DNA aus HEK-Zellen wurde ein Kit von Qiagen genutzt (DNeasy® Blood & Tissue Kit). Hierfür wurden die kultivierten Zellen nach der bekannten Methode geerntet und gezählt (siehe Abschnitt 5.5.2). Für die Aufreinigung wurden maximal $5 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgt durch den Einsatz von SDS und Proteinase K. Zeitgleich wurde RNaseA zugegeben (f.c. 1,6 mg/ml), wodurch RNA abgebaut und die Aufreinigung reiner DNA ermöglicht wurde. Das so behandelte Lysat wurde auf eine Säule gegeben, auf der die DNA durch elektrostatische Wechselwirkung an eine Kieselgelmatrix bindet. Nach zwei Waschsritten wurde die DNA mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und war direkt zur weiteren Verarbeitung verfügbar. Die einzusetzenden Volumina und Zentrifugationsbedingungen sind im Handbuch einzusehen. Nach der Elution wurden die Proben photometrisch vermessen, auf eine definierte Konzentration eingestellt und auf einem niedrigprozentigen Agarosegel (Kap. 5.4.6) kontrolliert.

5.4.6. Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung und Identifizierung von isolierter DNA, Restriktionsfragmenten oder Produkten einer PCR, wurden ein Agarosegele verwendet.

Hierbei wird identisch zum Prinzip der SDS-PAGE die Probe durch eine Gelmatrix geführt und der Größe nach aufgetrennt. Kleinere Fragmente wandern hier ebenfalls weiter als größere, wodurch schlussendlich durch den Abgleich mit einem definierten Marker auch eine Größenidentifizierung der Probe ermöglicht wird. Die Trennung größerer Fragmente (>5kb) erfolgte besser in niedrigprozentigen Gelen (0,5% w/v Agarose), kleinerer Fragmente in höher prozentigen Gelen (1-2 % w/v Agarose). Anders als bei der SDS-PAGE müssen die Proben hier nicht mit einer negativen Ladung maskiert werden, denn durch das Phosphatrückrat der DNA ist eine negative Ladung von sich aus gegeben und die Probe wandert im elektrischen Feld zur Anode hin (Lee et al. 2012).

Zur Herstellung des Agarosegels wurde die jeweilige Menge Agarose (w/v) mit 100 ml TAE-Puffer gemischt und durch Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst. Die heiße Flüssigkeit wurde in einen Gelschlitten gegossen und mit einem Kamm versehen, der als Platzhalter für spätere Probenaschen dient. Nach dem Erkalten und Aushärten des Gels konnte dieses unmittelbar genutzt oder feucht eingeschlagen bei 4 °C aufbewahrt werden. Das Gel wurde in die horizontale Elektrophoresekammern eingelegt, die Taschen zur Kathode orientiert, und vollständig mit TAE-Puffer übergossen. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit 6x Proben-Puffer versetzt. Dadurch erhält die Probe eine höhere Dichte und sinkt in die Probenaschen ab, gleichzeitig wird eine farbliche Lauffront gebildet, anhand welcher die Laufweite der Elektrophorese abgeschätzt werden konnte. Die Elektrophorese wurde bei 100 mA für bis zu 2 h durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in einer GelRed-Lösung über Nacht gelagert, um die DNA farblich zu markieren. Der Farbstoff interkalierte mit der im Gel befindlichen DNA und wurde durch die Bestrahlung mit UV-Licht visualisiert (Crisafuli 2015). Dies erfolgte durch den Image Master® VDS.

1x TAE-Puffer

Tris-Acetat; pH 8,0	40 mM
EDTA	1 mM
	in H ₂ O bidest

GelRed-Lösung

GelRed (10.000x)	7,5 µl
	in 100 ml H ₂ O bidest

6x DNA-Proben-Puffer I dunkel

(Bande bei 3000 bp)	
Xylemcyanol	0,25 %
Sucrose	40 %
	in H ₂ O bidest

6x DNA-Proben-Puffer I hell

(Bande bei 500 bp)	
Bromphenolblau	0,25 %
Sucrose	40 %
	in H ₂ O bidest

5.4.7. Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen mittels PCR

Zur Qualitätssicherung wurden die HEK-Zellen mit *SEC61A1*-Mutanten (V67G und T185A), in regelmäßigen Zeitabständen auf deren genetische Identität überprüft. Dies stellte sicher, dass das in die Zellen integrierte, transgene *SEC61A1-FLAG* weiterhin vorhanden war. Zu diesem Zweck wurde die genomische DNA isoliert und mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden Primer

konzipiert, die spezifisch für das transgene *SEC61A1* waren. Der erste Primer bindet an der N-terminalen Sequenz von endogenem und transgenem *SEC61A1*. Der zweite, gegenläufige Primer bindet spezifisch an die FLAG-Sequenz, die lediglich am C-Terminus der eingebrachten *SEC61A1* Sequenz vorliegt. Dadurch wurde das integrierte *SEC61A1* spezifische aus der gesamten genomischen DNA amplifiziert und später unter Verwendung dieser und zwei weiterer Primer vollständig sequenziert. Der Erfolg der PCR wurde über ein Agarosegel nachgewiesen (5 µl PCR Produkt + 5 µl H₂O + 2 µl DNA-Lade-Puffer), bei dem eine Bande auf Höhe des zu erwartenden Amplifikats zu sehen sein sollte. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt um Polymerasen, die Target-DNA, dNTPs und weitere PCR-Bestandteile zu entfernen, die bei einer Sequenzierung hinderlich sein würden. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme des PCR Purification Kits von Qiagen. Nach einer abschließenden Konzentrationsmessung mittels Nanodrop wurden die Proben für die Sequenzierung vorbereitet.

Anschließend ist das Pipettierschema und das PCR-Programm zur Amplifizierung des integrierten *SEC61A1*-Konstruktes aufgeführt.

Pipettierschema PCR

10x PFU Polymerase-Puffer	2,5 µl	
dNTP	0,5 µl	(f.c. 0,2 mM)
fwd. Primer (RZ 747)	2,5 µl	(f.c. 0,5 µM)
rev. Primer (RZ 748)	2,5 µl	(f.c. 0,5 µM)
PFU Polymerase	0,5 µl	(f.c. 0,05 U/µl)
DNA	x µl	(f.c. 10 ng)
H ₂ O	ad 25 µl	

PCR-Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]	
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	30	} 35 Zyklen
Annealing	58,4	30	
Extension	72	300	
Extension	72	120	
Lagerung	8	∞	

Sequenzierproben

Primer	4 µl	(f.c. 1,4 µM)
DNA	x µl	(f.c. 100 ng/µl)
H ₂ O	ad 14 µl	

5.4.8. Nachweis von mRNA mittels qRT-PCR

Durch die Verwendung der *quantitative real time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) konnte die relative vorhandene Menge spezifischer mRNA-Zielsequenzen innerhalb einer Probe bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde mRNA mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) aus $1 \cdot 10^6$ Zellen gewonnen. Durch den Einsatz von DNase wurde eine Verunreinigung der Probe durch DNA während der Präparation ausgeschlossen. Aus der auf diese Weise

gewonnen RNA wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase (Super Script® VILO™, Invitrogen) cDNA hergestellt, die durch das QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) aufgereinigt wurde. Die Bestimmung der relativen Menge der mRNA-Sequenz eines bestimmten Proteins war, wurde diese cDNA in qRT-PCR Assays eingesetzt. Diese erfolgten in 96 well-„MicroAMP“ plates. Pro Vertiefung wurden folgende Volumina pipettiert:

TagMan Gene Expression Mastermix	5 µl
TagMan Expression Assay (Primer und Sonde)	0,5 µl
cDNA	25 ng
H ₂ O	ad 10 µl

Die Platte wurde durch eine Folie versiegelt und nach einer kurzen Zentrifugation im qRT-PCR Cycler (*StepOne Plus 96-well System*, Applied Biosystems) platziert. Der Nachweis der Zielsequenzen erfolgte durch spezifisch gegen diese Sequenzen gerichtete Sonden (Tab. 7), welche 5´ durch einen Fluorophor und 3´ durch einen Quencher erweitert waren. Durch die Nukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase wurden während der Elongationsphase Fluorophor und Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal konnte vermessen werden. Durch die exponentielle Synthese der Zielsequenz wurde die Signalintensität mit jedem Zyklus gesteigert. Verglichen wurde die daraus resultierende gemessene Menge der Zielsequenz gegen die des mitgeführten Haushaltsgen ACTB mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode.

5.4.9. Generierung modifizierter *inserts* zur Verwendung im Nanobit-System

Die Grundlage des NanoBit-Systems ist die Synthese von Proteinen, die mit bestimmten Reporterstrukturen fusioniert wurden (Kap. 5.2.9). Für diese Fusionierung wurden die kommerziell verfügbaren Plasmide der Firma Promega genutzt, in denen die Sequenz für einen LgBit oder einen SmBit codiert waren, entweder 5´ oder 3´ einer *multiple cloning site*. Dadurch wurde es ermöglicht die Zielproteine entweder N- oder C-terminal mit einem der beiden Bestandteile der Luciferase zu fusionieren.

Die einzubauende Sequenz der Zielproteine, im folgenden *insert* genannt, wurde generiert, indem durch spezifische Primer an den Termini des *insert* Restriktionsschnittstellen eingebracht wurden. Diese wurden passend auf den jeweiligen Vector angepasst, sodass kein *frameshift* nach der erfolgreichen Klonierung entsteht. Dabei wurde stets beachtet, dass keine Mutation in den codierenden Bereich eingebracht wurde, außer die Plasmide sollten C-terminal markiert werden. In diesem Fall wurde die terminale Stoppssequenz deletiert, damit in der Zelle der *tag* ebenfalls translatiert wurde. Die einzelnen Schritte der PCR wurden sowohl an die Länge des PCR Produktes (PFU-Polymerase synthetisiert 0,5 kb/min) als auch an die *annealing* Temperaturen der jeweiligen Primer angepasst. Beispielhaft sind hier die Bedingungen zur Generierung eines hSnd2-*insert* aufgeführt, das N-terminal markiert wurde.

Pipettierschema PCR

10x PFU Polymerase-Puffer	10 µl	
dNTP	2,0 µl	(f.c. 0,2 mM)
fwd. Primer (RZ 747)	2,0 µl	(f.c. 0,1 µM)
rev. Primer (RZ 748)	2,0 µl	(f.c. 0,1 µM)
PFU Polymerase	1,0 µl	(f.c. 0,025 U/µl)
DNA	2,0 µl	(f.c. 1 ng/µl)
H ₂ O	ad 100 µl	

PCR Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [sek]	
Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	30	} 35 Zyklen
<i>Annealing</i>	52	30	
Extension	72	90	
Extension	72	120	
Lagerung	8	∞	

Die Analyse des PCR-Produktes im Agarosegel stellt den Erfolg der PCR sicher (Kap. 5.4.6) und das Amplifikat wurde darauffolgend mit Hilfe eines PCR Purification Kits (Qiagen) aufgereinigt. Dieses verfolgt ein identisches Prinzip zu den Miniprep-Kits (Kap. 5.4.3). Die DNA band an die Matrix, während Polymerasen, Primer und Salze ausgewaschen und die DNA abschließend durch Wasser eluiert wurde. Damit Insert und Plasmid gerichtet miteinander ligiert werden konnten, wurden beide mit übereinstimmenden Restriktionsenzymen verdaut (Kap. 5.4.10). Die aufgereinigten Restriktionsprodukte wurden durch die T4-Ligase miteinander verknüpft und so ein vollständiges Plasmid generiert (Kap. 5.4.11). Zur Amplifikation dieses Plasmids wurde eine Transformation in JM101-Zellen durchgeführt und die Bakteriensuspension auf einer Selektionsplatte ausgestrichen (Kap. 5.4.2). Einzelne Kolonien wurden gepickt, in 2 ml TB-Selektionsmedium übertragen und über Nacht inkubiert. Durch Minipreps wurden die Plasmide aus den *E. coli*-Zellen gewonnen (Kap. 5.4.3). Die aufgereinigten Plasmide wurden auf zwei Weisen auf ihre Korrektheit überprüft. Zum einen wurden die Plasmide sequenziert, zum anderen wurde auch ein weiterer Restriktionsverdau durchgeführt, bei dem zwei Fragmente mit definierter Größe entstehen mussten. Waren beide Kontrollen positiv, wurde mit dem entsprechenden Plasmid eine Midiprep durchgeführt, um eine entsprechende Menge des Plasmides für den Einsatz in *in vivo* Experimenten zu generieren.

5.4.10. Restriktionsverdau von *inserts* und Plasmiden

Zur Erzeugung von DNA-Fragmenten mit definierten Enden oder der Kontrolle von Plasmiden, wurden verschiedene Restriktionsenzyme von ThermoFisher eingesetzt. Restriktionsenzyme besitzen eine spezifische Zielsequenz, mit Hilfe derer sie an die DNA binden und diese innerhalb einer spezifischen Sequenz spalten. Zur gerichteten Insertion wurden Enzyme verwendet, die sogenannte *sticky ends* generieren, also das 3'- und das 5'-Ende der DNA

ungleichmäßig schneiden und so ein an den jeweiligen enden der DNA ein ungleicher Überhang der Stränge entsteht. Diese Überhänge ermöglichten im weiteren Verlauf eine zielgerichtete Ligation. Da Restriktionsenzyme unterschiedliche Pufferbedingungen benötigen, speziell wenn ein Doppelverdau erfolgen sollte, wurden diese Bedingungen zu Beginn auf der Homepage von ThermoFisher kontrolliert (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>). Dort konnten Dauer und Temperatur der Reaktion sowie der benötigte Puffer und die einzusetzende Menge des Enzyms ermittelt werden. Nachfolgend wird beispielhaft das Pipettierschema für einen Doppelverdau gezeigt, sowohl für das in 5.4.8 beschriebene *insert* als auch für den Vektor, in welchen das *insert* eingefügt werden sollte.

<u>Insert</u>		<u>Plasmid</u>	
PCR Produkt	20 µl	Plasmid (1 µg/µl)	2 µl
10x Tango-Puffer	8 µl	10x Tango-Puffer	8 µl
Bgl2	0,2 µl	Bgl2	0,2 µl
Xho1	0,2 µl	Xho1	0,2 µl
H ₂ O	11,6 µl	H ₂ O	31,6 µl

Die Proben wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Falls Plasmide verwendet wurden, wurde ein weiterer Schritt durchgeführt, bei dem durch die Verwendung von 2 µl *cal* *intestine phosphatase* (CIP) geschnittene 5'-Enden der DNA dephosphoryliert wurden und somit eine Religation des Plasmids ohne *insert* reduziert wurde. Die Proben wurden vollständig auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Nach dem Anfärben wurde die DNA aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Kits (QIAquick Gel Extraction Kit) aus der Gelmatrix isoliert. Durch diesen Schritt wurde sichergestellt, dass etwaige ungewollte Fragmente, sowie der interkalierte Farbstoff entfernt und nur die geschnittene DNA in den nächsten Arbeitsschritten verwendet wurde. Zur Überprüfung des korrekten Einbaus der *inserts* wurden diese Plasmide ebenfalls mit zwei Restriktionsenzymen verdaut, von denen eines im Vektor und das andere nicht mittig im *insert* schnitt, sodass, abhängig von der Insertionsorientierung, unterschiedlich große Fragmente entstehen, die Ebenfalls durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert wurden.

Beispielhafter Restriktionsverdau zur Kontrolle von Plasmiden

DNA	0,5 µg
Puffer	1 µl
Enzym 1	0,2 µl
Enzym 2	0,2 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Die Kompatibilität und die benötigten Pufferbedingungen der Enzyme für den Deoppelverdau wurden ebenfalls von der oben genannten Webseite bestätigt.

5.4.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Um die durch einen Restriktionsverdau generierten DNA-Fragmente zu verbinden, wurde ein natürlicher DNA-Reparationsmechanismus der Zelle genutzt. Dieser setzt normalerweise ein, sobald Strangbrüche im Erbgut detektiert werden. In diesem Fall wurde die aus Phagen stammende T4-DNA-Ligase verwendet. Diese verknüpft das 5`-Phosphatende der DNA zum Beispiel des *inserts*, mit einer freien 3`-Hydroxylgruppe des geschnittenen Vektors. Die Ligation selbst erfolgt ungerichtet, steuerbar war der Prozess jedoch durch die zuvor ausgewählten Restriktionsenzyme. Wenn *sticky ends* generiert wurden, lagern sich die entsprechend komplementären DNA-Abschnitte aneinander an und das Phosphat-Rückgrat wird durch die Ligase miteinander verbunden. Zwischen Vektor und dem einzubauenden *insert* wurde in der Regel ein 1/3 Verhältnis gewählt. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Vom entsprechenden Produkt wurden 4 µl genutzt, um JM101-Zellen zu transformieren (Kap. 5.4.2) und so die DNA zu vervielfältigen. Der Erfolg der Ligation und Transformation wurde durch das Wachstum auf LB-Selektionsplatten überprüft.

Ligation

Insert	3 µl
Plasmid	1 µl
Ligations-Puffer	1 µl
Ligase	0,4 µl
H ₂ O	4,6 µl

5.4.12. Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden

Für die Sequenzierung generierter PCR-Produkte oder Plasmide wurde der Service der Firma LGC in Berlin in Anspruch genommen. Diese führten die Sequenzierung durch und stellten diese Analysen (Sequenz und Qualität der Ergebnisse) in deren Onlineportal zur Verfügung. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms DNASTAR SeqMan mit der Originalsequenz abgeglichen und mutierte Stelle identifiziert.

Die Probenvorbereitung für PCR-Produkte und Plasmide war grundsätzlich identisch. Das in der Regel gewählte *Ready to Run* Angebot beruht darauf, dass zu sequenzierende Probe und der jeweilige Primer zusammen in einem Reaktionsgefäß an LGC geschickt wurden. Die von der Firma gegebenen Voraussetzung sind ein Gesamtvolumen von 14 µl pro Reaktion, davon 4 µl Primer mit einer Konzentration von 50 µM und dem zu analysierenden PCR-Produkt (40 ng/µl) oder Plasmid (100 ng/µl). Bei der Wahl der Primer wurde beachtet, dass diese ca. 50 Nucleotide vor der Sequenz von Interesse ansetzten, da die ersten Nucleotide nicht mit ausreichender Sicherheit sequenziert werden können. Ebenfalls wurde beachtet, dass die

Sequenzierung nicht endlos erfolgen kann, sondern nach ca. 800 bis 1000 Nucleotiden ihre Zuverlässigkeit verliert. Daher war es für Fragment mit einer bestimmten Länge nötig etappenweise zu sequenzieren und die Resultate *in silico* mit Hilfe des Programms SeqMan zu fusionieren. Die verwendeten Primer sind in Tab. 8 aufgeführt.

5.5. Zellkulturtechniken

Die Zellkultur schafft eine möglichst aussagekräftige Modellsituation, in der Methoden und Effekte studiert werden können, die als Basis für zelluläre Analysen genutzt werden können. Trotz der bahnbrechenden Erfolge die durch die Verwendung von Zelllinien, wie beispielsweise der HeLa-Zelllinie, erreicht wurden, muss immer beachtet werden, dass es sich hierbei um entartete, bzw. immortalisierte Zelllinien handelt, die zwar fundierten einen, aber keinen nicht zwangsläufig stimmigen Ausblick auf die Prozesse im Gesamtsystem geben.

5.5.1. Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung beider in Kapitel 5.1.9 beschriebenen Zelllinien erfolgte auf die gleiche Art und Weise, unterschiedlich waren nur die zur Kultivierung verwendeten Medien. Für HeLa-Zellen wurde DMEM +GlutaMAX™-I Medium verwendet, während für die HEK-Zellen das Hyclone DMEM/F-12 verwendet wurde, dem G418 (finale Konzentration 0,8 mg/ml) zugegeben wurde. Beiden Medien wurden mit 10 % (v/v) FCS versetzt.

Standardmäßig erfolgte die Kultivierung der adhärennten Zellen in einer 75 cm² Zellkulturflasche in 15 ml Medium. Die Zellen wurden „gesplittet“, d.h. passagiert, sobald sie eine Konfluenz über 90 % aufwiesen. Dies erfolgte, indem das verbrauchte Medium abgesaugt wurde und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen wurden. Nach der Entfernung des PBS wurden die Zellen für fünf Minuten im Brutschrank mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) und dadurch von der Flasche abgelöst und vereinzelt. Die Zellen wurden in 9 ml Medium aufgenommen, wovon, je nach experimenteller Vorgabe, ein unterschiedlich großer Anteil verworfen und der gewünschte Anteil zurück in die Zellkulturflasche überführt wurde. Mit frischem, vorgewärmtem Medium wurde das Volumen auf 15 ml aufgefüllt und die passagierten Zellen erneut im Inkubator gelagert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Experimenten mit Zellen verschiedener Passagen zu gewährleisten, wurden diese immer am Vortag des Experiments 1:2 passagiert. Dadurch wurde eine vergleichbare Zellzahl, Zelldichte und auch Wachstumsphase der Zellen für das jeweilige Experiment generiert.

5.5.2. Zellzählung und Größenbestimmung mittels Cytometer

Im Verlauf der Arbeit war es für zahlreiche Experimente erforderlich Zellzahlen zu bestimmen. Die automatisierte Zählung der Zellen und die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte auf Basis einer Färbung mit Trypanblau, womit direkt auch die Viabilität der Probe ausgegeben wurde (Avelar-Freitas et al. 2014; Tennant 1964). In Folge einer ruptierten

Zellmembran dringt der Farbstoff in das Zytosol der Zellen ein und färbt diese vollständig blau ein. Solange die Zellmembran intakt ist, wird nur diese blau angefärbt, wodurch diese Zellen weiterhin als vital angesehen wurden. Zur Färbung wurden 10 µl der durch Trypsinbehandlung abgelösten Zellsuspension verwendet und mit 10 µl des Trypanblaus gemischt. Nach dem vortexen wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in eine Zählkammer pipettiert und diese im Cytometer „Countess™“ platziert. Während der Bestimmung der gesamten, lebenden, und toten Anzahl an Zellen wurde gleichzeitig automatisch deren Durchmesser ausgemessen, was ebenfalls für spätere Analysen genutzt wurde. Auf Basis der Anzahl vitaler Zellen wurden Zellzahlen für die verschiedenen Folgeexperimente verwendet

5.5.3. Manipulation von Säugerzellen durch Plasmide

Der Einsatz einer Plasmid-DNA hat eine extra-chromosomale Expression eines Proteins in intakten Zellen zur Folge, die unter anderem durch die eingesetzte DNA-Menge und Expressionsdauer reguliert werden kann. Während es sich um eine eingebrachte Fremd-DNA handelt, führt die Genexpression dazu, dass das translatierte Protein wie ein natürlicher Zellbestandteil behandelt wird, solange es nicht stark überexprimiert oder mit einem *tag* versehen ist, der Einfluss auf die Orientierung ausübt. Daher war die oben genannte Kontrolle des Expressionszeitraums und eingebrachter DNA-Menge für jedes Plasmid neu zu etablieren. Der Einsatz dieser Plasmide erfolgte mit unterschiedlichem Ziel. Im einfachsten Fall wurde die Plasmid-DNA in die ausgesäten Zellen integriert, damit diese ein Protein nach Wahl synthetisieren. Die Zellen wurden später geerntet und zum Beispiel für die Co-IP verwendet. Für die beschriebenen Techniken wurden zu Beginn $6 \cdot 10^5$ HeLa-Zellen in einer 6 cm Kulturschale in 4 ml Medium ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. In der Zeit sollten sich die Zellen absetzen und wieder adhärent wachsen. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt (ohne PBS-Waschschritt) und die Transfektion vorbereitet, indem serumfreies Opti-MEM™ in einem Reaktionsgefäß vorgelegt wurde, das Plasmid hinzugegeben wurde und abschließend das Transfektionsreagenz FuGENE®HD in die Lösung pipettiert wurde. Das Reagenz umschließt als non-liposomales Reagenz mit positiver Ladung die negativ geladene DNA und bildet Mizellen aus, die von der Plasmamembran integriert werden und so die DNA in die Zelle abgeben (Cullis & Hope 2017). Nach einem Vortexschritt und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden erneut für den spezifischen Zeitraum im Brutschrank gelagert und dann für Folgeexperimente genutzt. Volumina der einzelnen Lösungen und der Expressionsdauer sind in der nachfolgenden Tab. 12 dargestellt. Die Plasmidbehandlung für den Experimenttyp NanoBit ist spezifisch in Kapitel 5.2.9 aufgeführt, zur Kontrolle der Expression wurden diese jedoch wie in der Tabelle beschrieben transformiert.

Tab. 12: Pipettierschema der verwendeten Plasmide zur Expression in HeLa-Zellen.

Codiertes Protein	Plasmid-DNA [µg]	FuGENE®HD [µl]	Opti-MEM™ [µl]	Zeitraum [h]	Folgeexperiment
GCaMP ₆₋₁₅₀	2	5	100	24	ER-luminale Calciummessungen
hSnd2	2	8	190	24	Co-IP/NanoBiT
hSnd2-FLAG	2	8	190	24	Co-IP
hSnd2-S150N	2	8	190	24	Transportstudien/Sequestrierung
Renin-HA	2	8	190	24	<i>in vitro</i> Transport
Uromodulin-HA	2	8	190	24	<i>in vitro</i> Transport
TMEM109-FLAG	2	8	190	24	Co-IP
TMEM109	2	8	190	24	Co-IP/NanoBiT
Reep5	2	8	190	24	Co-IP
TMCO1	2	8	190	24	Co-IP
TRAP α	2	8	190	24	Sequestrierung/
TRAP β	2	8	190	24	Transportstudien/Sequestrierung
TRAP γ	2	8	190	24	Sequestrierung
NanoBit Plasmide	2	8	190	24	Expressionskontrolle
pCMV6-Entry	2	8	190	24	Kontrolle verschiedener Experimente

5.5.4. Manipulation von Säugerzellen durch 4-PBA

Der synthetische Stoff 4-Phenylbuttersäure (englisch 4-phenylbutric acid; 4-PBA) wird in der Medizin zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt oder erprobt. Hierzu gehören verschiedene neuronale Störungen, wie ALS oder Huntington, Krebs und Störungen des Harnstoffzyklus (Iannitti & Palmieri 2011). Die große Einsatzmöglichkeit des Medikamentes hängt mit der Vielseitigkeit der Wirkmechanismen zusammen. Es wird eine Aktivität als Histone-Deacetylase Inhibitor beschrieben, wodurch ein Einfluss auf die Transkription von tumorrelevanten und Zellzyklus Genen entsteht und so Zellwachstum und Differenzierung steuert (Feinmann et al. 2002; Nakano et al. 1997). Ebenso ist das Medikament durch die FDA anerkannt zur Behandlung von Harnstoffzyklusstörungen, da durch die Verstoffwechslung der Phenylbuttersäure mittels β -Oxidation in der Leber Glutamin gebunden wird. Es entsteht Phenylacetylglutamin, welches über die den Urin ausgeschieden wird (Iannitti & Palmieri 2011; Scaglia et al. 2004). Die Funktion des Medikamentes auf die in dieser Studie jedoch der Fokus gelegt wurde, war die Funktion als chemisches Chaperon (Welch & Brown 1996). Hierbei bindet das Molekül an exponierte hydrophobe Anteile von ungefalteten Proteinen und verhindert so eine Aggregation, hält die Proteine Faltungskompetent und reduziert ebenfalls den ER-Stress (Ozcan et al. 2006; Roy et al. 2015). Das Ziel der Behandlung der Zellen mit 4-

PBA war es, die Faltungskompetenz der Zellen zu erhöhen und so möglicherweise positive Effekte zu erzielen. Dafür wurden die Zellen in üblichen Zahlen ausgesät und in 6 cm Zellkulturschalen und für 8 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurden 0,5 mM 4-PBA hinzugegeben und die Zellen nach weiteren 40 h mittels *live-cell calcium imaging* analysiert.

5.5.5. Präparation von semi-permeabilisierten Zellen

Semi-permeabilisierte Zellen (SPZ) ermöglichen den Zugang zum zytosolischen Raum und zu Organellen der Zelle, ohne dass diese Organellen in ihrer Struktur oder Funktionalität verändert wurden. Dies wurde für vielfältige Anwendungen genutzt. Im einfachsten Fall für eine Art Aufreinigung der Probe für die SDS-PAGE, denn durch die Semi-permeabilisierung der Zellmembran und dem Auswaschen des Zytosols wurden Hintergrundsignale minimiert. Des Weiteren wurden die SPZ genutzt, um Zugang zum ER zu gewinnen und dort beispielsweise die Aktivität der SERCA zu ermitteln (Kap. 5.2.8), oder die Orientierung von Proteinen mittels Sequestrierung zu überprüfen (Kap. 5.2.10). Hauptsächlich jedoch wurden die SPZ genutzt um *in vitro* Transportstudien durchzuführen (Kap. 5.3), bei denen ein spezifisches Polypeptid synthetisiert wurde und dessen Transporteffizienz über die ER-Membran ermittelt wurde (Lang et al. 2012). Die Vorbereitung der SPZ erfolgte nach einem etablierten Protokoll von Dudek et al 2013. Hierbei wurden Zellen verwendet, die verschiedene Vorbehandlungen erfahren haben durch Plasmide (Kap. 5.5.3) oder 4-PBA (Kap. 5.5.4). Die Zellen wurden aus den 6 cm Zellkulturschalen geerntet, indem das Medium abgenommen wurde und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen wurden. Das Ablösen der Zellen erfolgte auf die übliche Weise mit 500 µl Trypsin für fünf Minuten im Brutschrank. Abgestoppt wurde die Trypsin-Reaktion durch die Zugabe von 3 ml KTI Lösung. Ab diesem Schritt war darauf zu achten, permanent auf Eis und unter gekühlten Bedingungen zu arbeiten. Die Zellen wurden mit Hilfe des Cytometers automatisiert gezählt und darauffolgend abzentrifugiert (4 °C, 3 min; 1200 rpm). Mit Hilfe dieses Schrittes wurde das restliche Trypsin durch das Abnehmen des Überstandes entfernt. Die Zellen wurden in 6 ml gekühltem KHM-Puffer aufgenommen und mit Digitonin versetzt. Für die Vorbereitung von HeLa-Zellen wurde 1 µl Digitonin pro $1 \cdot 10^6$ Zellen verwendet, bei HEK-Zellen 0,5 µl pro $1 \cdot 10^6$ Zellen. Die Inkubation erfolgte für zehn Minuten auf Eis, währenddessen die Plasmamembran permeabilisiert wurde. Dieser Vorgang ist spezifisch für die Plasmamembran, da Digitonin als mildes und nichtionisches Detergens mit Cholesterol interagiert, welches mit einem höheren Anteil in der Plasmamembran vorliegt und diese dadurch ruptiert (Frenkel et al. 2014; Litvinov et al. 2018). Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert, wodurch das Digitonin im Überstand abgenommen werden konnte. Die Zellen wurden in 14 ml HEPES-Puffer resuspendiert und zehn Minuten auf Eis inkubiert, um das Zytosol aus den Zellen auszuwaschen. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt und die Entfernung des HEPES-Puffers. Das Pellet wurde in 150 µl eiskaltem KHM-Puffer resuspendiert und mit 1 µl Nuclease behandelt, um endogene

Nucleinsäure abzubauen. Diese Funktion der Nuclease ist abhängig von Calcium, weswegen gleichzeitig 0,5 µl CaCl₂ zugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von zwölf Minuten bei Raumtemperatur wurde der Calciumchelator EGTA (2 µl) zugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Das Volumen wurde mit eiskaltem KHM auf 4 ml erhöht und die Probe erneut zentrifugiert. Für den Fall, dass HeLa-Zellen präpariert wurden, wurde das Pellet in 10 ml KHM aufgenommen und erneut gezählt. Eingestellt wurde die Suspension abschließend auf eine Konzentration von 40000 Zellen pro 1 µl Puffer. Wenn HEK-Zellen permeabilisiert wurden, wurde das Pellet in 100 µl KHM-Puffer aufgenommen und dessen Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Einstellung der Probe erfolgte auf 2 µg Protein pro µl. Die SPZ wurden direkt für Folgeexperimente verwendet, oder zur Verwendung bei einem Western Blot mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>KHM-Puffer</u>		<u>HEPES-Puffer</u>	
CH ₃ CO ₂ K	110 mM	CH ₃ CO ₂ K	50 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	2 mM	HEPES/KOH; pH7,2	90 mM
HEPES/KOH; pH 7,2	20 mM	In H ₂ O bidest	
In H ₂ O bidest			
<u>KTI-Puffer</u>		<u>Digitonin</u>	
Trypsininhibitor	125 µg/ml	Digitonin	40 mg/ml
In KHM-Puffer		In H ₂ O bidest	
<u>CaCl₂</u>		<u>Nuclease</u>	
CaCl ₂	200 mM	Nuclease	4000 U/ml
In H ₂ O bidest		In H ₂ O bidest	
<u>EGTA</u>			
EGTA	200 mM		
In H ₂ O bidest			

5.5.6. Präparation von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde eine chemische Lyse verwendet, da diese in der Regel membranständige Proteine besser in Lösung überführt als die mechanische Lyse. Die in der Zellkultur geernteten und ausgezählten Zellen wurden abzentrifugiert (3 min, 600 rpm) um verbliebenes Medium abnehmen zu können. Anhand der mittels Cytometer ermittelten Gesamtzellzahl (Kap. 5.5.2) wurde das Gesamtlysevolumen berechnet, wobei pro 1*10⁵ Zellen 5 µl Gesamtvolumen festgelegt wurden. 80 % des ermittelten Gesamtvolumens wurden als Lyse-Puffer zu den Zellen gegeben und diese für 30 min bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Die verbleibenden 20 % des Volumens wurden nach diesem Schritt mit 5x Laemmli aufgefüllt und die Proben für 10 min bei 56 °C aufgeköcht. Falls die Probe zu diesem Zeitpunkt durch nicht vollständig verdaute DNA noch sehr viskos war, wurden zusätzlich DNase oder *glasbeads* zugegeben. Nach einem erneuten Schütteln und Aufkochen wurde die Probe weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

1x Lyse-Puffer

NaCl	10 mM
Tris/HCl; pH 8,0	10 mM
MgCl ₂	3 mM
NP40	0,5 % (v/v)
PMSF	0,1 mM
PLAC	0,1 % (v/v)
DNase	0,1 mg/ml
	In H ₂ O <small>bidest</small>

PMSF

	1 M
	gelöst in Aceton
	verdünnt in EtOH (f.c. 0,1 M)

5x Laemmli-Puffer

Tris/HCl; pH6,8	300 mM
Glycerin	50 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
	In H ₂ O <small>bidest</small>

PLAC-Lösung

Pepstatin A	3 mg/ml
Leupeptin	3 mg/ml
Antipain	3 mg/ml
Chymosatin	3 mg/ml
	In DMSO

5.6. Analyse der Calciumhomöostase der Zelle

Da Calcium als *second messenger* in der Zelle an zahllosen Prozessen beteiligt ist, muss es sehr präzise gesteuert und kontrolliert werden (Clapham 2007). Hier spielt das ER als zentrales Calciumspeicher-Organell eine entscheidende Rolle, ebenso wie der Sec61-Komplex, der durch den Leckstrom dauerhaft einen Calciumausstrom aus dem ER ermöglicht und so auch eine physiologische Rolle einnimmt (Klein et al. 2018; Lang et al. 2017). Dadurch gab es ein begründetes Interesse, ob Veränderung des Sec61 α potenziell einen Einfluss auf diese Calciumhomöostase ausüben. Die Calciumkonzentrationen können an verschiedenen Stellen in der Zelle durch unterschiedliche Methoden gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde zu großen Teilen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FURA-2AM gearbeitet, um die Calciumkonzentration im Zytosol zu bestimmen. Alternativ wurde der genetisch codierte Calciumsensor GCaMP₆₋₁₅₀ als Plasmid in die Zelle eingebracht, um im ER-Lumen Auskunft über die dort vorliegende Calciumkonzentration zu erhalten. Beide Indikatoren visualisieren Calcium durch die Veränderung ihre jeweiligen optischen Eigenschaften bei An- und Abwesenheit von Calcium, sodass eine räumliche und zeitliche Nachverfolgung der Calciumkonzentrationen ermöglicht wurde. Die Messungen wurden in der Pharmakologie der Universität des Saarlandes durchgeführt, mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Adolfo Cavalié. Hier wurde das so genannte iMIC Mikroskop genutzt, sowie zur Analyse die Programme Live Acquisition und Offline-Analysis. Alle Produkte stammen von der Firma Till Photonics. Das eingebaute Fura-2 Filterset und das Fluor 20x/0,75 M27 Objektiv erlaubten die Detektion der zytosolischen Calciumveränderungen in mehreren Zellen gleichzeitig. Die spezifisch auf das ER abzielende Analyse des luminalen Calciums wurde mit dem Fluor 100x/0,75 M27 Objektiv und dem GFP-Filter durchgeführt, um einzelne Zellen vermessen zu können.

5.6.1. Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels FURA-2AM

Zur Bestimmung des zytosolischen Calciumgehaltes wurde der Farbstoff FURA-2AM eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen ratiometrischen Farbstoff, denn das Absorptionsmaximum wird von 380 nm in der Calcium-freien Form zu 340 nm in der Calcium-gebundenen Form verschoben, während die Emission weiterhin bei 510 nm gemessen wurde. Der isosbestische Punkt liegt bei 362 nm. Dadurch kann bei zunehmender Calciumkonzentration eine stärkere Emission nach einer Anregung mit 340 nm gemessen werden, während zeitgleich die Emission nach einer Anregung mit 380 nm abnimmt. Durch die nahezu simultane Messung (Verzögerung 5 ms) dieser beiden Werte und der Bildung des 340/380 Verhältnisses, ist der Messwert unabhängig von der Beladungseffizienz, dem Ausbleichen des Farbstoffes oder den physiologischen Eigenschaften der Zelle. Die Struktur dieses Farbstoffs beruht auf der Struktur von EGTA, dementsprechend wird Calcium durch vier Carboxylgruppen an den Farbstoff gebunden (Tsien 1980). Die Lokalisation des Farbstoffs im Zytosol wird durch Acetoxymethylester (AM)-Gruppen ermöglicht. Diese Gruppen ermöglichen die Membranpermeabilität von Fura-2AM. Durch zelleigene Esterasen werden diese Gruppen im Zytosol vom Farbstoff entfernt, sodass dieser im Zytosol akkumuliert (Grynkiewicz et al. 1985). Des Weiteren ist dieser Farbstoff durch eine angegebene K_D von 224 nM hervorragend geeignet, um die Calciumfluktuationen im Zytosol darzustellen (Grynkiewicz et al. 1985). Im Abgleich mit dem Hintergrund und Kalibrierungsmessungen war es so möglich die direkte Calciumkonzentration zu bestimmen. Zur Feststellung ob verschiedene Calcium-Prozesse (Kap. 4.4) verändert sind innerhalb der Zelle wurden verschiedene Manipulatoren und Lösungen eingesetzt, um unterschiedliche Effekte zu erzeugen. Die experimentelle Vorbereitung erfolgte in allen Fällen auf die gleiche Art und Weise. Die Zellen wurden einen Tag bevor das Experiment begann 1:2 passagiert. Jene Zellen wurden am folgenden Tag mittels Trypsins geerntet und ausgezählt. Um eine gleichmäßige Konfluenz der Zellen zu erreichen, wurden unterschiedliche Zellzahlen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Diese war angepasst an die jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeiten der Zelllinien. Für SEC61A1-V67G-Zelllinie waren $6 \cdot 10^5$, für den WT $6 \cdot 10^5$ und die T185A Mutante $6,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Zellkulturschale von Nöten. In der Kulturschale wurden Glasplättchen von 2 cm Durchmesser platziert, auf denen die Zellen anwachsen, um auf diesen vermessen zu werden. Die Zellen wurden für 48 Stunden in 4 ml Medium im Brutschrank kultiviert. Mindestens zwei Stunden vor dem Beginn der Messung wurden 3 cm Zellkulturschalen vorbereitet, in die 2 ml Kulturmedium gegeben wurde und ebenfalls im Brutschrank gelagert wurden, damit das Medium die entsprechenden 37 °C erreicht. Die Glasplättchen wurden aus der sechs in die drei Zentimeterschale übertragen, in welchen die Zellen für 25 min mit 3,5 µl Fura-2AM (1 mM) inkubierten, und dadurch mit dem

Farbstoff beladen wurden. Danach wurden das Deckgläschen in den Messring übertragen und zweimal mit 300 µl *external solution* (ES) + EGTA-Lösung gewaschen. Abschließend wurde dieselbe Lösung auf die Zellen gegeben und das Deckgläschen im Strahlengang positioniert. Durch den Einsatz von EGTA im extrazellulären Raum wurde sichergestellt, dass kein Calcium von außen in die Zellen gelangen konnte und nur intrazelluläre Vorgänge vermessen wurden. Die Messung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, durch einen Lichtimpuls alle drei Sekunden. Lösungen mit Manipulatoren wurden immer mit 300 µl Volumen in ES+EGTA zugegeben. Hierbei war zu beachten, dass je nach Aufbau des Messprotokolls die zugegebenen Lösungen, doppelt oder dreifach konzentriert sein müssen, um eine einfache finale Konzentration der zugegebenen Manipulatoren zu erreichen. Pro Messung wurden 50 Zellen gemessen und deren Mittelwert als ein Versuch bzw. Replikat definiert. Ausgewertet wurden die ausgegebenen Ratios 340/380, die mithilfe der Messzeitpunkte einen Messverlauf widerspiegeln. Aus diesem Messverlauf wurde die Differenz (Delta) zwischen dem Maximum und dem Mittelwert der Baseline, der Minute vor der Behandlung, gebildet.

<u>External solution (ES)</u>		<u>ES + EGTA</u>	
NaCl	140 mM	EGTA	0,5 mM
KCl	5 mM		in ES
MgCl ₂	1 mM		
Glukose	10 mM		
HEPES/KOH; pH 7,35	10 mM		
	in H ₂ O bidest		

Demaskierung der Calciumleckströme durch Thapsigargin

Zur Visualisierung des Calciums, welches aus dem ER durch die Leckkanäle ausströmt, musste die Rückführung der Calciumionen in das ER unterbunden werden. Dadurch akkumulierte Calcium im Zytosol und wurde durch die Verwendung von FURA-2AM detektiert. Die Rückführung der Ionen wird normalerweise ermöglicht durch die SERCA, welche Calciumionen gegen das Konzentrationsgefälle in das ER hineinbefördert und irreversibel sowie höchst effektiv durch Thapsigargin inhibiert werden kann (Rogers et al. 1995; Thastrup et al. 1990). Die Zellen wurden wie oben beschrieben vorbereitet und im Strahlengang platziert. Nach der Bestimmung der Grundkonzentration des Calciums im Zytosol in der ersten Minute wurde 300 µl 2x TG-Puffer zugegeben, sodass eine finale Konzentration von 1 µM erreicht wurde. Die Messung wurde für neun Minuten fortgesetzt, sodass eine Gesamtmesszeit von zehn Minuten analysiert wurde.

<u>TG-Puffer (2x)</u>	
Thapsigargin	2 µM
	in ES+EGTA

Mobilisierung des freien Calciums aus Zellorganellen mittels Ionomycin

Um zu zeigen, welche Mengen freies Calcium in der Gesamtheit der verschiedenen Organellen der Zelle gespeichert wurde, wurde das Ionophor Ionomycin eingesetzt (Liu & Hermann 1978). Dieses ermöglicht einen schnellen, dem Konzentrationsgefälle entsprechenden, Austritt der Calciumionen aus den Organellen in das Zytosol. Hierbei muss beachtet werden, dass das ER unter Ruhebedingungen zwar der Hauptspeicher für Calcium in der Zelle ist, andere Organellen jedoch ebenfalls geringere Mengen Calcium beinhalten (Putney 1999). Dadurch, dass die Reaktion der Zelle auf Ionomycin deutlich schneller verlief, war hier eine Messzeit von fünf Minuten ausreichend. Erneut wurde ES+EGTA verwendet, um die Zellen zu waschen und nach einer Minute 300 µl 2x Iono-Puffer zugegeben, um die Calciumspeicher in das Zytosol zu entleeren.

Iono-Puffer (2x)

Ionomycin	10 µM
	in ES+EGTA

Bestimmung des ER spezifischen freien Calciums

Da das Signal für freies Calcium nach Ionomycingabe ein Mischung aus der Reaktion aller Organellen war, konnte hier nicht spezifisch der Anteil des ERs ermittelt werden, auch wenn dieser mit Abstand der größte sein sollte (Putney 1999). Daher wurde die Kombination aus Thapsigargin und Ionomycin genutzt um den Calciumgehalt aller Organellen außer dem ER zu bestimmen. Sollte dieser identisch sein und Unterschiede in der Reaktion aller Organellen auf Ionomycin zu beobachten gewesen sein, konnte dieser Unterschied auf das ER zurückgeführt werden. Der experimentelle Ablauf war in der Vorbereitung identisch zu bisher beschriebenen Experimenten. Nachdem die Messung gestartet wurde, wurde nach einer Minute 2x TG-Puffer appliziert. Dadurch wurden die Calciumspeicher des ERs geleert. Nach weiteren neun Minuten wurde 3x Iono-Puffer zugegeben. Dadurch wurden alle weiteren Organellen entleert. Die Messung wurde für vier Minuten fortgesetzt und dann mit Hilfe des Offline Analysis Tool ausgewertet.

TG-Puffer (2x)

Thapsigargin	2 µM
	in ES+EGTA

Iono-Puffer (3x)

Ionomycin	15 µM
	in ES+EGTA

Analyse der Stressreaktion auf Tunicamycinbehandlung

Durch den Faltungsantagonisten Tunicamycin wird in der Zelle Stress ausgelöst (Helenius et al. 1992). Durch die daraus resultierende Fehlfaltung von Polypeptiden wird das Chaperon BiP

verstärkt dazu eingesetzt diesem Zustand entgegenzuwirken. Dadurch wird die Menge an BiP, welches mit dem Sec61 α interagiert, um dieses zu verschließen, verringert und nach einer Thapsigargin-Behandlung wird ein erhöhter *leak* sichtbar (Schäuble et al. 2012). Dadurch kann die Messung der Antwort auf eine Thapsigargin-Behandlung einen Hinweis darauf geben, ob die Zelle einem dauerhaften Stress ausgesetzt waren bzw. wie diese auf den Stress reagierten. Auch hier wurde in einer calciumfreien externen Lösung gemessen. Nach einer Minute wurde Tunicamycin-Puffer appliziert und für drei Minuten erfolgte dessen Wirkung, die durch den darauffolgenden TG-Puffer nachgewiesen wurde (weitere 9 min Messzeit). Zur Kontrolle wurden die Zellen für den gleichen Zeitraum anstatt mit Tunicamycin mit DMSO behandelt.

<u>Tunicamycin-Puffer (2x)</u>		<u>TG-Puffer (3x)</u>	
Tunicamycin	30 $\mu\text{g/ml}$ in ES+EGTA	Thapsigargin	3 μM in ES+EGTA
<u>DMSO-Puffer</u>			
DMSO	1 % (v/v) In ESEGTA		

Nachweis des store operated calcium entrys (SOCE)

Die natürliche Reaktion der Zelle ist es, nachdem der Calciumspeicher des ERs entleert wurde, diesen wieder aufzufüllen. Dies erfolgt durch den SOCE, bei dem Calcium aus dem extrazellulären Raum aufgenommen wird, ins Zytosol gelangt und dann von SERCA weiter in das ER überführt wird (Ambudkar et al. 2017). Da hier im Laufe des Experimentes wieder Calcium zugegeben wird, wird mit einer *external solution* ohne EGTA gearbeitet, um einen Pufferungseffekt zu verhindern. Um eine Calciumaufnahme zu triggern, wurde nach einer Minute Messzeit TG-Puffer zu den Zellen gegeben. Dadurch wird der Calciumspeicher des ERs entleert und der SOCE aktiviert. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wird Calcium-Puffer in den Ring gegeben, sodass eine Endkonzentration von 1 mM Calcium in der Lösung erreicht wird. Dadurch konnte nun der Einstrom von Calcium aus dem Medium in das Zytosol für weitere elf Minuten gemessen werden.

<u>TG-Puffer (2x)</u>		<u>Calcium-Puffer</u>	
Thapsigargin	2 μM in ES	Ca ²⁺	3 mM in ES

Behandlung der Zellen mit Eeyarestatin 1

Durch die Verwendung von Eeyarestatin 1 (ES1) wurde es ermöglicht, direkt das Sec61 α zu modulieren. Das Molekül bindet in das *lateral gate* des Sec61 α und arretiert dieses in einem Zustand, bei dem ein Proteintransport nicht mehr möglich ist, allerdings ein dauerhafter

Ausstrom durch das Sec61 α von Calcium aus dem ER entsteht (Gamayun et al. 2019). Dadurch wurde anhand des Calciumausstromes die Sensitivität des Sec61 α gegenüber der ES1-Behandlung festgestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgte standardgemäß in der ES + EGTA-Lösung, um einen Einfluss von extrazellulärem Calcium auszuschließen. Die Zellen wurden nach einer Minute mit ES1-Puffer behandelt und für 16 min vermessen.

ES1-Puffer (2x)

Eyarestatin 1	20 μ M
	in ES+EGTA

Behandlung der Zellen mit 4-PBA

Um zu testen, ob 4-PBA eine Lang- bzw. Kurzzeitwirkung auf den zellulären Calciumhaushalt ausübt, wurden unterschiedliche Methoden der Behandlung genutzt. Um zu prüfen, ob durch die Behandlung mit 4-PBA als sekundärer Effekt der Calciumspeicher des ER stärker gefüllt wird, wurde die Zellen mit 4-PBA wie in Abschnitt 5.5.4 beschrieben behandelt und nach 36 Stunden Ionomycin-Messungen durchgeführt. Um eine unmittelbare Wirkung der 4-PBA Behandlung auf den *leak* durch den Sec61 α Kanal zu demonstrieren, wurden ähnlich wie bei einer Behandlung mit ES1 oder Tunicamycin unbehandelte Zellen verwendet. Nach einer Minute Messzeit wurde der 4-PBA-Puffer appliziert und nach weiteren drei bzw. fünf Minuten der TG-Puffer bzw. Iono-Puffer. Der durch die Behandlung entstehende Unterschied ließ sich anhand eines veränderten Peaks nach Thapsigargin- oder Ionomycin-Applikation erkennen.

4-PBA-Puffer (2x)

4-PBA	1 mM
	in ES+EGTA

TG-Puffer (3x)

Thapsigargin	3 μ M
	in ES+EGTA

Iono-Puffer (2x)

Ionomycin	10 μ M
	in ES+EGTA

Iono-Puffer (3x)

Ionomycin	15 μ M
	in ES+EGTA

Applikation von Ionomycin und Thapsigargin zu verschiedenen Zeitpunkten

Zur Überprüfung, ob ein Zusammenhang zwischen den durch Ionomycin und den durch Thapsigargin generierten Ergebnissen besteht, wurde eine Zeitreihenmessung etabliert. Hierbei wurde vor der Applikation von Thapsigargin oder Ionomycin eins, fünf, zehn oder 15 min gewartet und die darauffolgenden Effekte miteinander verglichen. Die Messdauer nach Applikation entsprach den Standardbedingungen von Thapsigargin +9 min und Ionomycin +4 min. Die Zellen wurde dabei dauerhaft in der ES+EGTA-Lösung befindlich vermessen. Die hinzugefügten Lösungen waren wie bereits beschrieben konzentriert.

TG-Puffer (2x)
Thapsigargin

2 μM
in ES+EGTA

Iono-Puffer (2x)
Ionomycin

10 μM
in ES+EGTA

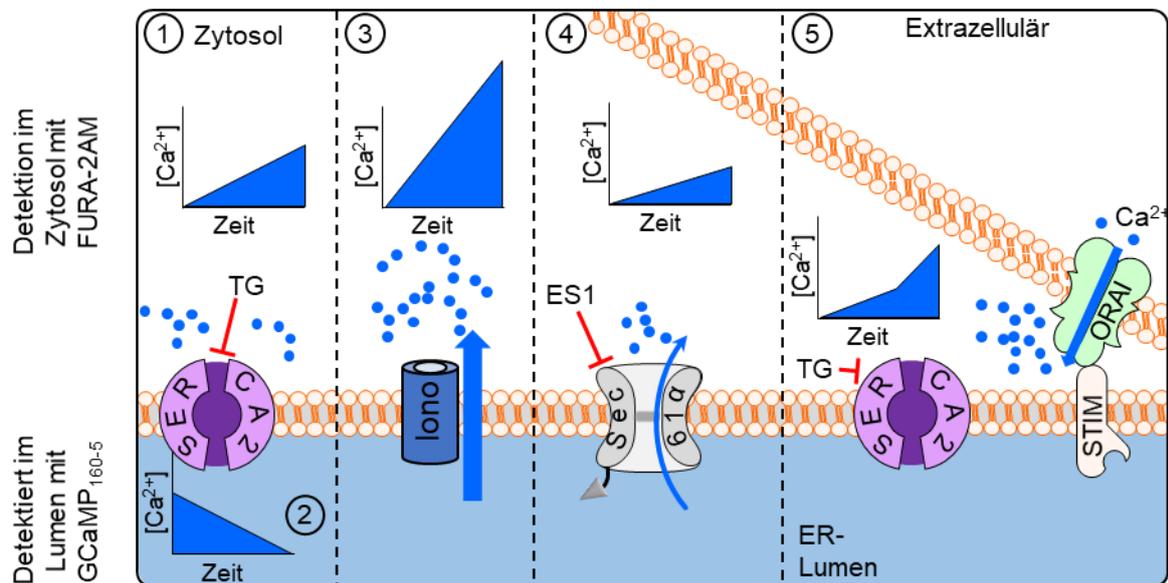


Abb. 17: Schematische Darstellung der Effektoren, die Einfluss auf die Calciumhomöostase nehmen. Die Detektion der Calciumänderung erfolgte im Zytosol durch FURA-2AM im ER-Lumen durch den genetisch codierten Sensor GCaMP₆₋₁₅₀ (Kap. 5.6.3). **1:** Durch den Einsatz von TG wird die Rückführung von Calcium in das ER verhindert. Dadurch erhöht sich die Calciumkonzentration im Zytosol, während sich die Konzentration im ER **2** zeitgleich verringert. **3:** Nach der Applikation von Ionomycin werden alle Calciumspeicher der Zelle mobilisiert und in kurzer Zeit unreguliert in das Zytosol überführt. **4:** Durch ES1 wird der Proteintransport in das ER verhindert, während der Kanal dennoch dauerhaft geöffnet für Calcium bleibt. **5:** Nachdem das ER durch TG entleert wurde, wird der SOCE aktiviert. Aufgrund der Zuführung von externem Calcium wird die Aufnahme des Ions in das Zytosol durch den STIM/ORAI Komplex ermöglicht.

5.6.2. Kalibrierung des Mikroskops

Um eine Umrechnung der ermittelten Dimensionslosen Werte aus den FURA-2AM-Messungen in reale Calciumkonzentrationen zu ermöglichen, mussten zwei Dinge erfolgen. Zum einen wurde das Mikroskop mittels definierter Lösungen kalibriert, zum anderen mussten minimale und maximale Werte für die Calciumkapazität des Zytosols für die einzelnen Zelltypen bestimmt werden. Dies konnte dann in einer Umrechnungsformel eingesetzt werden und die dimensionslose Angabe der Calciumratio in eine reale Calciumkonzentration umgerechnet werden.

Die Kalibrierung des Mikroskops erfolgte durch selbst hergestellte Puffer, die eine definierte Menge Calcium enthielten. Von diesen Puffern wurde einzeln 5 μl auf ein Deckgläschen gegeben und die Werte für eine Anregung bei 340 und bei 380 nm bestimmt. Die Pufferkonzentrationen erstreckten sich von 0 μM Calcium + 50 μM Fura-2AM bis 39 μM Calcium + 50 μM Fura-2AM. Zur Definition des Hintergrundes wurde eine Lösung

herangezogen, die 39 μM Calcium, aber kein FURA-2AM Farbstoff beinhaltet. Nachdem alle Werte ermittelt wurden, wurden mehrere Rechenschritte angewandt, um eine Geradengleichung zu erhalten mit der die spezifische K_D für dieses Setup bestimmt wurde. Exemplarisch werden hier die Rechenschritte für 1,35 μM Calcium aufgeführt. Diese Kalkulationen müssen auf jede Konzentration angewendet werden. Hierbei werden die Ratios für 0 μM Ca^{2+} und 39 μM Ca^{2+} als R_{\min} und R_{\max} definiert.

1. Abzug des Hintergrunds:
$$F_{380(1,35 \text{ Ca}^{2+})} - F_{380(bg)} = F'_{380(1,35 \text{ Ca}^{2+})}$$

$$F_{340(1,35 \text{ Ca}^{2+})} - F_{340(bg)} = F'_{340(1,35 \text{ Ca}^{2+})}$$

2. Definieren der Ratio:
$$\frac{F'_{340(1,35 \text{ Ca}^{2+})}}{F'_{380(1,35 \text{ Ca}^{2+})}} = R_{1,35}$$

3. korrigierte Ratio
$$\frac{R_{1,35} - R_{\min}}{R_{\max} - R_{1,35}}$$

4. Korrekturfaktor α :
$$\frac{R_{380(0 \text{ Ca}^{2+})} - R_{380(bg)}}{R_{380(39 \text{ Ca}^{2+})} - R_{380(bg)}} = \alpha$$

5. Bildung des Log: Es werden jeweils der log der Calciumkonzentration und der korrigierten Ratio gebildet. Dabei stellt die Calciumkonzentration den y-Wert, die korrigierte Ratio den x-Wert des Koordinatenpunkts dar. Diese werden in ein Koordinatensystem eingetragen.

6. Bestimmung der Geradengleichung:
$$y = m * x + b$$

7. Umrechnung in die K_D :
$$\frac{-b}{m} = d$$

$$10^d = d'$$

$$\frac{d' * 1000}{\alpha} = Kd$$

Die Dissoziationskonstante wurde in Nanomol angegeben.

Zur Bestimmung der minimalen und maximalen Calciumkapazität der Zellen, wurden zwei Puffer verwendet. In Puffer-A waren Ionomycin und EGTA enthalten, während in Puffer-B hohe Mengen Calcium verwendet wurden. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben kultiviert (Kap. 5.6.1) und mit dem Farbstoff FURA2-AM beladen. Nach der Beladung wurden die Zellen zweimal mit Puffer-A gewaschen und danach für 15 min in Puffer-A inkubiert, wobei dieser alle fünf Minuten gewechselt wird. Dadurch war eine völlige Entleerung der Organellen und des Zytosols gegeben. Die Messung wurde gestartet und nach fünf Minuten wurde Puffer-B

hinzugefügt. Dieser Maximalwert wurde für weitere fünf Minuten vermessen. Aus den Messungen wurde ein minimaler (R_{min}) und ein maximaler (R_{max}) Wert für die Calciumkapazität der Zellen definiert

Daraus ergibt sich die folgende Formel zur Berechnung des freien Calciums im Zytosol:

$$Ca^{2+}_{free} = Kd * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$$

Dieser Wert wurde in Nanomol angegeben.

<u>Puffer-A:</u>		<u>Puffer-B:</u>	
Ionomycin	10 μ M	Ionomycin	10 μ M
EGTA	2 mM	Calcium	52 mM
	in ES		in ES

5.6.3. Bestimmung des luminalen Calciumgehalts anhand GCaMP₆₋₁₅₀

Um direkt im Lumen des ERs die Calciumkonzentration messen zu können, wurde der genetisch codierte Sensor GCaMP₆₋₁₅₀ verwendet. Dieser wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Adolfo Cavalié (UdS, Pharmakologie und Toxikologie) und Prof. Timothy Ryan (Weill Cornell Medical College; New York). Der hier verwendete Sensor, bei dem die 150 für die KD von 150 μ M steht, basiert auf einem zirkulär permutierten EGFP (de Juan-Sanz et al. 2017). Nahe dem chromophoren Zentrum des EGFPs liegt eine Calmodulin-M13-Sequenz (Chen et al. 2013). Sollte Calcium vorhanden sein, bindet dieses an die Calmodulin-Sequenz, wodurch dieses eine Konformationsänderung erfährt und an das M13-Peptid binden kann (Ikura et al. 1992; Miyawaki et al. 1997). Als Folge dieser geänderten Konformation entsteht ein verstärktes Signal durch das GFP (Chen et al. 2013). Die Lokalisierung des Sensors im ER-Lumen wird sichergestellt durch eine Calreticulin Signalsequenz am N-Terminus und eine KDEL-Sequenz am C-Terminus (de Juan-Sanz et al. 2017). Da im Gegensatz zu den im vorherigen Kapitel beschriebenen Messungen das ER und nicht das Zytosol vermessen wurde, wurden einzelne Zellen mit dem 100x/0,75 M27 Öl-Objektiv (Zeiss) analysiert. In der Vorbereitung wurden $3 \cdot 10^5$ Zellen auf Deckgläschen in einer 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am Folgetag erfolgte die Plasmidtransfektion mit dem GCaMP₆₋₁₅₀ Plasmid (Kapitel 5.5.3) und die Zellen synthetisierten für 24 Stunden das entsprechende Reporterkonstrukt. Die Schritte wurden in Medium ohne Antibiotikum durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit ES-EGTA gewaschen und in dieser Lösung mit folgenden Einstellungen vermessen: 2x2 Binning; 50 ms Expositionszeit; 300 frames mit je 3 s pro frame. Nach einer Minute wurde TG-Puffer zugegeben, um den Ausstrom von Calcium aus dem ER, also die Abnahme des GFP-Signals zu induzieren. Normalisiert und berechnet wurden die Ergebnisse wie folgt:

Definition: F = gemessene Fluoreszenz
 F_b = gemittelte basale Fluoreszenz der letzten 20 frames;
 F'_0 = Mittelwert der Ausgangsfluoreszenz in den frames 5 bis 15 nach Abzug von F_b ;
 I = normalisierte Signalintensität.

$$F' = F - F_b$$

$$I = \frac{F'}{F'_0}$$

Der Wert der normalisierten Intensität wurde gegen die Zeit aufgetragen. Der Zeitpunkt, an dem die Hälfte des Calciums aus dem ER ausgeströmt ist die halbmaximale Geschwindigkeit, welche anhand der graphischen Auftragung ablesbar war. Je geringer diese Zeit ist, desto schneller strömt Calcium aus dem ER, desto weniger verschlossen wären demnach die *leak*-Kanäle.

<u>ES + EGTA</u>		<u>TG-Puffer (2x)</u>	
NaCl	140 mM	Thapsigargin	2 μ M
KCl	5 mM		in ES+EGTA
MgCl ₂	1 mM		
Glukose	10 mM		
HEPES/KOH; pH 7,35	10 mM		
EGTA	0,5 mM		
	in H ₂ O <small>bidest</small>		

5.7. Real Time Cell Analyzer

Die kontinuierliche Analyse der Zellproliferation und des Zellwachstums wurde ermöglicht durch die Nutzung des xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA). Die hier verwendeten „96 well E-plates“ sind am Boden mit Goldelektroden in einem engmaschigen Netz versehen, auf denen die Zellen direkt wachsen können. Durch diese Goldelektroden wurde die Impedanz, also der Widerstand gemessen, der in der einzelnen *wells* vorlag. Bei adhärennten Zellen wurde diese Impedanz durch das Wachstum und die Proliferation geprägt, beides Faktoren, die zu einem mehr an bewachsener Fläche führen. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Parametern war mit Hilfe des RTCA nicht möglich, weswegen das „Größenwachstum & Proliferation“ der Zellen durch einen dimensionslosen „Cellindex“ wiedergegeben wurde. Zur Normalisierung der Wachstumskurven wurde die Steigung dieser Kurven bestimmt, um die Zunahme des Cellindex zu definieren. Die Zellen konnten über mehrere Tage im Brutschrank in den E-plates kultiviert werden, was eine dauerhafte Beobachtung der Auswirkung von Substanzen oder dem unbeeinflussten Wachstum ermöglichte. Zu Beginn wurde ein Referenzwert für die einzelnen *wells* durch eine Messung festgelegt, bei der nur 145 μ l Kulturmedium pro Vertiefung vorgelegt wurden. Die Zellen, die erneut am Vortag 1/2 passagiert wurden, wurden geerntet, gezählt und die Konzentration auf 100 Zellen pro 1 μ l eingestellt. 50 μ l der Zellsuspension wurden in jede Vertiefung überführt.

Da es sich bei HEK-Zellen um adhärenz Zellen handelt, wurde vor Beginn der Messung 30 min abgewartet, damit die Zellen absinken konnten. Nach einer Anwachsphase von 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substanzen in verschiedenen Konzentrationen behandelt, um positive oder negative Effekte auf den Cellindex zu messen. Die Zugabe erfolgte in 5 µl Volumen, wobei die Substanzen, wenn möglich, in Medium zuvor verdünnt wurden. Die Impedanz wurde über 5 Tage alle 15 min vermessen und später mit Hilfe des RTCA-Programms ausgewertet. Die beschriebene Steigung der Kurven wurde zwischen dem Zeitpunkt der Applikation und dem absoluten Maximum des Zellindex bestimmt.

5.8. Auswertung und Statistik zu den Ergebnissen.

Die, falls nötige, Umrechnung und Sammlung der erhobenen Werte erfolgte in Microsoft Excel. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Sigma Plot 10 verwendet, indem automatisiert One-Way-ANOVA Analysen mit entsprechenden *Post-hoc* Tests durchgeführt wurden. Dadurch wurde die Frage beantwortet, ob beim Vergleich mehrere Proben/Zelllinien ein signifikanter Unterschied zwischen den betrachteten Resultaten vorlag. Zum Vergleich von zwei Resultaten untereinander wurde der zweiseitige t-Test verwendet. Dieser ist in den Abbildungen durch eine kursive Schreibweise vom One-Way-ANOVA abgegrenzt. Die Signifikanz wurde wie folgt definiert:

$p > 0,050$ (nicht signifikant)

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

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

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

Die Erstellung der Grafiken erfolgte ebenfalls in diesem Programm, wobei zu deren Ausgestaltung CorelDRAW verwendet wurde.

6. Ergebnisse

Die beiden Themenkomplexe, die in dieser Arbeit behandelt wurden, sind sowohl eigenständig als auch miteinander interagierend zu betrachten. Die zentrale Aufgabe des Projektes rund um den SND-Transportweg war es, Interaktionspartner auf Basis einer durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe generierten Liste von potentiellen Kandidaten zu validieren (Haßdenteufel et al. 2017). Der Fokus wurde hier auf den Nachweis von direkten Protein-Protein-Interaktionen durch verschiedene Techniken gelegt, um sowohl das räumliche Umfeld als auch die direkten Interaktionspartner des hSnd2 im humanen System zu identifizieren.

Das zweite Projekt behandelt eine zentrale Komponente des Proteintransportes in das Endoplasmatische Retikulum in humanen Zellen. Die funktionelle Vielseitigkeit des in der ER Membran liegenden Sec61 α und auch die zunehmenden Beschreibungen der Proteintransport und Sec61 α -assoziierten Erkrankungen in der Literatur, ließen den Schluss zu, dass weiteren Erkrankungen eine Sec61 α -Mutation zugrunde liegen könnten. In dieser Arbeit sollten für zwei kürzlich entdeckte Mutationen des Sec61 α , welche die Nierenerkrankung ADTKD auslösen, die biochemischen Phänotypen charakterisiert werden, um ein besseres Verständnis der Symptome und der Krankheit selbst zu erlangen (Bolar et al. 2016).

Die Verknüpfung beider Themen, der Definition eines bisher nur aus der Hefe bekannten Proteintargetingweges zum Sec61-Komplex (Aviram et al. 2016) in humanen Zellen und der Untersuchung der Effekte von Mutationen des Sec61 α (Bolar et al. 2016), ist dementsprechend auch „lokal“ an diesem Protein möglich. Durch die Analyse von Komponenten die Transportsubstrate heranführen, der Funktionalität sowie von direkten und indirekten Interaktionspartnern des Sec61 α entsteht ein besseres Verständnis des verstrickten Transportnetzwerkes von Proteinen und der Calciumhomöostase in humanen Zellen bei.

6.1. Aufklärung des hSnd2-Interaktoms

Um die Struktur und die Funktion eines Transportweges für Proteine in humanen Zellen zu verstehen, ist es essenziell, die daran beteiligten Komponenten zu kennen. Diese Identifikation gelang in der Vergangenheit beispielsweise sowohl für den SRP- als auch für den GET/TRC40-Transportweg, wodurch das Verständnis dieser Prozesse erweitert wurde. Diese Erweiterung ist auch das Ziel für den humanen SND-Transportweg, von dem bisher nur eine Komponente, das hSnd2-Protein, identifiziert werden konnte (Haßdenteufel et al. 2017). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Interaktionspartner zu hSnd2 bestimmt, die mit Hilfe von Experimenten, die sowohl *in vitro* als auch in lebenden Zellen diese Zusammengehörigkeit zeigen sollten.

6.1.1. Eingrenzung der Interaktionskandidaten per Massenspektrometrie

Zur Feststellung von Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen können verschiedene Techniken zum Einsatz kommen. Da im Fall des SND-Transportweges bisher nur eine beteiligte Transportkomponente bekannt ist, wurde zu Beginn in einem umfassenderen Ansatz nach Interaktionskandidaten gesucht, die mit Hilfe einer Co-IP identifiziert werden sollten. Zusammen mit der Identifizierung der co-präzipitierten Proteine durch eine massenspektrometrische Analyse wurden diese Versuche bereits publiziert (Haßdenteufel et al. 2017). Der Umfang der veröffentlichten potenziellen Interaktionspartner war jedoch zu groß, um eine spezifische Interaktion zur Verifikation herauszuarbeiten. Daher wurde der zur massenspektrometrischen Analyse in Haßdenteufel *et al.* 2017 angewendete, experimentelle Aufbau mit dem Ziel verändert, diese Liste spezifischer einzugrenzen. Die Strategie hierbei war es, die ehemals sanften Bedingungen, unter denen die Co-IP durchgeführt wurde, stringenter zu gestalten, um dahingehend Proteine, die weniger effizient an hSnd2 binden, oder nur über Zwischenverbindungen aufgereinigt wurden, zu entfernen. Dadurch sollten nur Proteine eluiert werden, die direkt mit hSnd2 interagieren.

Für diesen Experimenttyp wurden HeLa-Zellen wie in Kapitel 5.5.3 beschrieben mit dem *HSND2-FLAG* Plasmid transient transfiziert, um auf diese Weise die Synthese des als *bait* (Köder) agierenden hSnd2-FLAG über 24 Stunden hervorzurufen. Die Zellen wurden dem Protokoll entsprechend geerntet und eine Co-IP nach Kapitel 5.2.6 durchgeführt. Ergänzend zu dem dort beschriebenen Ablauf, wurden nach den drei Standardwaschschritten (gezeigt ist der erste Waschschritt W1 Abb. 18), weitere Waschschritte eingefügt, um die Stringenz des Waschschrittes zu erhöhen. Diese zusätzlichen Wasch-Puffer enthielten entweder eine erhöhte Salzkonzentrationen (W4 und W5), um ionische Verbindungen zu lösen, oder TritonX-100 (W6) als harscheres Detergens, um hydrophobe Proteininteraktionen zu stören und so ein spezifischeres Eluat zu erhalten (Masters 2004). Nach der kompetitiven Elution durch die Zugabe des FLAG-Peptides wurde die hiermit generierte Eluatfraktion (E) durch den Einsatz von TCA gefällt (Kap. 5.2.7). Die Auftrennung des Proteingemisches wurde durch eine SDS-PAGE erreicht und die Proteine abschließend mittels immunologischer Detektion oder kolloidalem Coomassie analysiert (Kap. 5.2.2; 5.2.3; 5.2.4; 5.2.7). Es ist zu erkennen (Abb. 18A), dass die Solubilisierung, also das Lösen des hSnd2 aus der ER Membran, durch den Einsatz von Chaps als Detergens erfolgreich war, da das Verhältnis des detektierten hSnd2-FLAG zwischen den Fraktionen P und -IP (vor IP) deutlich zugunsten der letzteren ausfiel. Ebenfalls war die Immunpräzipitation sehr effizient, da in der zugehörigen Fraktion +IP (nach IP) keine Detektion des hSnd2-Proteins möglich war. Die Signale in den Proben der Waschschritte (W1,4,5,6) zeigen, dass hSnd2-FLAG effektiv an die ANTI-FLAG® M2 *Affinity Beads* gebunden wurde. Erst der Einsatz von TritonX-100 in Waschschritt 6 (W6) hatte zur Folge, dass geringe Mengen des Proteins von den antikörperbesetzten *beads* gelöst wurden.

Die Elution (E) erfolgte effizient, da der Großteil des aufgereinigten Proteins in der Eluatspur, jedoch wenig an den mit Laemmli und Hitze behandelten *beads* (B) detektiert werden konnten. Durch die Anfärbung mittels kolloidalem Coomassie (Abb. 18B) war zu erkennen, dass ein geringer Anteil des gesamten Proteinpools der Zellen nicht solubilisiert wurde (Vergleich P zu -IP) und auch die Bindung an die ANTI-FLAG® M2 *Affinity Beads* (+IP) spezifisch erfolgte, da weiterhin viel Protein in der aus diesem Überstand gewonnenen Probe nachweisbar war. Im ersten Waschschrift, der mit dem ebenfalls zur Lyse verwendeten Puffer erfolgte, wurden unspezifisch an die *beads* gebundene Proteine von diesen gelöst, was durch die erhöhten Salzkonzentrationen in W4 und W5 noch leicht gesteigert wurde. Durch den Einsatz von Triton-X (W6) wurde hingegen noch eine größere Menge an Proteinen, die über hydrophobe Interaktion an das *baitprotein*, oder stärker an die *beads* gebunden waren, aus der Probe entfernt.

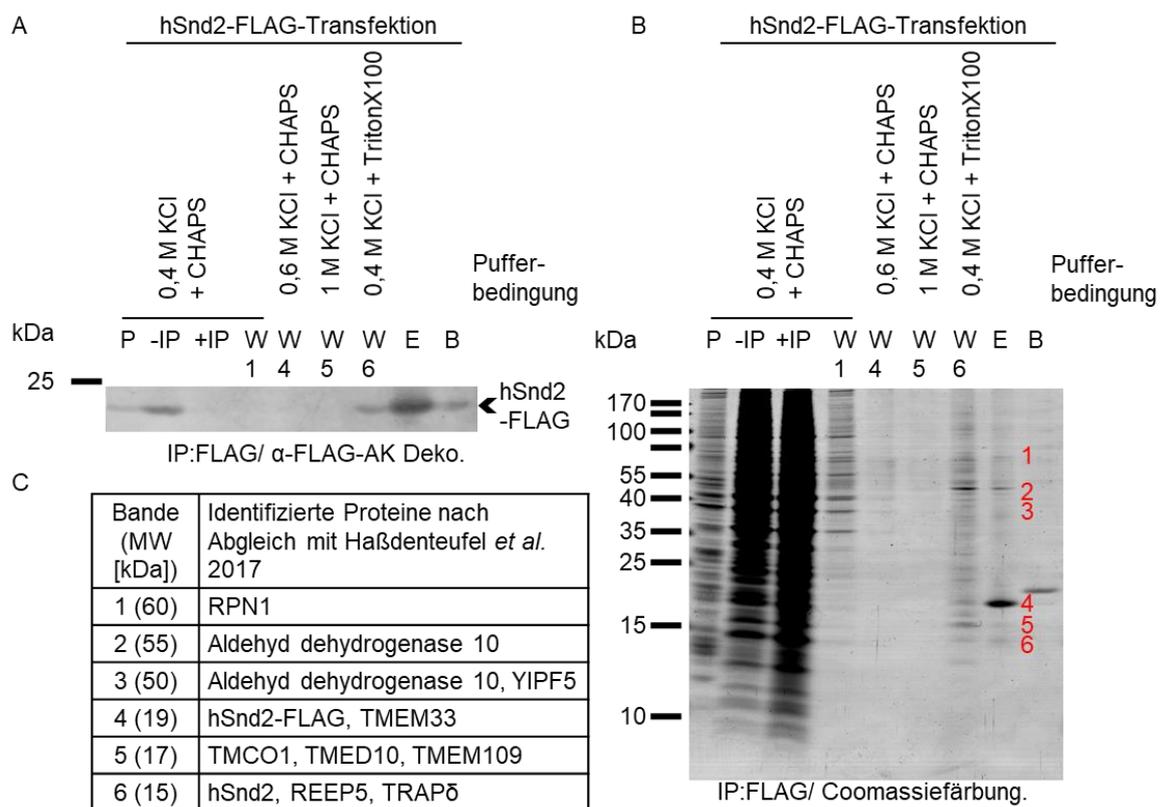


Abb. 18: Spezifizierung der hSnd2-Interaktionspartner durch eine optimierte Co-IP mit hSnd2-FLAG als *baitprotein*. Die Zellen wurden ausgesät und wie in Abschnitt 5.5.3 beschrieben mit dem hSnd2-FLAG-Plasmid transfiziert, die Expression erfolgte für 24 Stunden. Die Zellen wurden geerntet und gemäß 5.2.6 in einer Co-IP verwendet. Nach der Lyse und Zentrifugation wurde das Pellet (P) vom Überstand (-IP) getrennt. Zum Überstand wurde ANTI-FLAG® M2 *Affinity Beads* gegeben und über Nacht inkubiert. Die *beads* wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert (+IP), darauf folgend die *beads* gewaschen (W1). Das Vorgehen in der Co-IP wurde um zwei Waschschriffe mit gesteigerten Salzkonzentrationen (W4, W5) und einem Waschschrift mit dem stringenteren Detergens TritonX-100 erweitert (W6). Es folgte eine kompetitive Elution, um die Proteine von den *beads* zu lösen (E). Verbleibende Proteine wurden durch das Erhitzen der *beads* in Laemmli abgelöst (B). Aufgetragen wurden 10^5 Zelläquivalente, bzw. 10^6 Zelläquivalente für die Proben W1-E aus den jeweiligen Überständen nach Zentrifugation. **A:** Die Funktionalität des Experimentes, die Aufreinigung des hSnd2-FLAG im Eluat, wurde durch die immunologische Detektion mit einem α-FLAG-Antikörper

nachgewiesen. **B:** Nach einer Anfärbung der aufgetrennten Proteine mittels kolloidalem Coomassie (Kap. 5.2.3) wurden im Eluat sechs Banden identifiziert die ausgeschnitten und zur MS an Frau Dr. Claudia Fecher-Trost (UdS; Homburg) gegeben wurden. **C:** Die identifizierten Proteine aus den besagten Banden wurden abgeglichen mit der Kandidatenliste aus Haßdenteufel et al. (2017). Aus diesem ergab sich die aufgeführte Liste an spezifischeren Interaktionspartnern für das hSnd2. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens zwei unabhängigen biologischen Replikaten, sowie das Gel, das zum Ausschneiden der Banden nach der Färbung genutzt wurde.

In der abschließenden Elution waren nur noch vereinzelte Banden zu erkennen, von denen die sechs markierten ausgeschnitten und zur Massenspektrometrischen Analyse an Frau Dr. Claudia Fecher-Trost (Pharmakologie und Toxikologie, UdS; Homburg) gegeben wurden. Die resultierende Liste wurde mit Hilfe des Scaffold-Viewers ausgewertet (Gewählten Parameter: Protein Threshold: 99 %; Min # Peptides: 2; Peptide Threshold: 95 %). Proteine, die nicht in der ER Membran lokalisiert sind, wurden ausgeschlossen, worauf ein Abgleich mit den bereits identifizierten potentiellen Kandidaten erfolgte (Haßdenteufel et al. 2017). Die Ergebnisse sind in Abb. 18C dargestellt. Bei deren Analyse zeigte sich, dass Translokon-assoziierte Proteine wie RPN1 und TRAP δ identifiziert werden konnten (Pfeffer et al. 2014; Pfeffer et al. 2017). Gleichzeitig wurde auch das Protein TMCO1 in den Versuchen identifiziert, welches als OXA1-Homolog identifiziert wurde und ebenfalls die Insertion von Proteinen in die ER-Membran unterstützt (Anghel et al. 2017). Zusätzlich wurde neben hSnd2-FLAG, welches als *baitprotein* genutzt wurde, das endogene hSnd2 identifiziert. TMEM109 oder auch MG23 genannt, ist ein bisher wenig charakterisiertes Protein, welches Kanäle aus Multimeren ausbildet, die den Durchtritt von Kationen erlauben und ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Lemos et al. 2021; Venturi et al. 2011). Die weiteren gelisteten Proteine, sind Aldehyde dehydrogenase 10 (Fettstoffwechsel), YIPF5 (Transport zwischen ER und Golgi), TMEM33 (tubuläres ER), TMED10 (sekretorischer Transport) und Reep5 (ER-Membranprotein) (Chang & Yoshida 1997; Chang et al. 2013; Nguyen & Debnath 2020; Urade et al. 2014; Yoshida et al. 2008). Alle Proteine könnten, unabhängig von deren Funktion, Interaktionspartner oder aber potenzielle Transportsubstrate des humanen SND-Transportweges sein und daher ebenfalls mit hSnd2 interagieren. Nicht aufgeführt in dieser Liste, da keine Übereinstimmung mit der in Haßdenteufel et al. (2017) publizierten Liste vorliegt, jedoch ebenfalls identifiziert wurden Proteine, deren Assoziation zum Translokon in der Vergangenheit gezeigt werden konnte. Dies ist für die Proteine TRAP γ und SPC18, eine Untereinheit des Signalpeptidase-Komplexes der Fall (Kalies et al. 1998; Pfeffer et al. 2017). Analog zu den in der Masterarbeit publizierten Ergebnissen wurde auch in dieser Arbeit das Protein PPIA als Interaktionspartner identifiziert (Sicking 2017). Als cytosolisches Protein könnte es als hSnd1-Ortholog agieren (Wang & Heitman 2005). Die vollständigen Ergebnisse der MS Analyse sind im Anhang in Tab. 15 angefügt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass das Ziel, die Kandidatenliste der Interaktionspartner des hSnd2 einzuengen erreicht wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass hSnd2 im

räumlichen Kontakt mit dem Translokon steht und potenziell einen mindestens dimeren Komplex darstellt. Weiter identifizierte Proteine können sowohl Interaktionspartner als auch Transportsubstrate sein. Diese zeigen keine auffälligen Gemeinsamkeiten, mit der Ausnahme, dass es sich um Membranproteine handelt. Dies ist jedoch dem analytischen Vorgehen geschuldet. Einen definitiven Interaktionspartner zu bestimmen ist auch nach diesem experimentellen Vorgehen noch nicht möglich.

6.1.2. Co-IP zur Identifikation von hSnd2-Interaktionspartnern ohne zusätzliche *bait*protein-Expression

Da der bisherige Nachweis einer Verbindung zwischen hSnd2 und dessen Interaktionspartnern auf einem markierten, also artifiziellen, hSnd2-FLAG beruht, wurde die Methode der Co-IP weiter ausgearbeitet. Durch die Verwendung von unbehandelten Zellen ohne eine plasmidgetriebene Proteinexpression wurde kein Überschuss an hSnd2 generiert. Dieser Überschuss könnte möglicherweise eine Fehllokalisierung, falsche Interaktion oder Akkumulation des Proteins zur Folge gehabt haben und so falsch-positive Ergebnisse anzeigen. Aus diesem Grund wurde eine weitere Co-IP durchgeführt.

Für die Aufreinigung des nicht markierten hSnd2 wurde der Ablauf der Co-IP so strukturiert, dass diese durch den Einsatz von α -hSnd2-Antikörpern ermöglicht wurde. Hierfür wurden HeLa-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator gehalten, wonach ein Medienwechsel erfolgte. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, gezählt (Kap. 5.5.2) und mit Hilfe des in der Co-IP verwendeten Lyse-Puffers lysiert und somit Membranproteine solubilisiert (Kap. 5.2.6). Die Proben wurden zentrifugiert (P) und der Überstand (-IP) mit Antikörpern gegen das gesuchte Protein, hier α -hSnd2, versetzt (+IP). Nach einer Inkubation über Nacht wurden Protein A sowie Protein G Sepharosebeads zugefügt, welche den F_c -Teil von Antikörpern binden. Nach drei Waschschritten (W) erfolgte eine Elution durch einen sauren pH-Shift und eine Fällung des Eluats mittels TCA (E) (Kap. 5.2.7). Durch die Verwendung des α -hSnd2 Antikörpers, konnte hSnd2 erfolgreich an die *beads* gebunden werden, was durch eine abnehmende Bandenintensität im Vergleich der Proben -IP und +IP zu erkennen ist (Abb. 19). Ebenfalls wurde das Protein stabil an die *beads* gebunden, da nur eine Bande mit schwacher Intensität im Waschschriff zu erkennen war. Dass eine Elution des Proteins durch den sauren pH-Shift erfolgreich war, wird durch die erkennbare Bande in Spur E deutlich. Das Signal in Spur B (ausgekochte *beads*) zeigt jedoch auch, dass nicht alle hSnd2-Proteine im Eluatschritt wieder von den *beads* gelöst werden konnten. Gleichzeitig ist dies jedoch auch ein vorteilhafter Indikator dafür, dass die Bindung an die *beads* durchaus spezifisch war, denn keines der anderen im Folgenden immunologisch detektierten Proteine zeigt ein Signal in Spur B und damit keine unspezifische Bindung an die *beads*.

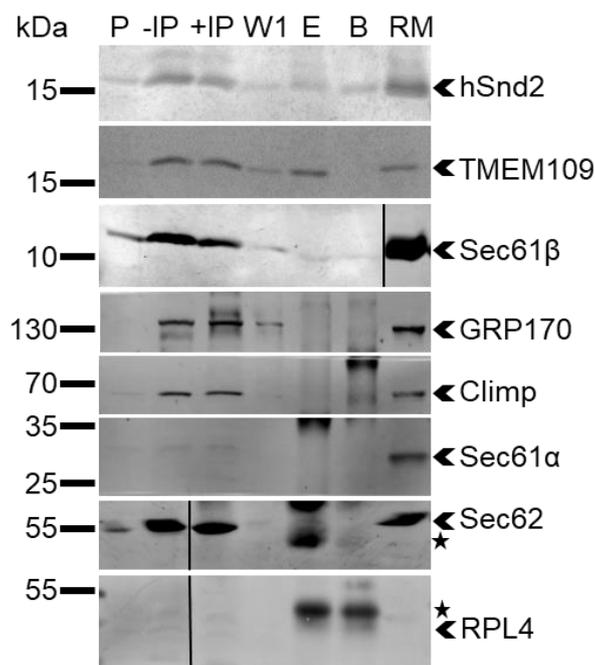


Abb. 19: Immunologische Detektion der endogenen Co-IP. Nach der Lyse und Zentrifugation wurde das Pellet (P) vom Überstand (-IP) getrennt. Zum Überstand wurde α -hSnd2 spezifische Antikörper zugegeben und über Nacht inkubiert. Nach einer Inkubation mit Sepharose (A und G) wurde erneut der Überstand abgenommen (+IP). Es wurden drei Waschschriffe vorgenommen, von denen nur der erste mittels SDS-PAGE analysiert wurde (W1). Die Elution erfolgte über einen pH-Shift (E). Abschließend wurden die *beads* mit Laemmli ausgekocht (B). Von den Fraktionen wurden $2 \cdot 10^5$ Zelläquivalente, für das Eluat $1 \cdot 10^6$ Zelläquivalente des Überstandes nach Zentrifugation aufgetragen. Die Fraktionen aus dem Prozess der Co-IP wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF Membran übertragen und durch verschiedene Antikörper per immunologischem Nachweis detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zur Co-IP aus mindestens zwei biologischen Replikaten.

GRP170 wurde in dem Experiment als Lysekontrolle verwendet und zeigt an, dass das Auflösen der Membranen erfolgreich war, da GRP170, als großes luminales Protein, nicht im Pellet zu finden ist. Gleichzeitig ist es ebenfalls nicht mit hSnd2 aufgereinigt worden. Von den Proteinen, die Teile des Translokons bilden, ist nur Sec61 β in geringen Mengen vorzufinden, Sec62 und Sec61 α konnten im Eluat nicht nachgewiesen werden. Dies war in vergangenen Studien mit dem effizienteren hSnd2-FLAG System jedoch möglich (Sicking 2017). Das gleiche gilt für Climp und das ribosomale Protein RPL4. Als einziges Protein, das in größerem Maße mit hSnd2 aufgereinigt werden konnte, ist TMEM109 zu nennen. Um das gesamte Proteom des Eluats zu ermitteln, wurde eine Probe für die MS-Analyse vorbereitet. Die Proben wurden auf ein precast Gel aufgetragen, das Gel kurz nach dem Einlauf der Proben ins Trenngel gestoppt, mittels kolloidalem Coomassie angefärbt (Kap. 5.2.3) und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Die MS-Analyse erfolgte erneut mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Claudia Fecher-Trost im Institut für Pharmakologie und Toxikologie (UdS; Homburg). Hierbei konnten in Übereinstimmung zu potenziellen Interaktionspartnern aus Haßdenteufel et al (2017) und Kapitel 6.1.1 nur TMEM109 identifiziert werden. Darüber hinaus wurden weitere Proteine wie das ribosomale RS3 und das ER-luminale Chaperone BiP identifiziert, die für das Projekt interessant sind, da sowohl das Ribosom als auch BiP mit dem

Sec61 α , also der zentralen Komponente des Translokons interagieren (Schäuble et al. 2012; Voorhees et al. 2014). In Übereinstimmung mit vorhergegangenen Co-IP Analysen das zytosolische Protein PPIA in der Eluatfraktion identifiziert werden. Die genannten zytosolischen Proteine konnten nicht per Western Blot analysiert werden, während BiP in vorhergegangenen Studien in hSnd2-FLAG Co-IPs nicht mit Hilfe von Western Blots detektiert werden konnte (Sicking 2017). Die vollständige Ergebnisliste ist in Tab. 16 im Anhang angefügt. Weiter analysiert wurden diese Proteine im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TMEM109 für weitere Untersuchungen in den Fokus als potenzielles hSnd3-Protein gerückt ist, da es konstant in allen bisherigen Experimenten als Interaktionspartner zu hSnd2 identifiziert werden konnte. Sec61 β , welches ebenfalls in den Eluatproben detektiert werden konnte, wird nicht favorisiert, da hSnd2 bei strukturellen Analysen des Translokons bisher nicht in Erscheinung trat (Gemmer & Förster 2020).

6.1.3. Co-IP mit TMEM109 Varianten zur Bestätigung der Interaktion in der ER-Membran

Zur Bestätigung der Proteininteraktion aus zuvor beschriebenen Experimenten zwischen hSnd2 und TMEM109 sollte untersucht werden, ob diese gemeinsame Aufreinigung auch gezeigt werden kann, wenn umgekehrt TMEM109 als *bait*protein verwendet wird. Durch die Lokalisation in der ER- bzw. Kernmembran, der multimeren Kanalstruktur und der potenziellen Fähigkeit Ionen über die Membran zu transportieren, ist TMEM109 auch funktionell interessant für die Analyse im Kontext des humanen SND-Transportweges (Nishi et al. 1998; Venturi et al. 2011).

Der Aufbau des Experimentes erfolgte wie in Kapitel 5.2.6 beschrieben. Die Zellen wurden für 24 Stunden in 6 cm Zellkulturschalen kultiviert, worauf eine Transfektion mit Plasmiden folgte, die entweder für *TMEM109-FLAG* oder *HSND2* codiert waren. In Abb. 20A wurden Zellen verwendet, die mit einem *TMEM109-FLAG* codierenden Plasmid transfiziert wurden, welches für 24 Stunden die Expression des genannten Gens ermöglicht.

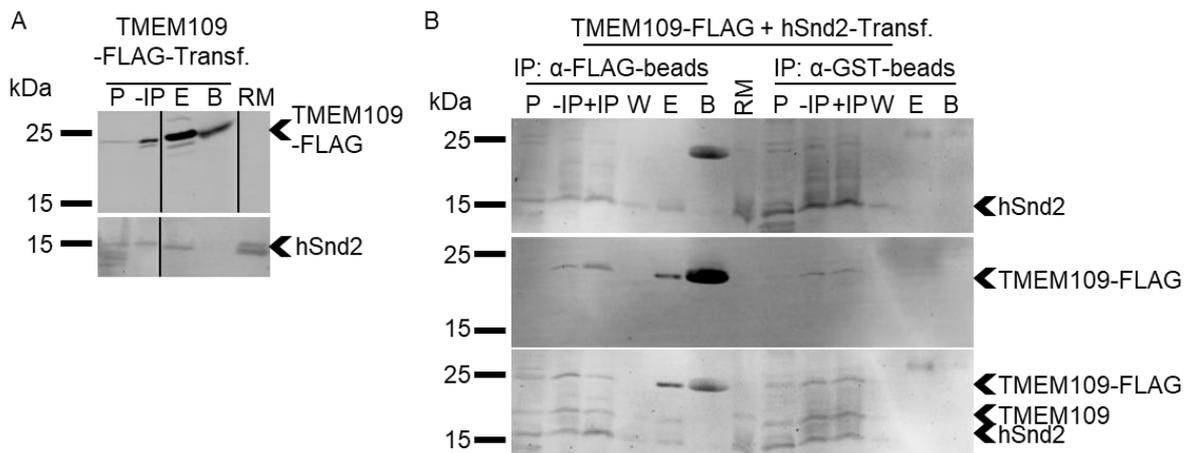


Abb. 20: Etablierung der Co-IP mit TMEM109-FLAG als *bait*protein. **A:** Durchführung einer Co-IP wie in 5.2.6 beschrieben mit TMEM109-FLAG transfizierten Zellen. Durchgeführt wurde die Co-IP mit Hilfe von ANTI-FLAG[®] M2 *Affinity Beads*. Sowohl das mit FLAG markierte TMEM109 konnte aufgereinigt werden, sowie auch hSnd2, wie im Eluat (E) zu sehen ist. **B:** Kontrolle der funktionellen Co-IP mit ANTI-FLAG[®] M2 *Affinity Beads* durch die Verwendung von GST gekoppelten *beads* als nicht funktionelle Kontrolle. TMEM109-FLAG konnte erfolgreich aufgereinigt werden, zusammen mit hSnd2. Trotz gesteigerter Expression von hSnd2 durch die Transfektion mit einem hSnd2-Plasmid wurde dieses nicht in der Eluatfraktion detektiert. P: Pellet; -IP: Überstand vor IP; +IP: Überstand nach der Inkubation mit den *beads*; W: erster Waschschrift; E: Elution; B: *beads* in Laemmli ausgekocht; RM: Raue Mikrosomen; aufgetragen wurden $2 \cdot 10^5$ Zelläquivalente pro Spur mit Ausnahme von E mit $1 \cdot 10^6$ Zelläquivalenten. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zur Co-IP aus mindestens drei biologischen Replikaten.

Nach der Ernte und Lyse der Zellen, wurden diese mit ANTI-FLAG[®] M2 *Affinity Beads* kombiniert, um das durch den FLAG-*tag* markierte Protein aufzureinigen. Dies war auch erfolgreich, wie in der Fraktion E zu erkennen ist. Zusammen mit TMEM109-FLAG konnte ebenfalls hSnd2 aufgereinigt werden. In Abb. 20B wurde identisch vorgegangen, nur dass zusätzlich zum TMEM109-FLAG Plasmid hier ebenfalls ein *HSND2* codierendes Plasmid in die Zellen eingebracht wurde. In diesem Experiment erfolgte eine Aufreinigung sowohl mit ANTI-FLAG[®] M2 *Affinity Beads* als auch mit α -GST *beads*. Mit Hilfe dieser *beads* sollte ausgeschlossen werden, dass hSnd2 oder TMEM109-(FLAG) durch die verwendeten *beads* falsch positiv aufgereinigt wurden. Die hier gewählten Bedingungen der Co-IP, die Transfektion mit beiden Plasmiden, also einer starken Expression dieser Proteine, stellten einen Zustand dar, unter welchen falsch-positive Signale zu auftreten können. Wie jedoch im rechten Teil der Abb. 20B zu erkennen ist, war weder eine Aufreinigung von hSnd2 noch einer Version des TMEM109 (endogenes oder transgenes FLAG-markierter TMEM109) durch die Verwendung der α -GST *beads* möglich. Deutlich wird der Unterschied zu einer funktionellen Bindung wie es in Abb. 20B links gezeigt ist an drei Punkten. Im Falle einer funktionellen Bindung ist (i) eine Abreicherung des gebundenen Proteins von Fraktion -IP zu +IP zu erkennen, (ii) der Verlust an Proteinmenge während der Waschschriffe gering, (iii) das gebundene Protein von den *beads* ablösbar (E). Eine Aufreinigung von TMEM109-FLAG

zusammen mit den endogenen TMEM109 und hSnd2 war nur erfolgreich, wenn α -FLAG *beads* verwendet wurden.

Im Folgeschritt war es erneut die Bestrebung, möglichst native Bedingungen für die Durchführung der Co-IP zu generieren. Daher wurden erneut unveränderte HeLa-Zellen verwendet, die nach dem Schema der Co-IP für endogene Proteine genutzt wurden (Kap. 5.2.6). Da TMEM109 hier als *baitprotein* agieren sollte, wurde der entsprechende Antikörper gegen dieses Protein verwendet. Die weiteren Schritte erfolgten wie bereits beschrieben (Kap. 5.2.6) und die Elution durch einen sauren pH-Shift. Durch die Coomassiefärbung des SDS-Gels (Abb. 21A) ist zu erkennen, dass der größte Anteil des Proteoms der Zelle im experimentellen Verlauf zugänglich gemacht wurde, da nur ein geringer Teil ungelöst in der Pelletfraktion zurückgeblieben war. Gleichzeitig erfolgte die Aufreinigung nicht ungerichtet, da keine spezifische Abreicherung von Proteinen im Allgemeinen zwischen der -IP und der +IP-Spur festgestellt werden konnte. Die Eluatspur zeigt, dass nur ein geringer Anteil des Proteoms zusammen mit TMEM109 aufgereinigt werden konnte. Interessanterweise sind die dort angefärbten Banden gut vergleichbar mit dem Bandenmuster, das entsteht, wenn hSnd2 als *baitprotein* in unbehandelten Zellen verwendet wurde (Abb. 10A). Die identischen Zellen wurden verwendet, um gezielte immunologische Detektionen einzelner Proteine nach der Co-IP durchzuführen, gezeigt in Abb. 21B. Bestätigend zur Co-IP die in Abb. 20 gezeigt wurde, konnte auch hier hSnd2 zusammen mit TMEM109 im Eluat identifiziert werden, genau wie Sec61 β , als Teil des Translokons. Sec61 α als dessen zentrales Protein konnte nicht im Eluat nachgewiesen werden. Die funktionellen Kontrollen des Experimentes GRP170 (ER-Lumen und Climp (ER-Membran) zeigten, dass der grundsätzliche Aufbau der IP auch hier funktionell war, und die Membran des ERs aufgelöst wurde, da diese Proteine entweder nicht oder nur in geringem Maße im Pellet (P) detektiert wurden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sowohl für das überexprimierte als auch das endogene TMEM109-Protein hSnd2 als Interaktionspartner mittels der Co-IP bestätigt werden konnte. Auch hier wurde, übereinstimmend mit den vorhergegangenen Experimenten mit dem hSnd2, Sec61 β aufgereinigt. Ebenfalls sollte beachtet werden, dass mit Hilfe des FLAG markierten TMEM109 die endogene TMEM109 Form zusätzlich aufgereinigt werden konnte, was auf eine mögliche Multimerisierung des TMEM109 hinweist (Abb. 20).

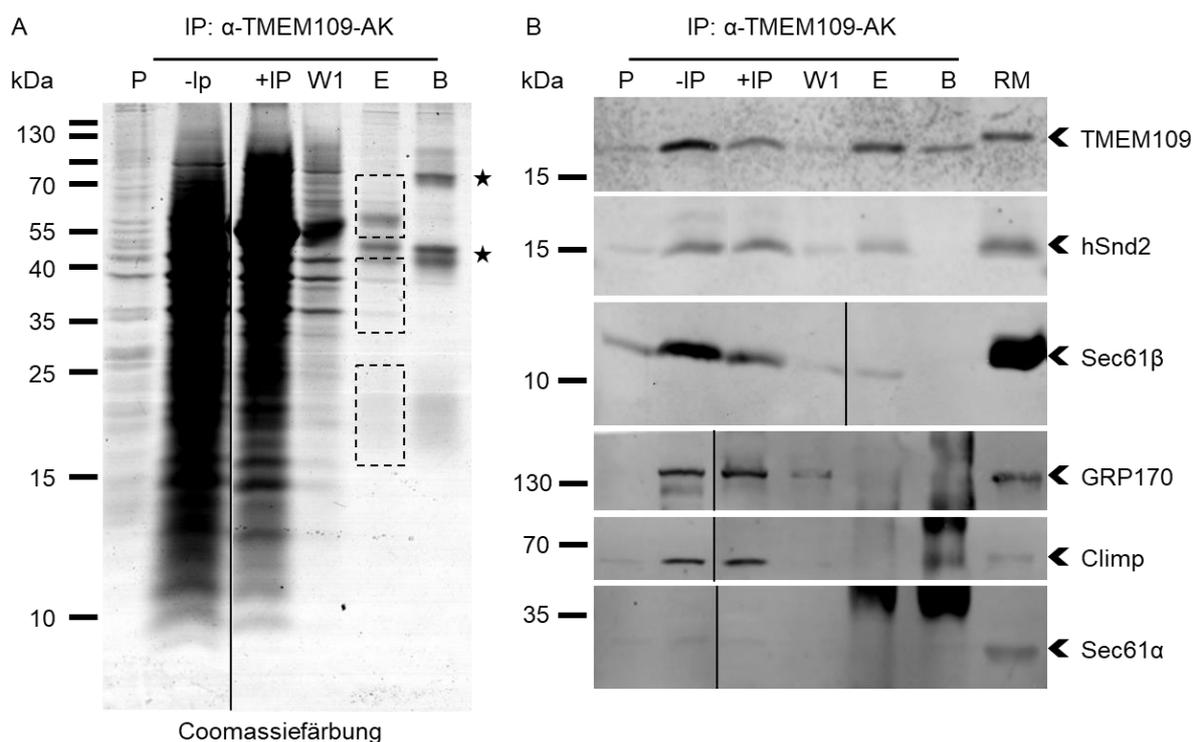


Abb. 21: Co-IP mit unbehandelten Zellen die mit TMEM109 als *baitprotein* durchgeführt wurden. Nach der Lyse der Zellen wurde der Überstand mit α -TMEM109 Antikörper über Nacht inkubiert und darauffolgend mit Sepharose versetzt. Nach den Waschschritten und einer sauren Elution wurden die *beads* abschließend mit Laemmli ausgekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf verschiedene Arten analysiert. **A:** Kolloidale Coomassie-Färbung zur Identifizierung der insgesamt aufgereinigten Proteinmenge. **B:** Detektion spezifischer Proteine mittels immunologischem Nachweis. Erfolgreich konnte, zusammen mit dem TMEM109-Protein, hSnd2 und Sec61 β im Eluat detektiert werden. P: Pellet; -IP: Überstand vor IP; +IP: Überstand nach der Inkubation mit den *beads*; W: erster Waschschritt; E: Elution; B: *beads* in Laemmli ausgekocht; RM: Raue Mikrosomen; aufgetragen wurden $2 \cdot 10^5$ Zelläquivalente pro Spur mit Ausnahme von E mit $1 \cdot 10^6$ Zelläquivalenten. Mit Sternen markierte Banden stellen artifizielle Antikörpersignale dar. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot bzw. gefärbtes Gel zur Co-IP aus mindestens zwei biologischen Replikaten.

6.1.4. Entgegengerichtete Co-IP zur Bestätigung der weiteren Interaktionskandidaten

Im Zusammenhang der Co-IP mit hSnd2 wurden neben TMEM109 und Sec61 β wie in Kapitel 6.1.1 und 6.1.2 beschrieben weitere Proteine identifiziert. Diese sind aufgrund ihrer bisher beschriebenen Eigenschaften nicht direkt mit der Funktionsweise eines Proteintargetingweges in Übereinstimmung zu bringen. Allerdings ist es während einer Co-IP ebenfalls möglich, dass nicht nur dauerhaft miteinander interagierende Proteine gemeinsam eluiert werden. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass transiente Interaktionen zu einer gemeinsamen Aufreinigung führen, was bedeutet, dass identifizierte Proteine auch Transportsubstrate des humanen SND Transportweges darstellen könnten. Hier ist in erster Linie Reep5 zu nennen. Durch die relativ mittig im Protein lokalisiert (Trans)membrandonmänen entsteht eine hairpin-Struktur des Proteins. Diese mittig lokalisierten Domänen zeigen eine Parallele zu den bisher identifizierten SND-Transportsubstraten, für die eine zentral lokalisierte TMD als Charakteristikum beschrieben wurde (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017; Lee et al. 2020).

Um die Hypothese der Interaktion dieser zwei Proteine zu testen, wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche zur Expression von markierten Formen des Reep5 und hSnd2 führten (Kap. 5.5.3). Die Zellen wurden nach dem bereits beschriebenen Vorgehen behandelt. In diesem Fall wurde der spezifische α -Reep5-Antikörper eingesetzt, um das Protein an die *beads* zu binden. Im Verlauf der Co-IP wurde Reep5 erfolgreich an die *beads* gebunden, was durch eine Abreicherung des Proteins von Fraktion -IP zu +IP erkennbar war (Abb. 22). Identisches ist auch für hSnd2-FLAG zu beobachten. Während Reep5 im Eluat effizient von den *beads* gelöst wurde, war für hSnd2-FLAG nur eine schwache Banden und für hSnd2 keine Bande detektierbar. In der mit α -GST-Antikörper aufgereinigten Kontrolle wurde weder eine Abreicherung noch eine erfolgreiche Elution des Reep5 detektiert. Dies spiegelte sich dementsprechend in den Signalen für hSnd2 und hSnd2-FLAG wider.

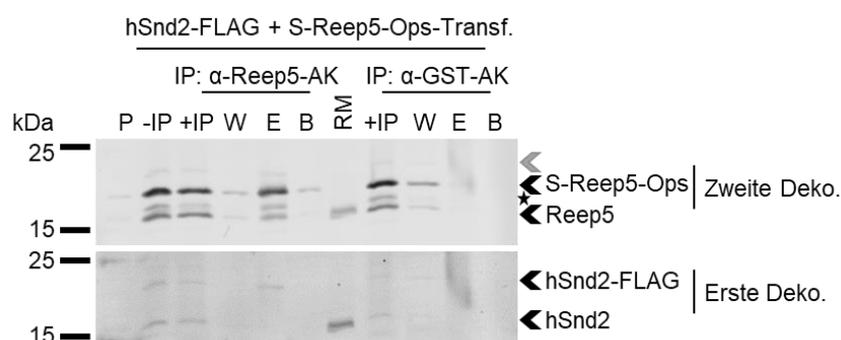


Abb. 22: Co-IP mit potenziellen hSnd2 Interaktionspartnern, um die bisher identifizierte Interaktion reziprok zu bestätigen. Die Co-IP wurde wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben mittels spezifischer Antikörper gegen Reep5 durchgeführt. Verwendet wurden Zellen, die hSnd2 und Reep5 in getaggtten Varianten exprimierten. Nach der Aufreinigung mit Hilfe von α -Reep5 oder zur Kontrolle α -GST Antikörpern wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und hSnd2 bzw. Reep5 immunologisch detektiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Reep5 als auch die getaggte Form aufgereinigt werden konnte, allerdings nur die getaggte und überexprimierte Form von hSnd2. Die GST-Kontrolle zeigte für keines der beiden Proteine eine erfolgreiche Aufreinigung. P: Pellet; -IP: Überstand vor IP; +IP: Überstand nach der Inkubation mit den *beads*; W: erster Waschschrift; E: Elution; B: *beads* in Laemmli ausgekocht; RM-Raue Mikrosomen; aufgetragen wurden $2 \cdot 10^5$ Zelläquivalente pro Spur mit Ausnahme von E mit $1 \cdot 10^6$ Zelläquivalenten. Mit Sternen markierte Banden stellen artifizielle Antikörpersignale dar. Graue Pfeile symbolisieren Signale, die von der ersten Detektion mit einem anderen Antikörper (unteres Panel) stammen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zur Co-IP aus mindestens drei biologischen Replikaten.

Dies lässt die Vermutung zu, dass die Interaktion zwischen Reep5 und hSnd2 nur als schwach beschrieben werden kann. Bei einer erfolgreichen Aufreinigung von Reep5, war es nicht möglich, das endogene hSnd2 zu detektieren und auch die stärker exprimierte Variante, das FLAG-markierte hSnd2 war nur in geringen Mengen nachweisbar. Reep5 wird daher weiterhin nicht als potenzielles hSnd3-Protein aufgeführt, ist aber aufgrund der Struktur nach wie vor ein vielversprechender Kandidat als Substrat des SND-Transportweges.

6.1.5. Bestimmung der hSnd2-Topologie zur Aufklärung möglicher Interaktionsmuster im NanoBiT-System

In der Vorbereitung auf die Verwendung des NanoBiT-Systems für den Nachweis von Proteininteraktionen in lebenden Zellen (Kap. 6.1.8) musste die topologische Struktur des hSnd2-Proteins in der Membran des ERs aufgeklärt werden. Dies ist grundlegend, da die Termini der Proteine, deren räumliche Nähe zueinander untersucht werden soll, mit *tags* versehen werden, um eben jene Nähe zu überprüfen (Abb. 12A). Da die *tags* des NanoBiT-Systems für einen Nachweis miteinander interagieren können müssen, ist es entscheidend zu wissen, auf welcher Seite der Membran diese bei Fusionsproteinen lokalisiert sind. Die Struktur von hSnd2 in der Membran wurde mit Hilfe unterschiedlicher Software auf Basis verschiedener Algorithmen vorhergesagt. Dies resultierte in unterschiedlichen Topologien (Abb. 23). Experimentelle Nachweise erfolgten bisher indirekt und suggerierten eine Topologie mit drei TMD (Lei et al. 2020; Zhao et al. 2013). Gleichzeitig zeigt die Struktur des Orthologs in der Hefe vier TMD und eine Übereinstimmung einer charakteristischen Sequenz am C-Terminus, was es als möglich erscheinen lässt, dass der C-Terminus auch im humanen System im Zytosol lokalisiert sei (Haßdenteufel et al. 2017).

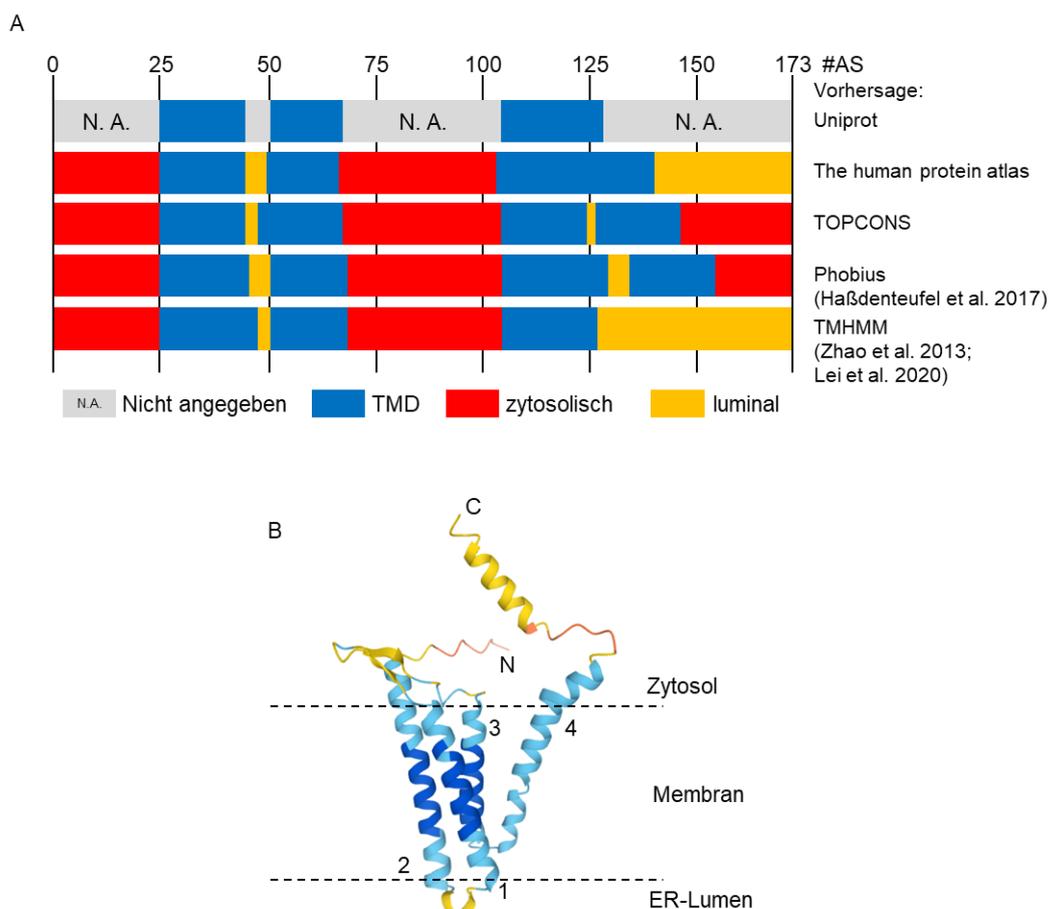


Abb. 23: Topologische Vorhersage der Struktur von hSnd2 mittels verschiedener Software. A: Die Vorhersage erfolgte mittels der Websites: www.uniprot.org/ (Consortium 2020); <http://www.proteinatlas.org/> (Version 20.1) (Uhlen et al. 2017); <https://topcons.cbr.su.se/pred/> (Tsirigos

et al. 2015); [http://\(phobius.sbc.su.se/](http://phobius.sbc.su.se/) (Käll et al. 2004); www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ (Möller et al. 2001) Zugriff auf die Webpages: 01.02.2021. Aufgeführt wird ebenfalls, wenn die Vorhersage in der Literatur genutzt wurde. In blau werden TMD, rot zytosolische und in gelb luminal Domänen dargestellt. Die Topologie des Proteins wurde bis in die dritte TMD (ca. 120 AS) relativ einheitlich vorhergesagt. Nicht übereinstimmend sind die Vorhersagen für eine vierte TMD und damit die Lokalisierung des C-Terminus. **B:** Strukturvorhersage durch die Website: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9BTX3> (Zugriff 04.08.2021(Jumper et al. 2021)). Die Verlässlichkeit des Modells wird durch die Farbgebung wiedergegeben. Dunkelblau: sehr sicher; hellblau: sicher; gelb: geringe Sicherheit; orange: sehr geringe Sicherheit. Hinzugefügt wurde die Beschriftung des C- und N-Terminus, die Nummer der TMD 1-4 und die Orientierung in der Membran.

In Abb. 23A ist zu erkennen, dass alle Programme den N-Terminus als zytosolisch lokalisiert vorhersagen und das Protein mindestens drei TMD besitzt. Während die Vorhersage bis ca. Aminosäure 120 nahezu identisch ist, zeigt für den C-terminalen Teil des Proteins die Vorhersage durch das TOPCONS und das Phobius Programm einen weiteren, kurzen luminalen Loop, auf den eine vierte TMD folgt. Als Folge daraus wäre der C-Terminus zytosolisch lokalisiert. Alternativ dazu wird das Protein mit drei TMD durch das Programm TMHMM, Uniprot und The human protein atlas vorhergesagt. Dies unterscheiden sich jedoch zusätzlich untereinander darin, dass die Vorhersage des The human protein atlas eine deutlich längere TMD vorhersagt, die in den zwei anderen Programmen als luminaler Teil des Proteins berechnet wird. In Abbildungsteil B ist die durch ein 3D Vorhersageprogramm errechnete Struktur des humanen hSnd2 Proteins dargestellt. Diese sagt in Übereinstimmung mit dem Phobius- und TOPCONS-Service vier α -helicale Transmembrandomänen vorher, was zur Folge hat, dass beide Termini im Zytosol vorhergesagt werden. Die Uneinigkeit der Vorhersagen und das Fehlen eines direkten experimentellen Nachweises über die Orientierung von hSnd2 führte zu einer intensiveren Behandlung des Themas, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

Zur Erbringung des Nachweises wurde eine Sequestrierung mit Hilfe von Digitonin und Trypsin durchgeführt (Kap. 5.2.10), sowie ein *in vitro* Proteintransport (Kap. 5.3.2), bei dem eine spezifische Glykosylierung nur erfolgen konnte, wenn der C-Terminus von hSnd2 im Lumen des ERs lokalisiert sein würde. Zusätzlich wurde die Idee des *in vitro* Transportes auf vitale Zellen übertragen, um auch hier einen Nachweis über die Lokalisierung des Proteins zu generieren.

Die Vorbereitung der Sequestrierung erfolgte, indem $6 \cdot 10^5$ Zellen in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit Plasmiden transfiziert wurden, die für verschiedene ER-Membranproteine codieren (*HSND2-FLAG*, *TMEM109-FLAG*, *TRAPA-FLAG*, *TRAPB-FLAG*). Ebenfalls wurden die Experimente auch mit untransfizierten Zellen und rauen Mikrosomen durchgeführt. Dadurch sollte zum einen auch die unmarkierte Variante der Proteine untersucht werden und zum anderen durch die rauen Mikrosomen der identische Nachweis in Zellextrakten eines anderen Organismus (Hund) erbracht werden. Die Zellen wurden wie in 5.2.10 beschrieben geerntet und für das Experiment vorbereitet. Hierbei ist die

Permeabilisierung der Plasmamembran entscheidend, die Trypsin bzw. Proteinase K den Zugang zu zytosolischen Anteilen der Proteine ermöglicht, wodurch diese abgebaut wurden. Eine weitere Probe wurde zusätzlich mit TritonX-100 behandelt, um ebenfalls die ER-Membran zu ruptieren. Als Folge daraus werden auch luminalen Bestandteile des Proteins abgebaut. Die Proben wurden anschließend für die SDS-PAGE vorbereitet und per Western Blot auf eine Membran übertragen, auf der eine immunologische Detektion der Proteine erfolgen konnte. Durch die Detektion mit Antikörpern gegen die verschiedenen Termini der Proteine konnte so eine Aussage über die Lokalisierung des Terminus getroffen werden. Detektiert wurden alle Proteine mit Antikörpern, die gegen den jeweiligen C-Terminus des Proteins gerichtet waren. Für das hSnd2-Protein ist in Abb. 24A zu erkennen, dass sowohl in rauen Mikrosomen, als auch das endogene und FLAG-markierte hSnd2-Protein in Zellen keine Bande in der immunologischen Detektion generierte, sobald Trypsin im Zytosol präsent war. Eine trunkeerte Form des Proteins, erkennbar durch eine tiefer erscheinende Bande, war nicht vorhanden. Da sowohl der FLAG-*tag* am C-Terminus lokalisiert war als auch der gegen das endogene hSnd2 gerichtete Antikörper den C-Terminus erkannte, lässt sich daraus folgern, dass der C-Terminus zytosolisch orientiert vorliegt. Dies ist in der nebenstehenden schematischen Abbildung dargestellt. In Abb. 24B ist ein identisches Ergebnis für TMEM109 zu erkennen. Dessen Struktur ist experimentell bereits mit drei TMD bestätigt, wodurch dieses als funktionelle Kontrolle für polytope Membranproteine mit einem zytosolischen Terminus in diesem Versuch aufgeführt ist (Venturi et al. 2011). Die Struktur der zwei weiteren als Kontrolle genutzten Proteine des TRAP-Komplexes (α und β) ist ebenfalls aus der Literatur bekannt und konnte als diese bestätigt werden (Pfeffer et al. 2017). TRAP α zeigte, dass sowohl der angebrachte *tag* am C-Terminus, als auch der C-Terminus des Proteins selbst durch die initiale Behandlung mit Trypsin nach der Permeabilisation mit Digitonin abgebaut wurde. Die Ergebnisse für das TRAP β Protein zeigen, dass die Membran des ERs nach der Behandlung mit Digitonin noch intakt ist, da die Struktur am N-Terminus, die für die Erkennung durch den gegen TRAP β gerichteten Antikörper entscheidend ist, noch besteht (Abb. 24D). Durch die Verwendung des α -FLAG-Antikörpers für das zusätzlich exprimierte Konstrukt konnte gezeigt werden, dass der *tag* am C-Terminus ohne die Behandlung mit TritonX-100 abgebaut wurde. In RMs konnte nach dem Einsatz von Trypsin nur eine Verkürzung des Proteins festgestellt werden, erkennbar an der verringerten Laufhöhe. Zusätzlich ist nach der Zugabe von TritonX-100 eine geringere Proteinmenge zu erkennen. Dass die Verringerung der Laufhöhe so gering ausfällt, ist mit dem geringen Anteil von Aminosäuren zu begründen, die vom Protein abgetrennt werden, sobald Trypsin auf der zytosolischen Seite Zugang zum Protein erlangt.

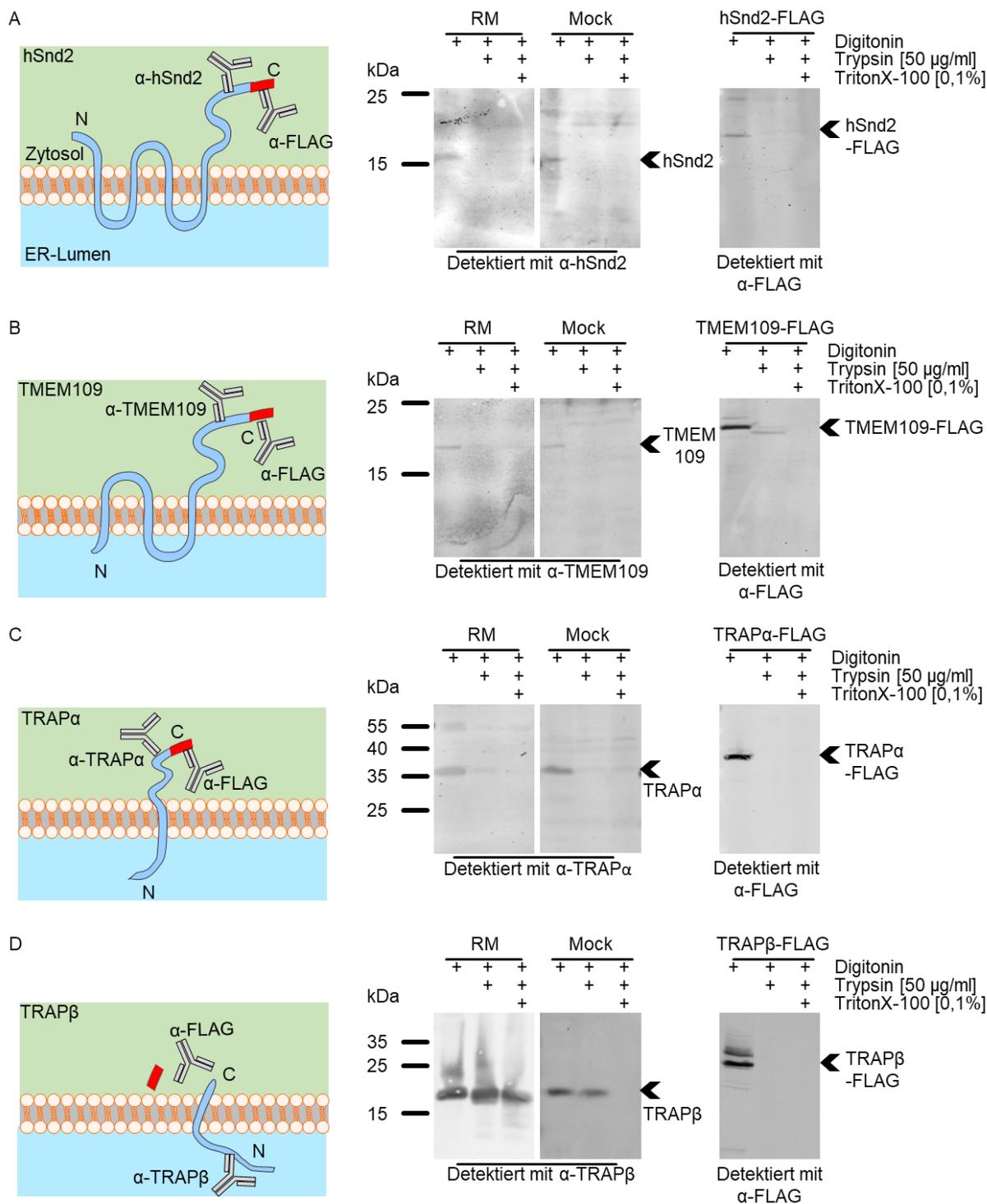


Abb. 24: Sequestrierung von verschiedenen Proteinen zur Aufklärung der Lokalisierung der Termini. Es wurden RMs und HeLa-Zellen verwendet, letztere entweder untransfizierten (Mock) oder transfiziert mit den aufgeführten Proteinen (Kap. 5.5.3) **A:** Ein Signal für das hSnd2 Protein, welches am C-Terminus durch den Antikörper detektiert wird, zeigt keine Bande nach einer Behandlung mit Trypsin. Bestätigt wird dies durch die Verwendung des α -FLAG Antikörpers für C-terminal markiertes hSnd2-FLAG. **B:** Gleiches gilt für das TMEM109 Protein, dessen C-Terminus bestätigt im Zytosol liegt und identische Resultate zum hSnd2 Protein zeigt (Venturi et al. 2011). **C** und **D:** Als weitere Kontrollen wurden die Proteine TRAP α und TRAP β verwendet. Der C-Terminus beider Proteine ist zytosolisch orientiert, weswegen dieser durch die Trypsin Behandlung abgebaut wurde (Pfeffer et al. 2017). Auch die am C-Terminus angefügten FLAG-tag werden dementsprechend verdaut, sobald Trypsin den Proben zugegeben wird. Der N-Terminus von TRAP β wird in HeLa-Zellen erst degradiert, wenn die ER-Membran durch die Verwendung von TritonX-100 aufgelöst wird. Dies zeigt das die ER-Membran bis

zu diesem Schritt intakt war. In RMs ist hingegen nur eine Verkürzung des Proteins in beiden Fraktionen zu erkennen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Sequestrierung aus mindestens vier biologischen Replikaten.

Die Ergebnisse der Sequestrierung sollten zusätzlich auf eine zweite experimentelle Weise bestätigt werden. Dazu wurde eine Sequenzänderung des hSnd2 mittels Quick-Change-PCR vorgenommen. Hierbei wurde Serin an der Stelle 150 des Proteins durch Asparagin ersetzt, was zur Folge hatte, dass ein N-X-S/T Motiv entsteht (hSnd2-S150N). Dieses Motiv ist ein Signal für die N-Glykosylierung, welche exklusiv im ER-Lumen erfolgt (Bause & Legler 1981; Imperiali & Hendrickson 1995). Diese Glykosylierung kann jedoch nur erfolgen, wenn der betreffende Teil des Proteins auch im ER-Lumen lokalisiert ist. Daher wurde für die Mutation spezifisch die Aminosäure 150 ausgewählt, denn diese läge laut der Vorhersagen im Lumen des ERs, falls das hSnd2 nur drei TMD besäße (Abb. 23). Wenn also die Mutation und damit der C-Terminus im Zytosol vorliegt, erfolgt keine Glykosylierung (schematisch dargestellt in Abb. 25E). Diese wäre als Veränderung der molekularen Masse zu identifizieren nach einer Auftrennung über SDS-PAGE und immunologischer Detektion. Neben hSnd2, als das Protein dessen Topologie aufgeklärt werden sollte, wurde TRAP β als Kontrolle für diese Experimente verwendet, da dieses Protein zweifach glykosyliert wird und damit parallel zu den in Abb. 24D gezeigten Experimenten eine passende Kontrolle bildet.

Die Fragestellung, ob hSnd2-S150N glykosyliert werden kann oder nicht, wurde auf zwei Arten adressiert. Hierfür wurden hSnd2, hSnd2-S150N und TRAP β in *in vitro* und *in cellula* Transporten als Substrat verwendet (Abb. 25A und C). Hier wird die mRNA der zu transportierenden Proteine zu bereits vorbereiteten unbehandelten SPZ gegeben (Kap. 5.3.2; 5.5.5). Während der Synthese des Proteins wird radioaktives ^{35}S -Methionin in die Aminosäuresequenz eingebaut, was eine Nachverfolgung des Transportes mittels Phosphorimaging ermöglichte. Als Nachweis einer möglichen Inhibition der Glykosylierung wurde der Glykosylierungsinhibitor NYT hinzugegeben, der diese reduziert und damit die Reifung eines Proteins einschränken würde. Diese Einschränkung erfolgt, da NYT dem zuvor genannten Glykosylierungsmotiv entspricht und so kompetitiv die Glykosylierung endogener Proteine hemmt (Lopez-Sambrooks et al. 2016). Dieser Effekt ist in Abb. 25C dargestellt. Wenn TRAP β in das ER überführt und dort an zwei Stellen glykosyliert wurde, resultierte daraus ein reifes Protein, welches eine größere molekulare Masse aufweist als das unreife, nicht-glykosylierte, Protein (Lopez-Sambrooks et al. 2016). Die Folge waren zwei Banden auf dem Radiogramm, TRAP β in der reifen Form (reif) und in einer noch nicht-glykosylierten Form (ohne Glykosylierung; o. G.). Wurde nun der Glykosylierungsinhibitor NYT zum Synthesemix zugegeben, erfolgte diese Glykosylierung nur noch in sehr geringem Umfang, was das Fehlen der oberen Bande, des reifen TRAP β erklärt. Der Nachweis über die Funktionalität des *in vitro* Transportes und der erfolgreichen Inhibition der Glykosylierungen ist dadurch erbracht worden und konnte somit auf die eigentlich interessanten Proteine hSnd2 und hSnd2-S150N

experimentell übertragen werden. In Abb. 25A ist zu erkennen, dass durch den Transport von hSnd2 oder hSnd2-S150N keine zweite Bande im Radiogramm identifiziert werden konnte. Dies zeigt, dass keine posttranslationale Modifikation der beiden Proteine erfolgte. Ebenfalls wurde keine Veränderung des Bandenmuster ersichtlich, wenn NYT eine potenzielle Glykosylierung verhinderte. Beide Ergebnisse lassen indirekt darauf schließen, dass keine Glykosylierung der hSnd2-Konstrukte im *in vitro* Transport erfolgte und dementsprechend hSnd2 eine Topologie mit vier TMD aufweist.

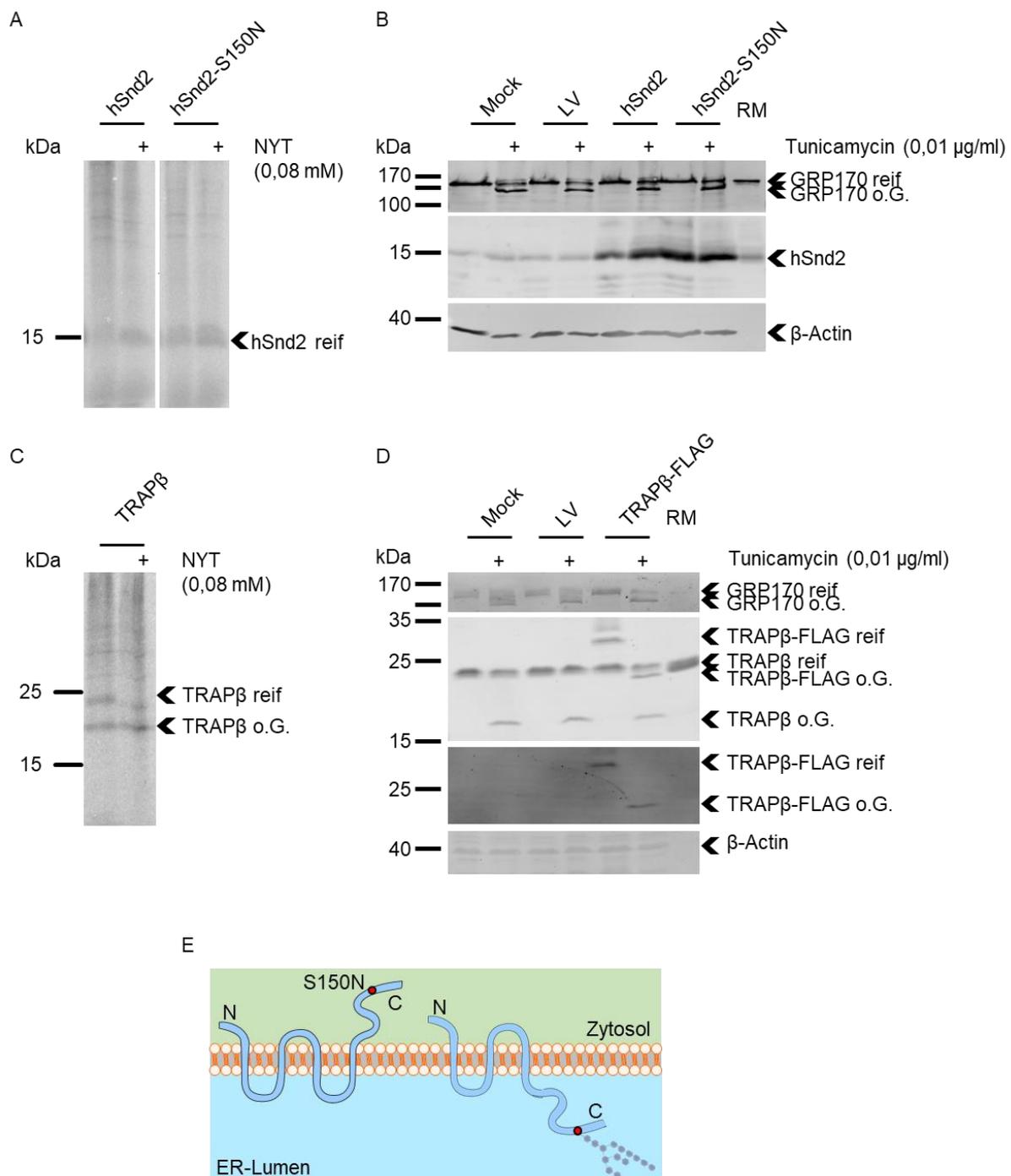


Abb. 25: Nachweis der Lokalisierung des C-Terminus von hSnd2 durch *in vitro* und *in cellula* Glykosylierung. Durch die Mutation von hSnd2-S150N wurde eine Glykosylierungsstelle erzeugt, die

nur glykosyliert wird, wenn der entsprechende Teil des Proteins in das ER hineinragt. Dadurch wurde durch die Ab-, bzw. Anwesenheit einer Glykosylierung gezeigt, ob dieser Teil des Proteins im ER oder im Zytosol lokalisiert ist. **A:** hSnd2 und hSnd2-S150N wurden in *in vitro* Ansätzen als Transportsubstrat verwendet. Nach der Präparation von semi-permeabilisierten Zellen (Kap. 5.5.5) wurden diese wie in Kapitel 5.3.5 beschrieben für den Transport eingesetzt. Durch den Glykosylierungsinhibitor NYT sollte eine Glykosylierung verhindert werden, wodurch eine entsprechende Bande fehlen würde. Dies ist am Kontrollexperiment mit TRAP β zu erkennen (**C**). Hier wird eine Glykosylierung des reifen Proteins verhindert. **B:** *In cellula* Transport von hSnd2 und hSnd2-S150N. HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (Kap. 5.5.3), 24 Stunden inkubiert, woraufhin die Zellen geerntet und lysiert wurden (Kap. 5.5.2;5.5.6). Hier wurde ebenfalls durch die Zugabe von Tunicamycin acht Stunden nach Transfektion die Glykosylierung neu synthetisierter Proteine verhindert, wodurch unreife Proteine detektiert werden konnten. Dies ist für hSnd2 oder hSnd2 S50N nicht der Fall, jedoch für das Kontrollexperiment mit TRAP β (**D**). In beiden Fällen wurde GRP170 als funktionelle Kontrolle der experimentellen Durchführung genutzt, um zu zeigen, dass eine Glykosylierung erfolgreich inhibiert werden konnte. **E:** Theoretische Topologie des hSnd2-Proteins inklusive eingezeichneter Mutation S150N. Die Glykosylierung kann nur erfolgen, wenn die Mutation und damit der C-Terminus im ER liegt, wie im rechten Teil des Schemas gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot bzw. *in vitro* Transport von mindestens zwei biologischen Replikaten.

Verifiziert wurde dieses Ergebnis durch *in cellula* Transportversuche. Hierbei wurden Zellen mit den entsprechenden Plasmiden, identisch zu den *in vitro* Versuchen, transfiziert, um eine Generierung der zu untersuchenden Proteine durch die Zelle zu erzwingen. Die Zellen wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und 24 Stunden später entsprechend der Vorgabe transfiziert (Kap. 5.5.3). Nach weiteren 8 Stunden wurden die Zellen mit dem Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin behandelt, um wie auch in den *in vitro* Transportstudien zeigen zu können, dass eine potenziell entstehende Glykosylierung inhibiert werden kann (Duksin & Mahoney 1982). Als Lösemittelkontrolle für Tunicamycin wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Die Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert und anschließend geerntet, gezählt und das Proteom per SDS-PAGE aufgetrennt. Darauf folgte eine immunologische Detektion von hSnd2 oder TRAP β . Als experimentelle Kontrolle, ob Tunicamycin die Glykosylierung neu synthetisierter Proteine inhibiert, wurde GRP170 verwendet, welches ebenfalls mehrfach glykosyliert wird (Park et al. 2003). Dieses Protein zeigte, dass eine weitere, tiefer laufende Bande entsteht, sobald der Inhibitor Tunicamycin zugegeben wurde, was auf eine nicht erfolgte Glykosylierung des Proteins aufgrund des Inhibitors zurückzuführen ist. Der experimentelle Aufbau konnte somit als funktionell bestätigt werden. In Abb. 25B sind die Ergebnisse nach der Verwendung der hSnd2-Konstrukte dargestellt. Die erfolgreiche Expression der eingebrachten Proteine ist an der verstärkten Intensität der Bande zu erkennen, die mit Hilfe von α -hSnd2-Antikörpern detektiert werden konnte. Die aufgetragene Menge der Proben war vergleichbar, was die Ladekontrolle β -Actin anzeigt. Zwischen dem hSnd2 und dem hSnd2-S150N Konstrukt ist kein Unterschied in der Reifung des Proteins auszumachen. Auch in lebenden Zellen konnte keine zweite Bande detektiert werden. Der Inhibitor Tunicamycin hatte ebenfalls nicht das Entstehen einer nicht-glykosylierten Bande zur Folge. Diesen Effekt, dass nach der Behandlung mit Tunicamycin eine zweite Bande generiert wurde, die aus einer fehlenden Glykosylierung resultierte, war für

das Kontrollplasmid *TRAPB* zu erkennen. Hier konnte die Glykosylierung erfolgreich durch den Einsatz von Tunicamycin verhindert werden.

Die Ergebnisse der Sequestrierungsuntersuchungen wie auch der Nachweis einer nicht erfolgenden Glykosylierung des C-Terminus (*in vitro* und in lebenden HeLa-Zellen) lassen den Schluss zu, dass der C-Terminus des hSnd2 im Zytosol lokalisiert ist. Dadurch kann eine Topologie mit vier TMD für hSnd2 angenommen werden, wie es auch im Hefeortholog der Fall ist. Für folgende Experimente wird dementsprechend festgehalten, dass der N- und der C-Terminus von hSnd2 zytosolisch lokalisiert sind, und auch der C-Terminus von TMEM109 auf dieser Seite der Membran vorliegt.

6.1.6. Verifikation des NanoBiT-Systems durch den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb und zwischen Komplexen

Da in der Literatur keine Berichte über die Verwendung des NanoBiT-Systems gefunden werden konnten, in denen die Interaktion zwischen ER-Membranproteinen nachgewiesen werden sollte, war die Validierung dieses Aspektes ein elementarer Bestandteil des Etablierungsprozesses der Technik. Hierbei sollten sowohl Interaktionen innerhalb eines Proteinkomplexes als auch zwischen unterschiedlichen Komplexen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um einen Komplementationsassay bei dem durch die Generierung eines Lichtsignals die nahe räumliche Lokalisation bzw. Interaktion von zwei Proteinen zueinander in lebenden Zellen nachgewiesen werden kann (Kap. 5.2.9). Die beiden Proteine von Interesse wurden jeweils an einem ihrer Termini mit dem LgBiT- oder SmBiT-Konstrukt versehen und wie beschrieben in Zellen für 24 Stunden exprimiert. Dadurch, dass die beiden Fusions- oder „Reporterproteine“ miteinander interagieren, wurde eine funktionale Luciferase ausgebildet, die nach der Zugabe eines Substrates Lichtsignale generierte, welches ausgemessen werden konnte.

Zu diesem Zweck wurde eine Plasmidkollektion aufgebaut, die aus verschiedenen Proteinen des Translokonskomplexes bestand (Sec61 α , Sec61 β , Sec63, TRAP α und TRAP β), welche mit den unterschiedlichen Reporterstrukturen an den jeweiligen Termini versehen waren. Zur Verifikation wurden aus der Literatur bekannte Interaktionen überprüft. Hierbei handelte es sich zum einen um Interaktionen innerhalb des TRAP-Komplexes (Nguyen et al. 2018; Pfeffer et al. 2017), oder auch innerhalb des SEC61-Komplexes (Pfeffer et al. 2015; Van den Berg et al. 2004; Voorhees & Hegde 2016a). Es sind die Daten der Interaktionen zwischen TRAP α -C_L und TRAP β -C_S (Abb. 26) und Sec61 α -N_L und Sec61 β -C_S dargestellt (Abb. 27). Hierbei sind die abgebildeten Analysen identisch durchgeführt worden und dargestellt. In Abbildungsteil A ist jeweils die Topologie der untersuchten Proteine mit der jeweiligen Positionierung der Reporterstrukturen dargestellt. In den Abbildungsteilen B wurde der Nachweis der Korrekten Lokalisierung der Strukturen mit Hilfe der Sequestrierung erbracht. In beiden Fällen wurde das

Signal nur abgebaut, wenn zuvor ein Zugang zum Zytosol durch den Einsatz von Digitonin ermöglicht wurde. Dementsprechend zeigt die rote Kurve den darauffolgenden Abbau durch Trypsin. Wenn DMSO anstatt des Digitonins zugegeben wurde, erfolgte dieser Abbau nicht (blauer Verlauf). Dies zeigt an, dass die Reporterstrukturen, wie zu erwarten, intrazellulär lokalisiert waren, höchstwahrscheinlich in der Membran des ER. Auf eine detaillierte Lokalisierung der Fusionsproteine mittels Immunfluoreszenz wurde bisher jedoch verzichtet.

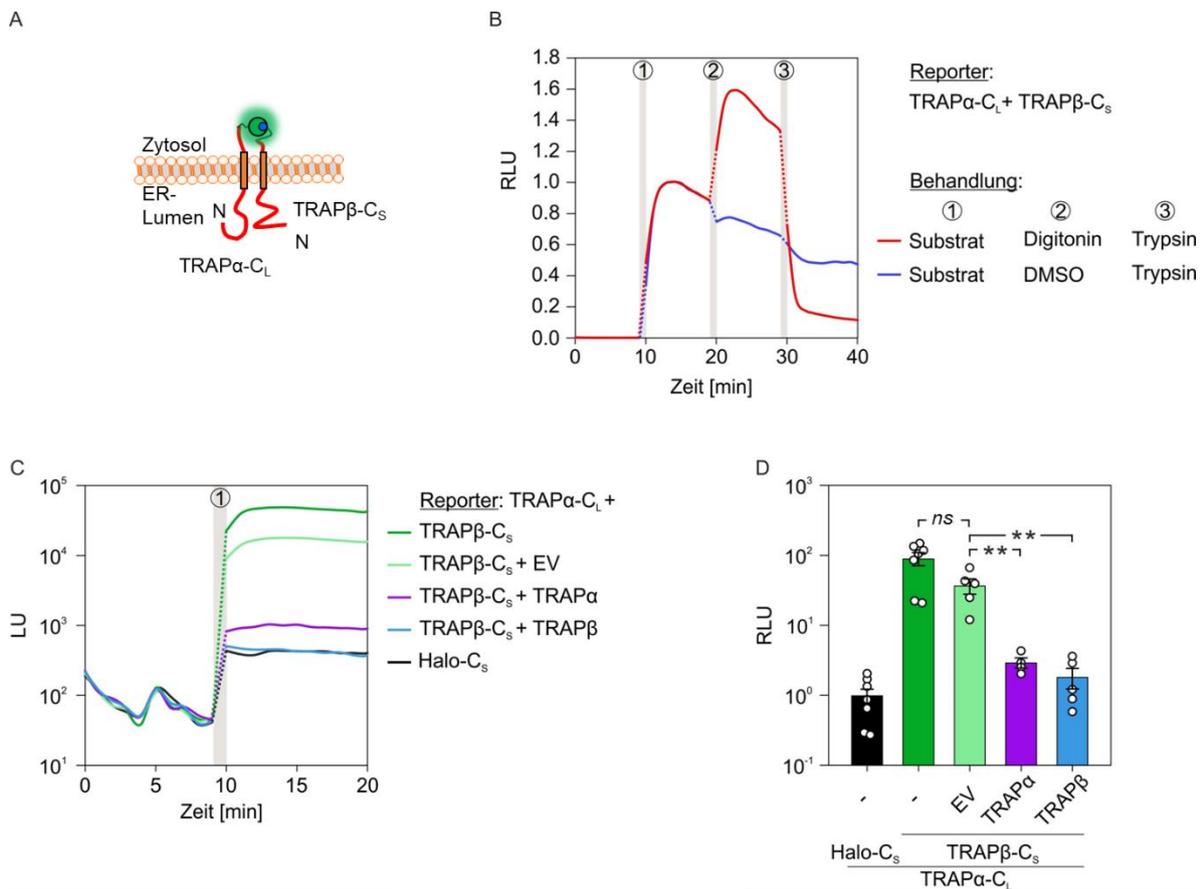


Abb. 26: Interaktionsnachweis zwischen Trap α und Trap β . Die Zellen wurden in einer weißen 96-well plate ausgesät und nach 24 Stunden mit je 50 ng/well der entsprechenden Plasmide transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch farbloses Opti-MEM™ ersetzt. Nach der Zugabe des Luciferase-Substrates konnte bei Interaktion der Luciferase-Untereinheiten ein Lichtsignal vermessen werden, welches die Nähe der beiden markierten Proteine wiedergibt. **A:** Schematische Darstellung der TRAP Konstrukte. Beide sind auf zytosolischer Seite, an dem dort lokalisierten C-Terminus mit den jeweiligen Reportstrukturen versehen. **B:** Nachweis der Lokalisierung der Reporterstrukturen im Zytosol. Durch den Einsatz von Digitonin wurde die Plasmamembran semi-permeabilisiert. Dadurch erhielt das im nächsten Behandlungsschritt applizierte Trypsin Zugang zum Zytosol und baute die Luciferase ab, wodurch das Signal reduziert wurde. Wenn DMSO anstatt Digitonin verwendet wurde, war ein gleichmäßiger Abfall des Signals über die Zeit zu beobachten. **C:** Nachweis der Spezifität der Interaktion zwischen TRAP α -C_L und TRAP β -C_S. Durch die zeitgleiche Expression der beiden markierten Proteine wurde ein Lichtsignal erzeugt (dunkelgrün). Dieses konnte durch die Expression der unmarkierten Form von TRAP α und TRAP β inhibiert werden. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Messungen. **D:** Grafische Zusammenfassung aller Messungen im Balkendiagramm für die Interaktion zwischen TRAP α -C_L und TRAP β -C_S. Die Signifikanz zwischen der funktionellen Interaktion (dunkelgrün) und der Probe, die um den Leervektor ergänzt wurde (LV) ist durch einen t-Test bestimmt worden. Die Signifikanz zwischen

den Proben, die mit drei Plasmiden transfiziert wurden, wurden mittels *One-Way ANOVA* mit entsprechendem *Post-hoc* Test bestimmt.

In den Abbildungsteilen C und D sind die Ergebnisse der funktionellen Interaktion zwischen den markierten Proteinen dargestellt, jeweils in grün. Dass die Interaktionen sowohl zwischen TRAP α und TRAP β , sowie zwischen Sec61 α und Sec61 β (Abb. 27C und D) spezifisch sind, wurde durch die Inhibition der Interaktion nach der Expression eines weiteren unmarkierten Proteins nachgewiesen. Dieses ist jeweils nach einem CMV-Promotor codiert, was die effiziente Expression und daraus folgend in der Regel effiziente Konkurrenz zu den markierten Varianten erlaubt. Daraus folgte in allen Fällen eine Reduzierung des Luciferasesignals (in lila und blau dargestellt).

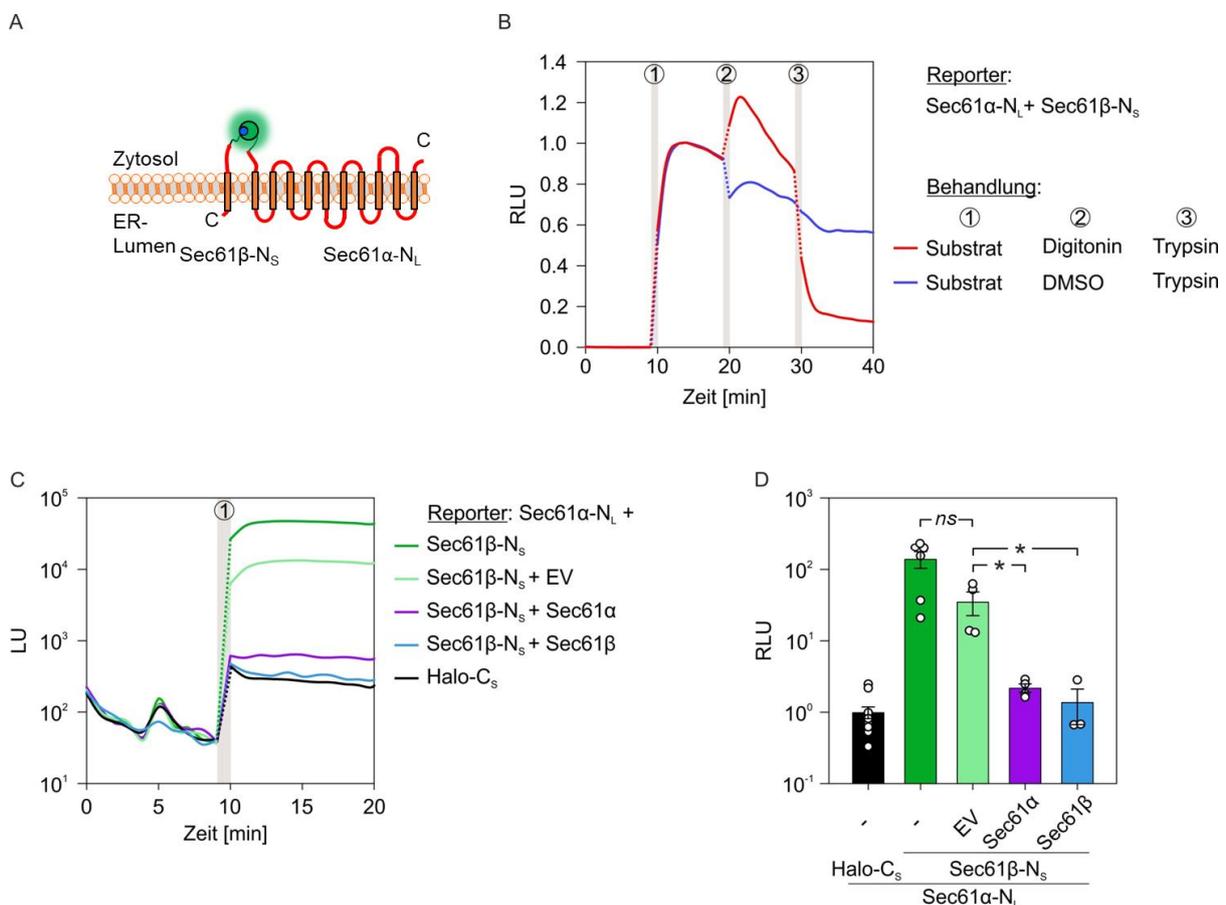


Abb. 27: Interaktionsnachweis zwischen Sec61 α -N_L und Sec61 β -N_s. Die Zellen wurden in einer weißen 96 well plate ausgesät und nach 24 Stunden mit je 50ng/well der entsprechenden Plasmide transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen und durch farbloses Opti-MEM™ ersetzt. Nach der Zugabe des Luciferase-Substrates konnte bei Interaktion der Luciferase-Untereinheiten ein Lichtsignal vermessen werden, welches die Nähe der beiden markierten Proteine wiedergibt. **A:** Schematische Darstellung der Sec61 Konstrukte. Beide sind auf zytosolischer Seite, an dem dort lokalisierten N-Terminus mit den jeweiligen Reportstrukturen versehen. **B:** Nachweis der Lokalisierung der Reporterstrukturen im Zytosol. Durch den Einsatz von Digitonin wurde die Plasmamembran semi-permeabilisiert. Dadurch erhielt das im nächsten Behandlungsschritt applizierte Trypsin Zugang zum Zytosol und baute die Luciferase ab, wodurch das Signal reduziert wurde. Wenn DMSO anstatt Digitonin verwendet wurde, war ein gleichmäßiger Abfall des Signals über die Zeit zu beobachten. **C:** Nachweis der Spezifität der Interaktion zwischen Sec61 α -N_L und Sec61 β -N_s. Durch die zeitgleiche Expression der beiden markierten Proteine wurde ein Lichtsignal erzeugt (dunkelgrün). Dieses konnte durch die Expression der unmarkierten Form von Sec61 α und Sec61 β inhibiert werden.

Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Messungen. **D:** Grafische Zusammenfassung aller Messungen im Balkendiagramm. Die Signifikanz zwischen der funktionellen Interaktion (dunkelgrün) und der Probe, die um den Leervektor ergänzt wurde (LV) ist durch einen t-Test bestimmt worden. Die Signifikanz zwischen den Proben, die mit drei Plasmiden transfiziert wurden, wurden mittels *One-Way ANOVA* mit entsprechendem *Post-hoc* Test bestimmt.

Da TMEM109 oder hSnd2 nicht als eine Komponente bereits bekannter Komplexe beschrieben ist, war es für zukünftige Analysen ebenfalls von Interesse Interaktionen außerhalb eines bestehenden Komplexes zu beschreiben. Hierfür wurden ebenfalls Proteine rund um das Translokon betrachtet. Beispielsweise sind in Abb. 28 die Interaktionen zwischen Sec61 β und Sec63 (A), sowie zwischen Sec61 α und Trap α (B) genauer überprüft und dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass eine effiziente Colokalisierung auch auf luminaler Seite, zwischen dem C-Terminus von Sec61 β und dem N-Terminus des Sec63-Proteins nachgewiesen werden konnte. Für beide Interaktionen (Sec61 β /Sec63 und Sec61 α /Trap α) konnte eine effiziente Konkurrenz durch die Expression eines nicht markierten Proteins gezeigt werden.

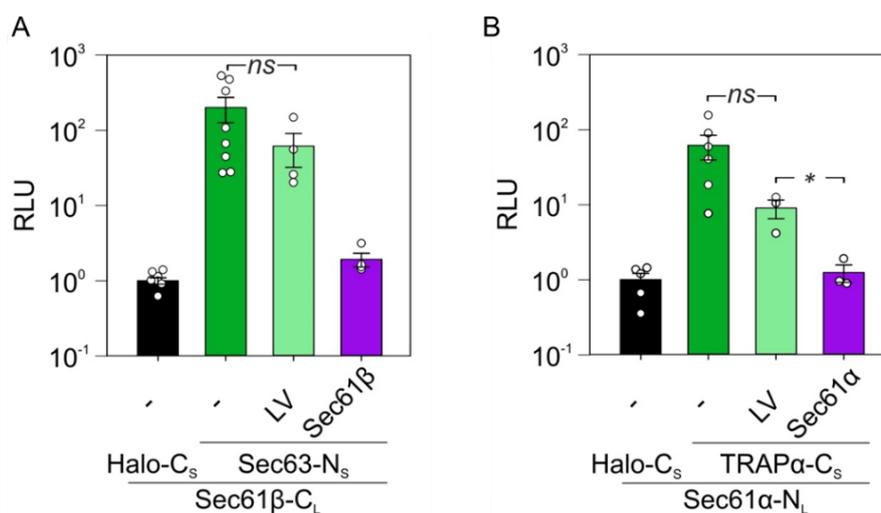


Abb. 28: Darstellung von Interaktionen zwischen Proteinen unterschiedlicher Komplexe. Experimentell wurde wie in 5.2.9 beschrieben vorgegangen. Getestet wurden die Interaktionen zwischen Sec61 β und Sec63 (A) und Sec61 α und Trap α (B). In beiden Fällen zeigte sich eine deutliche Interaktion zwischen den markierten Proteinen. Die Konkurrenz mit dem jeweiligen Protein ohne den LgBiT zeigte für beide Interaktionen eine signifikante Reduzierung des Luciferasesignals. Da in Abb. 26 und Abb. 27 die LgBiT Konkurrenz einen minimal schwächeren Effekt erbrachte wurde hier nur die LgBiT Konkurrenz durchgeführt. Die Signifikanzen zwischen den funktionellen Interaktionen (dunkelgrün) und mit dem Leervektor behandelten Proben (hellgrün) wurde durch t-Test überprüft, gleiches gilt für den Vergleich zwischen Leervektor und Plasmid behandelten Proben (violett). Es lässt sich festhalten, dass durch das System der Nachweis von Proteininteraktionen sowohl innerhalb eines bekannten Komplexes wie dem Sec61-Komplex oder dem TRAP-Komplex, aber auch Interaktionen außerhalb eines Komplexes nachgewiesen werden können. Dies lässt es zu,

dass das NanoBiT-System im nachfolgenden ebenfalls für den Nachweis von bisher unbekanntem Protein-Protein-Interaktionen verwendet wird.

6.1.7. Nachweis der Interaktion zwischen hSnd2 und TMEM109 in lebenden Zellen mittels NanoBiT

Nachdem durch Co-IP Experimente gezeigt werden konnte, dass sowohl TMEM109 mit hSnd2-FLAG oder hSnd2 aufgereinigt werden konnte und auch umgekehrt hSnd2 mit TMEM109 und TMEM109-FLAG aufgereinigt werden konnte, war es das Ziel diese Interaktion auch in lebenden Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren. Hierfür wurde das NanoBiT-PPI-System (Promega), wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, im Labor etabliert.

Basierend auf den Etablierungsversuchen wurden die unterschiedlichen Konstrukte für das TMEM109- und das hSnd2-Protein generiert (Kap. 5.4.8-5.4.11). Daraus resultierend entstanden vier unterschiedlich markierte Formen des hSnd2- und zwei Formen des TMEM109-Proteins, dargestellt in Abb. 29A. hSnd2 konnte an beiden Termini entweder durch einen LgBiT oder einen SmBiT markiert werden, während TMEM109 nur C-terminal markiert wurde. Grund hierfür ist, dass TMEM109 eine N-terminale Signalsequenz trägt, welche nach dem Transport in das ER abgespalten wird, wodurch der ein N-terminal zum Signalpeptid liegendes Reporterkonstrukt ebenfalls abgespalten werden würde. Die sechs generierten Plasmidkonstrukte erlaubten, dass insgesamt vier verschiedene Kombinationen der Interaktion zwischen hSnd2 und TMEM109 getestet werden konnten (I-IV). Die quantifizierten Ergebnisse der Interaktionsstudie hinsichtlich der getesteten Konstruktkombinationen sind Abb. 29B zu entnehmen. Es zeigt sich deutlich, dass die Kombination IV, aus C-terminal mit dem LgBiT versehenen TMEM109 und N-terminal SmBiT markiertem hSnd2 ein signifikant stärkeres Lichtsignal durch die Interaktion erzeugt als die drei anderen getesteten Kombinationen. Die Konstrukte I-III bewegen sich auf einem vergleichbaren Level, sind jedoch schwächer und überschreiten nicht den von uns und dem Hersteller gesetzten Schwellenwert von 10 RLU, der auf eine Interaktion hinweisen würde.

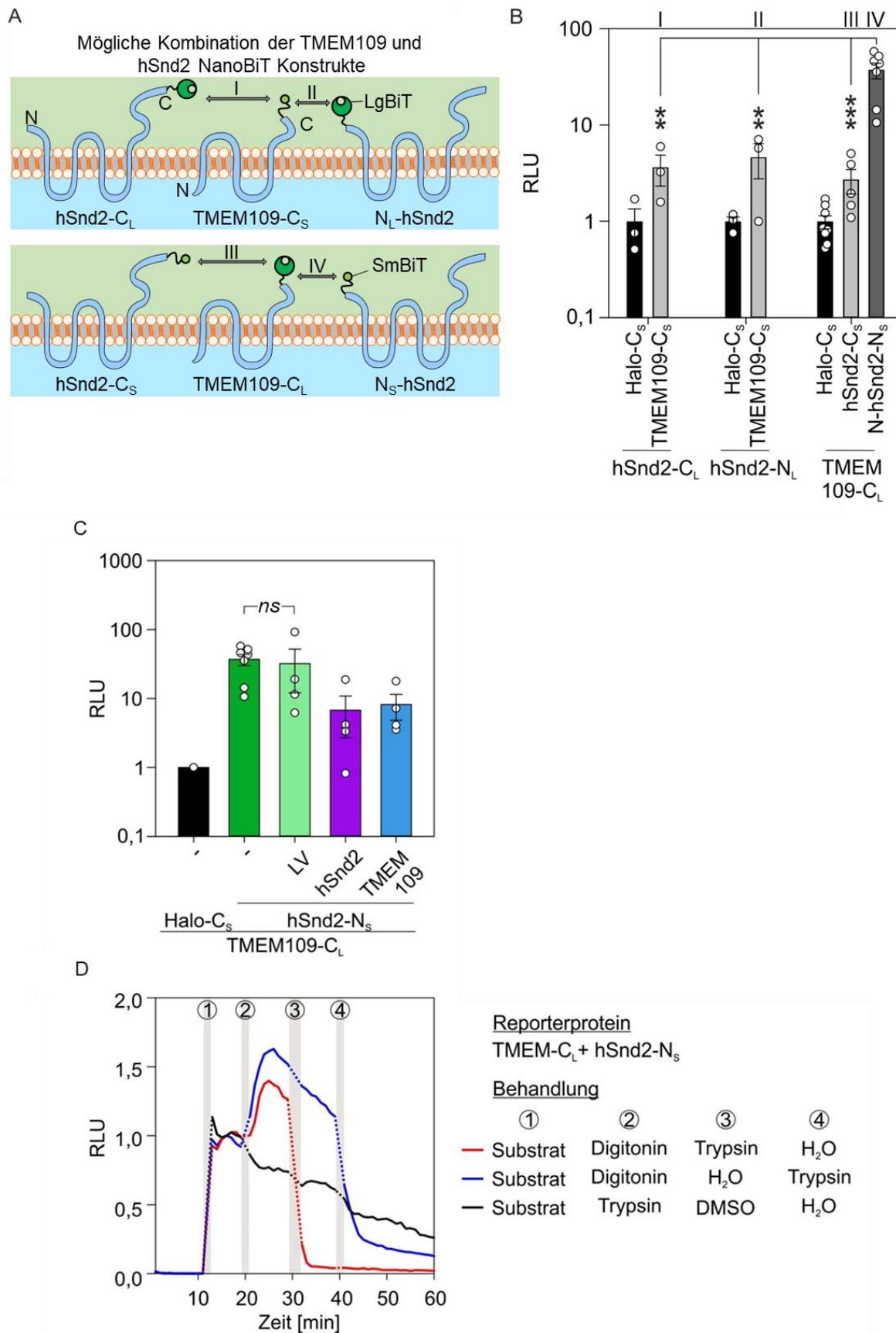


Abb. 29: TMEM109 und hSnd2 NanoBiT Konstrukte, deren Interaktionsmöglichkeiten und der Ermittlung der effektivsten Kombination aus hSnd2 und TMEM109. A: Schematische Darstellungen der Proteine mit den LgBiT und SmBiT Konstrukten an den jeweiligen Termini. Während es möglich war, insgesamt vier Varianten von hSnd2 zu generieren, ist dies für TMEM109 nur C-Terminal erfolgt. Aus

der Verbindung der LgBiT und SmBiT Varianten ergeben sich insgesamt vier mögliche Kombinationen (I-IV) in denen die Proteine ein funktionelle Luciferase generieren könnten. **B:** Bei der Auswertung der vier Kombinationen zeigte sich deutlich eine im Vergleich stärkere Interaktion von Kombination IV im Vergleich zu den anderen drei Kombinationen. Angegliedert wurde die gemessene Lumineszenz in jedem Fall individuell an die entsprechende Kontrolle, bestehend aus dem LgBiT markierten Protein und dem Halo-C-Konstrukt. Die Proben wurden statistisch durch einen *One-Way* ANOVA Test verglichen. **C:** Die Spezifität der Verbindung zwischen den gewählten TMEM109 und hSnd2-Varianten konnte durch die Verwendung von nicht markierten Proteinen gezeigt werden. Diese ersetzten markierte Proteine als Interaktionspartner und verringern so die Bildung von Paaren, die eine funktionelle Luciferase ausbilden und so das emittierte Licht. Statistisch wurde die funktionale Interaktion und die Kontrollprobe mit der Expression des Leervektors durch einen t-Test miteinander verglichen. Weitere Proben, die ein funktionelles kompetitives Protein beinhalteten, wurden mit dem *One-Way* ANOVA Test verglichen, zeigten jedoch auf Grund der Streubreite der logarithmisch aufgetragenen Daten keinen statistischen Unterschied, eine starke Tendenz der Competition ist dennoch erkennbar. **D:** Nachweis der Lokalisierung durch die Verwendung von Digitonin und Trypsin. Verwendet wurde die in Abbildung B etablierte Kombination IV aus TMEM109-C_L und N_S-hSnd2. Die Zellen wurden nacheinander mit Substrat, Digitonin, Trypsin, Wasser oder DMSO behandelt. Die einzelnen Kurven sind farblich codiert. Da ein starker Signalabfall erst nach einer kombinierten Behandlung mit Digitonin und Trypsin beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass die verwendeten Luciferase Komponenten im Zytosol lokalisiert sind, und damit die verwendeten Termini ebenfalls im Zytosol liegen. Graue Balken symbolisieren den Applikationszeitraum der unterschiedlichen Substanzen, in denen nicht gemessen werden konnte. Die gepunkteten Linien stellen daher den angenommenen Messverlauf in dieser Zeit dar.

Basierend auf dem Wissen, aus welcher Proteinkombination das stärkste Lichtsignal generiert werden konnte, wurde diese Kombination auf Ihre Spezifität hin geprüft. Dazu wurden, analog zu den in Abb. 29B gezeigten Ergebnissen, die Zellen zeitgleich mit dem TMEM109-C_L, HSND2-N_S und einem weiteren Plasmid transfiziert. Dabei handelte es sich um *TMEM109*, bzw. *HSND2* codierenden Plasmiden oder den Leervektor, damit die markierte Variante in den Komplexen durch nicht-markierte Varianten ersetzt werden konnte. Dies wurde dadurch unterstützt, dass das wild typische Protein im Vergleich zum markierten Protein stärker synthetisiert wurde, da es als cDNA stromabwärts des CMV-Promotor positioniert war, wodurch die Konkurrenzsituation weiter verstärkt wurde. Hierbei zeigte sich, dass durch den Einsatz der nicht-markierten Proteine die generierte Lichtintensität abnahm, was auf eine geringere Anzahl miteinander interagierender TMEM109-C_L-und hSnd2-N_S-Proteine zurückzuführen ist, entstanden durch die Konkurrenzsituation zwischen dem markiertem und den nicht-markierten Proteinen. Dies zeigt, dass die Interaktion dieser beiden markierten Proteine als durchaus spezifisch anzunehmen ist (Abb. 29C).

Um sicherzustellen, dass die markierten Proteine nicht falsch in der Zelle lokalisiert sind, wurde eine weitere Sequestrierung durchgeführt. Hierbei wurde die Eigenschaft des Assays, dass die Messung live verfolgt werden konnte, genutzt. Die Zellen wurden auf die bereits beschriebene Weise für die Messung vorbereitet (Kap. 5.2.9) und analog zu Abb. 12C und D behandelt. Die Ergebnisse sind als normierte Kurven in Abb. 29E dargestellt. Zu Beginn der Messung wurde kein Substrat zugegeben, sodass kein Lichtsignal detektiert werden konnte. Nach der Zugabe des Substrates (1) wurde dieses durch die Luciferase umgesetzt und ein Lichtsignal wurde generiert. Die Messung wurde erneut pausiert und den Zellen wurde

Digitonin zur Permeabilisierung der Plasmamembran zugegeben, woraus eine gesteigerte Lichtintensität resultiert (roter und blauer Verlauf). Zur Kontrolle wurden die Zellen in weiteren *wells* zeitgleich mit Trypsin behandelt (schwarzer Verlauf), worauf keine Veränderung des Signals beobachtet werden konnte. Wenn auf die Digitoninbehandlung nun eine Zugabe von Trypsin (T) folgte, konnte ein starker Abfall des Signals beobachtet werden (rot), der bei einer Behandlung mit der Lösemittelkontrolle Wasser nicht erfolgte (blau). Die Zugabe von Trypsin im dritten Schritt hatte zur Folge, dass kein Lichtsignal mehr nachweisbar war. Die Behandlung mit DMSO als Kontrolle zu Digitonin zeigte keinen Abbau des Signals. Somit kann geschlussfolgert werden, dass das Signal so lange vor dem Verdau mit Trypsin geschützt ist, solange eine intakte Plasmamembran vorliegt. Dementsprechend sind die beiden Reportereinheiten der Luciferase zytosolisch lokalisiert.

Ebenfalls konnte die zuvor in Abb. 20 mittels Co-IP beobachtete und auch aus der Literatur vermutete Multimerisierung von TMEM109 mit dem NanoBiT-System in lebenden Zellen bestätigt werden (Venturi et al. 2011). Durch die zeitgleiche Expression einer C-terminal LgBiT und einer C-terminal SmBit markierten Variante von TMEM109 konnte eine Komplementation der Luciferase erreicht werden, welche wiederum sensitiv gegenüber der Anwesenheit eines kompetitiven nicht markiertem TMEM109 war (Abb. 30). Eine identische Tendenz konnte auch für hSnd2 festgestellt werden. Neben den Daten der Co-IP Experimente mit FLAG-markiertem hSnd2, mit dessen Hilfe endogenes hSnd2 aufgereinigt werden konnte, wurde in den NanoBiT-Experimenten ebenfalls deutlich, dass ein Multimer aus hSnd2 Proteinen in der Membran vorliegen könnte. Die Interaktion ist deutlich schwächer (RLU = 13,5) als die Interaktion des gesicherten Multimeres des TMEM109-Proteins (RLU = 148,3, spezifische Werte in Abb. 31C einzusehen). Kompetitive Experimente konnten bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden.

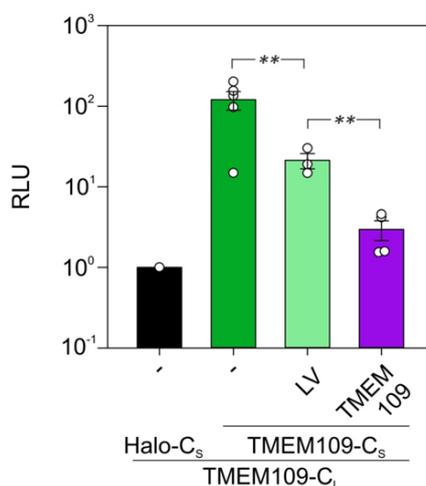


Abb. 30: Homomultimerisierung des TMEM109-Proteins. Es wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen pro *well* in einer weißen 96 *well plate* ausgesät und am Folgetag transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Zugabe des Furimazine-Substrates und eine Detektion des aus der Verbindung der zwei Untereinheiten

resultierenden Lichtsignals. Der Nachweis des Homomultimers von TMEM109 erfolgte mit der dementsprechenden Konkurrenz durch nicht markiertes TMEM109. Diese zeigte sich als signifikant unterschiedlich zum Kontrollversuch, in dem ein Leervektor-Plasmid genutzt wurde. Der Vergleich zwischen der funktionellen Interaktion und der Kontrolle durch den Leervektor, sowie der Vergleich zwischen Leervektor und Konkurrenz erfolgte mittels t-Test.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Co-IP Resultate vorhergegangener Experimente bestätigt werden konnten, da hSnd2 und TMEM109 auch in lebenden Zellen eine Interaktion eingehen. Der C-Terminus von TMEM109 und der N-Terminus von hSnd2 zeigen hierbei den Interaktionspunkt der beiden Proteine. Diese Interaktion, genau wie die Multimerisierung von TMEM109, konnte durch Komplementation als spezifisch nachgewiesen werden. Für die Homomultimerisierung des hSnd2-Proteins, welche ebenfalls in Co-IP Experimenten angedeutet wurde (Abb. 18), steht dieser Nachweis noch aus. Dass die betreffenden *tags*, die die Interaktion nachweisen, wie erwartet im Zytosol lokalisiert sind, konnte mit Hilfe eines Trypsinverdau belegt werden.

6.1.8. Interaktionsmatrix von hSnd2 und TMEM109 im Kontext des Translokons in vitalen Zellen

Einen zentralen Anteil zur Aufklärung der Funktionalität des humanen SND Transportweges würde dadurch geleistet werden, festzustellen, wie die Transportsubstrate in die ER-Membran inseriert werden, bzw. diese über die ER Membran transportiert werden. Dieser Schritt kann sowohl über die Proteine selbst erfolgen, sollten diese als Insertase agieren, oder unterstützt werden durch einen der bereits bekannten Proteintransportkanäle in der ER Membran. Da in den Experimenten, in denen TMEM109 oder hSnd2 als *baitprotein* verwendet wurden Sec61 β als Teil des Sec61-Komplexes per Western Blot identifiziert werden konnte, aber auch in Proteine des Translokons in der Massenspektrometrie identifiziert wurden, ist die Vermutung gegeben, dass TMEM109 und/oder hSnd2 mit dem Translokon interagieren könnten. Basierend auf diesen Überlegungen war es das Ziel weiterer Experimente zu zeigen, inwiefern die Proteine TMEM109 und/oder hSnd2 am Translokon lokalisiert sind, bzw. eine Interaktion mit einem der Sec61-Proteine vorliegt. Um ein mögliches vollständiges Netzwerk rund um hSnd2, TMEM109 und das Translokon darzustellen, wurden alle bis zu diesem Zeitpunkt möglichen Kombinationen ausgetestet. So konnten nach dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Schema unterschiedlichste Verbindungen zwischen Proteinen nachgewiesen werden, welche in Abb. 31A als Heatmap zusammengefasst sind.

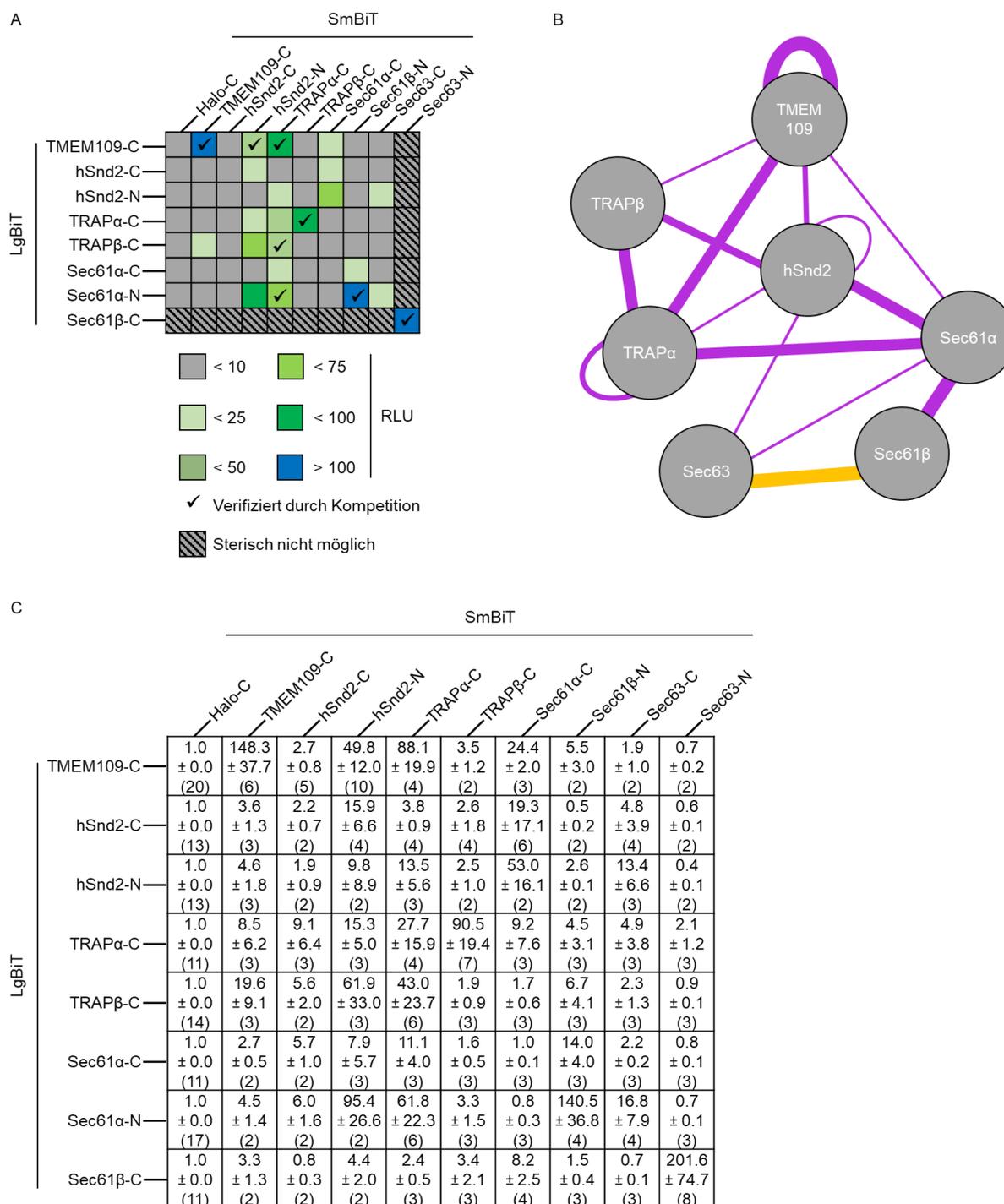


Abb. 31: Zusammenfassung der NanoBit-Studien und Darstellung des Interaktionsnetzwerkes rund um die Proteine hSnd2 und TMEM109. Für alle Ergebnisse wurden die Zellen zu Beginn in einer weißen 96 well plate ausgesät und am Folgetag mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden wurde den Zellen das Luciferase-Substrat zugegeben und die generierte Lichtmenge quantifiziert. **A:** Durch die Überprüfung diverser Kombinationen von Proteinen ergibt sich eine Vielzahl von Interaktionen von Proteinen, die zum Gesamtkomplex des Translokons gezählt werden. Diese konnten sowohl auf luminaler als auch auf zytosolischer Seite gezeigt werden. Farblich codiert in der Heatmap wurden die „Stärken“ der Interaktion, wiedergegeben durch deren relative Lumineszenz verglichen zu der Kombination aus LgBiT-Konstrukt und dem SmBiT-Halo-C Protein. Ein im Quadrat vermerkter ✓ repräsentiert Ergebnisse, die durch Komplementationen mit unmarkierten Proteinen bestätigt wurden (Abb. 26 bis Abb. 29). Sterisch nicht mögliche Kombinationen sind durch die Schraffur des entsprechenden Quadranten markiert. **B:** Die Resultate der Heatmap sind als Interaktionsschema wiedergegeben. Die Stärken der Linien spiegeln hier die gemessenen RLU

wider. Violette Linien entsprechen einem Interaktionsnachweis durch die Kombination der Luciferaseuntereinheiten auf zytosolischer Seite der ER Membran, während die gelbe Linie einen Interaktionsnachweis zweier Proteine durch die funktionelle Reassemblierung der Luciferase im ER-Lumen wiedergibt. **C:** Statistische Auswertung der Ergebnisse, auf denen die Grafiken A und B basiert. Dargestellt sind die RLU, die normiert sind auf den 4 Minuten Wert einer jeden Messung und der entsprechenden Kontrolle durch die Halo-C_s Komplementation (linke Spalte). Angegeben sind zusätzlich der SEM und die Anzahl der Messungen.

Die Expression der Plasmide erfolgte für 24 Stunden in weißen *96 well plates*, in denen die Proben ebenfalls vermessen wurden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, klares Opti-MEM™ ohne Phenolrot auf die Zellen gegeben und das Substrat appliziert. Die Auswertung erfolgte vier Minuten nach Messbeginn. Wie in der Heatmap in Abb. 31A dargestellt konnten mehrere Kombinationen identifiziert werden, bei denen die gemessenen Signale eine räumliche Interaktion bestätigen. Neben den bereits in 6.1.6 beschriebenen Interaktionen konnten zusätzlich eine Nähe zwischen TMEM109 und den Komponenten des TRAP-Komplexes und Sec61α (C-Terminus) selbst nachgewiesen werden. Dies konnte ebenfalls für hSnd2 gezeigt werden, wobei hier eine stärkere Interaktion mit dem N-Terminus von Sec61α zu bestehen scheint. TMEM109 sowie hSnd2 zeigen Interaktionen mit TRAPα und TRAPβ, welche in Abb. 32 als spezifisch verifiziert wurde.

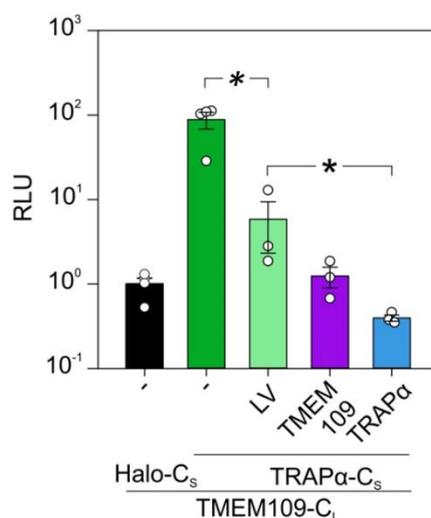


Abb. 32: Verifizierung der Interaktion zwischen TMEM109 und TRAPα. Die Zellen wurden zu Beginn in einer weißen *96 well plate* ausgesät und am Folgetag mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 Stunden wurde den Zellen das Luciferase-Substrat zugegeben und die generierte Lichtmenge quantifiziert. Zur Spezifizierung der Interaktion wurden die jeweiligen Proteine ohne Reporterkonstrukt durch Plasmidtransfektion synthetisiert. Dadurch konnte eine entsprechende Signalreduktion erreicht werden. Der Vergleich zwischen funktioneller Kombination und Kompetition mit dem Leervektor erfolgte mittels t-Test. Weiter statistische Vergleiche zwischen Leervektor und Proteinexpression erfolgten mittels *One-Way ANOVA*.

Im Verlauf der Studie wurden verschiedene, aus der Literatur bekannte Interaktionen nachgewiesen, wodurch das System als funktionell verifiziert werden konnte. Unter anderem ist hier besonders auf die Interaktion zwischen Sec63-N_s und Sec61β-C_L zu nennen. Diese Interaktion ist für die Reporterkonstrukte von Sec63 und Sec61β die einzige nachgewiesene. Dies ist jedoch eine zu erwartende Beobachtung, da beide *tags* in das Lumen des ERs

hineinragen und so mit allen anderen *tags*, die im Zytosol lokalisiert sind durch die zwischenliegende Membran nicht interagieren könnten. Diese Verbindung ist daher im dargestellten Interaktionsnetzwerk (Abb. 31B) als einzige in gelb abgebildet. Das die Topologie der markierten Proteine durch das Hinzufügen der Reporterstrukturen nicht beeinflusst wird, kann aus den schraffierten Flächen in Abb. 31A gefolgert werden. Diese stellen sterisch nicht kompatible Kombinationen dar, die den Schwellenwert von 10 RLU nicht überschreiten (Abb. 31C), was ein weiteres Indiz für die Funktionalität des experimentellen Aufbaus ist.

hSnd2 zeigt in höherem Maße Interaktionspotential mit dem zentralen Protein des Translokons, Sec61 α , in verschiedenen Kombinationen. Neben diesen Kombinationen zeigt Sec61 α auch die aus der Literatur zu erwartenden Interaktionen mit Teilen des TRAP-Komplexes, aber auch mit Sec63. Beide Proteine stellen Komponenten des Großverbundes des Translokons dar. Gleichzeitig ist die sehr starke Interaktion zwischen Sec61 α und Sec61 β voraussehbar gewesen, denn diese beiden Proteine sind Teil des heterotrimeren Sec61 Komplexes. Demzufolge ist die Interaktion zwischen den TRAP-Untereinheiten und Sec61 β auch als Bestätigung der Interaktion zwischen Sec61 α und den TRAP-Untereinheiten zu interpretieren. Auffällig für die Interaktion der beiden Sec61-Varianten ist, dass Sec61 β deutlich stärker mit dem N-Terminus als dem C-Terminus des Sec61 α interagiert. Dies könnte auch zu Teilen mit der Menge an synthetisiertem Sec61 α -C_L Fusionsprotein zu begründen sein, da auch Messungen zur synthetischen Komplementation der LgBiT Konstrukte mit Sec61 α -C_L weniger effizient ausfielen als mit Sec61 α -N_L (Abb. 35).

Abschließend kann aus den NanoBiT-Experimenten ein Interaktionsnetzwerk skizziert werden, welches nicht nur bereits bekannte Interaktionen (TRAP \leftrightarrow Sec61 α , Sec61 α \leftrightarrow Sec61 β , Sec61 β \leftrightarrow Sec63, Sec61 α \leftrightarrow Sec63, TMEM109 \leftrightarrow TMEM109 (Lang et al. 2017; Meyer et al. 2000a; Pfeffer et al. 2017; Venturi et al. 2011)) sondern darüber hinaus auch neue Interaktionen erstmalig im lebenden, physiologischen Kontext aufzeigt. Hierzu gehören sowohl die Interaktionen zwischen TMEM109 und hSnd2, für zweiteres ebenfalls ein Homomultimer, sowie die Interaktion beider Proteine mit Teilen des Translokons. Dargestellt ist das insgesamt etablierte Netzwerk der getesteten Proteine in Abb. 31.

6.1.9. Nachweis der NanoBiT-Konstrukte

Dadurch, dass die plasmidgestützte Expression von Proteinen mit der Gefahr einer ungenügenden oder überschießenden Proteinsynthese verbunden ist, musste diese Expression für die NanoBiT Konstrukte kontrolliert werden. Während eine Überexpression beispielsweise zu falsch-positiven Signalen führen könnte, würde eine unzureichende Expression zu einem gegebenenfalls falsch negativen Ergebnis führen. Da für jedes der getesteten Fusionsproteine bzw. Reporterstrukturen immer mindestens eine funktionelle Interaktion mit Hilfe des Assays gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass diese

erfolgreich exprimiert wurden. Welche Proteinmenge daraus resultierte, lässt sich jedoch nicht abschätzen. Aufgrund dessen, dass Expressionsstärke der Proteine ebenfalls die Stärke der Lumineszenz beeinflussen kann, ist die Kontrolle ebenjener Expression ein entscheidender Schritt.

Zwei Methoden wurden mit zu diesem Zweck angewendet. Zum einen sollten die Konstrukte mittels Western Blot Analysen in den Zelllysaten nachgewiesen werden, zum anderen auch in lebenden Zellen durch Komplementation mit Hilfe eines Peptides. Der immunologische Nachweis erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher Antikörper. Zum einen wurden Antikörper gegen die endogenen Proteine selbst verwendet, da durch die angefügten Reporterstrukturen der Luciferase die eigentlichen Epitope der Proteine, durch die diese von den Antikörpern erkannt werden, nicht verändert sein sollten. Des Weiteren konnten auch spezifische Antikörper gegen den SmBiT und den LgBiT eingesetzt werden.

Die Generierung der zu analysierenden Proben erfolgte in 6 cm Zellkulturschalen. Hierzu wurden $6 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und nach 24 Stunden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (Kap. 5.1.6; 5.5.3). Die Expression der Proteine erfolgte für weitere 24 Stunden, so wie es auch für die Quantifizierung der Lumineszenz der Fall gewesen wäre. Die Zellen wurden geerntet und als SPZ (Kap. 5.5.5) für die SDS-PAGE (Kap. 5.2.2) vorbereitet. Die Übertragung auf eine aktivierte PVDF Membran erfolgte per Wet-Blot, die Detektion mit den genannten Antikörpern.

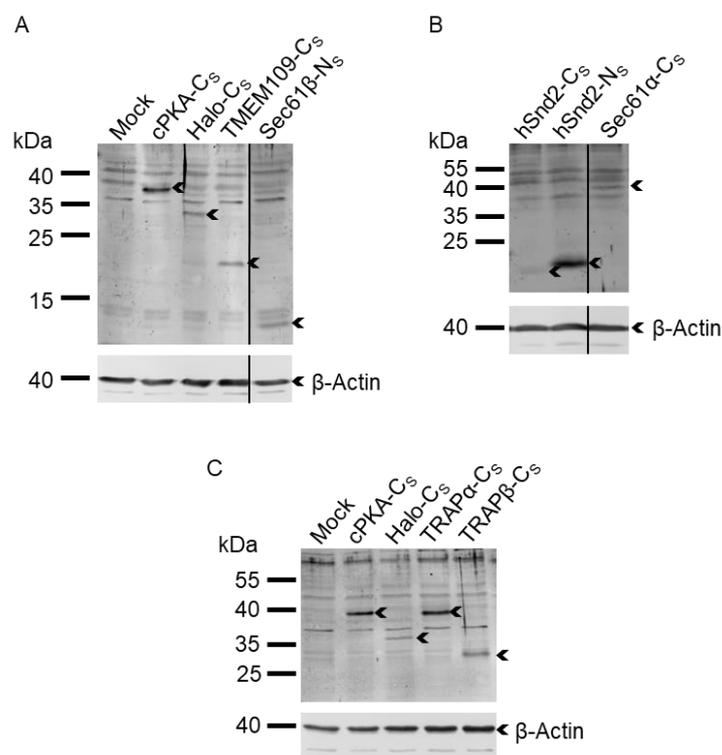


Abb. 33: Immunologischer Nachweis SmBiT markierter Proteine mit Hilfe des generierten SmBiT Antikörpers. Zur Probengenerierung wurden $6 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Zeit wurde ein Medienwechsel vorgenommen und die Zellen mit den unterschiedlichen Plasmiden transfiziert. Es erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet, gezählt und zu SPZs weiterverarbeitet. Diese wurden in Laemmli aufgenommen und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen, auf der sie immunologisch detektiert werden konnten. Zur Detektion wurde der α -SmBiT Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurden nur mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen verwendet (Mock) und als funktionale Kontrolle des Antikörpers cPKA-C_s und Halo-C_s. **A:** Es wurde TMEM109-C_s und Sec61β-N_s detektiert. **B:** Es besteht ein Unterschied zwischen Expressionsstärke und Laufhöhe der beiden hSnd2-Reporterkonstrukte, die auf dem unterschiedlichen Plasmidgerüst beruhen könnten. Ebenfalls konnte Sec61α-C_s detektiert werden. **C:** Beide C-terminal markierten TRAP Konstrukte konnten mit Hilfe des Antikörpers nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde in allen Fällen β-Actin verwendet. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils $3 \cdot 10^5$ Zelläquivalente. Gezeigt werden repräsentative Blots von mindestens zwei unabhängigen biologischen Experimenten.

Mit Hilfe des SmBiT Antikörpers konnten wie in der vorhergegangenen Abb. 33 gezeigt alle verwendeten SmBiT-Konstrukte immunologisch in Zelllysaten detektiert werden. Es bestehen Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den einzelnen Proteinen, am stärksten zwischen hSnd2-N_s und hSnd2-C_s. Der Größenunterschied der Konstrukte lässt sich durch die unterschiedliche Positionierung des cDNA in der *multiple cloning site* und der daraus resultierenden veränderten Gesamtzahl der Aminosäuren zurückführen. Die Fusionsproteine des Sec63-C_s und Sec63-N_s konnten nicht detektiert werden, da das unmarkierte Proteine bereits über 100 kDa aufweist und der Massenshift nicht groß genug ist, um eine Trennung zwischen dem endogenem und dem Fusionsprotein zu erzeugen.

Zur Detektion weiterer Konstrukte sollten Antikörper gegen das endogene „Trägerprotein“ verwendet werden. Wie in Abb. 34 zu erkennen ist, war es nicht möglich jedes Konstrukt mit

den entsprechenden Antikörpern nachzuweisen. Abbildungsteil A zeigt die Verwendung des α -hSnd2-Antikörpers. Hier wurde zur Kontrolle zusätzlich eine FLAG-markierte Version des Proteins getestet, um die Sichtbarkeit einer Massenveränderung sicherzustellen. Durch den α -hSnd2 spezifischen Antikörper war es jedoch nur möglich die N-terminal erweiterten Konstrukte zu detektieren, welche eine vergleichbare Abundanz zum endogenen hSnd2 aufwiesen. Am C-Terminus markierte Proteine konnten nicht detektiert werden. Ähnliches gilt für die TMEM109 und TRAP β -Konstrukte. Während mit dem proteinspezifischen Antikörper nur die mit dem LgBiT erweiterte Variante detektiert werden konnte (Abb. 34B TMEM109; Abb. 34C TRAP β), konnte die SmBiT markierte Variante des Proteins mit Hilfe des α -SmBiT-Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 33A und C). Da in der Vergangenheit in der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass eine C-terminale Erweiterung von TRAP α eine Detektion mit dem α -TRAP α -Antikörper verhindert, wurde dieses Protein nur mit dem α -SmBiT-Antikörper detektiert, was erfolgreich war (Abb. 33C).

Die Nutzung des monoklonalen, kommerziellen Antikörpers gegen LgBiT stellte sich als erfolglos für die meisten Konstrukte heraus. In Abb. 34D ist das Ergebnis einer immunologischen Detektion mit dem α -LgBiT-Antikörper dargestellt. Von den sechs getesteten Konstrukten, darunter die bereitgestellten Positivkontrolle, konnten nur Banden in den Spuren für TMEM109 und TRAP β identifiziert werden. Diese stimmten im Molekulargewicht mit den Banden überein, die identifiziert werden konnten, wenn die Konstrukte mit den proteinspezifischen Antikörpern detektiert wurden (Abb. 34B und C).

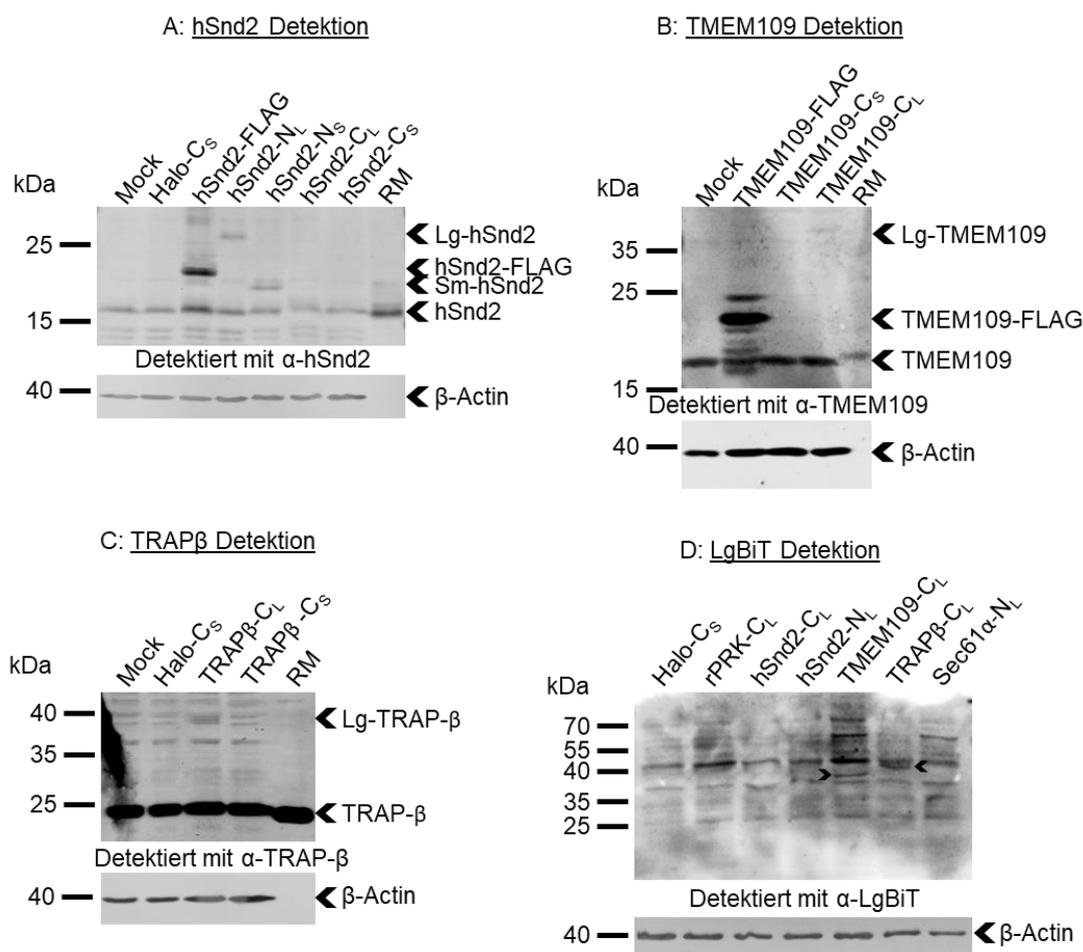


Abb. 34: Immunologischer Nachweis von Proteinen, die mit den SmBiT- oder LgBiT-Reporterstrukturen versehen wurden. Zur Probengenerierung wurden $6 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Zeit wurde ein Medienwechsel vorgenommen und die Zellen mit den unterschiedlichen Plasmiden transfiziert. Es erfolgte eine weitere 24-stündige Inkubation. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet, gezählt und zu SPZs weiterverarbeitet. Diese wurden in Laemmli aufgenommen und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen, auf der sie immunologisch detektiert werden konnten. Die Detektion erfolgte unter Verwendung folgender Antikörper: **A:** α -hSnd2, **B:** α -TMEM109, **C:** α -TRAP β ; **D:** α -LgBiT. In Abbildungsteil D wurde das Halo-Cs Konstrukt als Negativkontrolle genutzt. Als Ladekontrolle wurde in allen Fällen β -Actin verwendet. Aufgetragen wurden pro Spur jeweils $3 \cdot 10^5$ Zelläquivalente. Gezeigt werden repräsentative Blots von mindestens zwei unabhängigen biologischen Experimenten.

Beim Vergleich der Mengenverhältnisse der einzelnen Proteine wird der Effekt durch die Verwendung des HSV-TK-Promotors, welcher vor den Konstrukten liegt, deutlich. Durch den Einsatz der proteinspezifischen Antikörper kann die Proteinmenge der künstlichen Konstrukte mit den unmarkierten Varianten der Proteine direkt verglichen werden. Hier zeigte sich, dass keine Überexpression der eingebrachten Konstrukte vorlag. Im Vergleich sind die exprimierten Mengen der TMEM109- und TRAP β -Konstrukte deutlich geringer als das endogene Protein. Die bewusst geringere Expressionsstärke der HSV-TK-Promotoren des NanoBit-Systems wird ebenfalls deutlich, wenn ein Vergleich mit den FLAG-markierten Proteinen erfolgte. Diese sind zusammen mit einem CMV-Promotor codiert, welcher häufig in der Zellkultur verwendet wird, um eine starke Expression von eingebrachten Plasmiden zu erreichen. Dass diese eine

deutlich stärkere Expression zur Folge haben, ist bei der Betrachtung der hSnd2 und TMEM109 Blots zu erkennen (Abb. 34A und B).

Da der Nachweis mittels Western Blot der mit dem LgBiT versehenen Konstrukte unzureichend war, erfolgte diese innerhalb des NanoBit Systems durch eine Komplementation. Hier wurde der Fakt genutzt, dass das Peptid, welches für die Generierung des α -SmBiT-Antikörpers im Hasen genutzt wurde, identisch ist zu der Aminosäuresequenz, die an die SmBiT markierten Proteine angefügt wurde. Dadurch war es möglich, exprimierte LgBiT-Proteine in den Zellen durch ein nicht proteingebundenes, nicht ribosomal synthetisiertes Peptid zu komplementieren und ein Lichtsignal zu generieren. Die Etablierung dieses Vorgehens, welches im weiteren als synthetische Komplementation bezeichnet wird, ist in Kapitel 5.2.9 beschrieben.

Die synthetische Komplementation wurde genutzt, um die Anwesenheit und die Expressionsstärke der einzelnen LgBiT-Plasmide zu bestimmen. Die Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte kann relativ zueinander verglichen werden, da die zugegebene Menge des Peptides in allen Fällen identische war. Durch die Verwendung verschieden affiner Peptide (SmBit, blau, $K_D = 190 \mu\text{M}$, HaBit, rot, $K_D = 700 \text{pM}$) konnten die LgBiT-Konstrukte verschieden effizient nachgewiesen werden (Abb. 35A). Verglichen wurden die Messwerte zu einem Peptid, welches der zufälligen SmBiT-Sequenz entsprach (*scrambled*, hellblau). Die höhere Affinität zeigte sich für alle Konstrukte durch eine 20 bis 50-fach stärkere Lumineszenz nach der Zugabe des HaBiT-Peptides im Vergleich zum SmBiT-Peptid. Auffällig ist, dass die Komplementation für das Sec61 α -CL Reporterkonstrukt sehr schwach war, im Fall des SmBiT-Peptides nur unwesentlich über der Kontrolle. Das Sec61 β -C_L Konstrukt mit hoher Effektivität nachgewiesen werden, obwohl dieses Konstrukt auf der luminalen Seite der Membran lokalisiert sein sollte.

In Abb. 35B ist die Auswertung dieses Experimentes mit allen verwendeten LgBiT-Konstrukten nach der Komplementation durch das SmBiT-Peptid dargestellt. Die Signalstärke nach der Komplementation durch das SmBiT Peptid wurde verglichen und anhand der Kontrolle, der Lichtstärke nach Zugabe des *scrambled* Peptides normiert. Das SmBiT-Peptid wurde ausgiebiger genutzt, da dieses den realen Komplementationspartner des LgBiT in den Experimenten darstellt. Mit Hilfe dieses Experimentes konnte ebenfalls die Expression der TMEM109-C_L, hSnd2-N_L und hSnd2-N_L Konstrukte nachgewiesen werden, die im vergleichbaren Rahmen zu den anderen Konstrukten erfolgte.

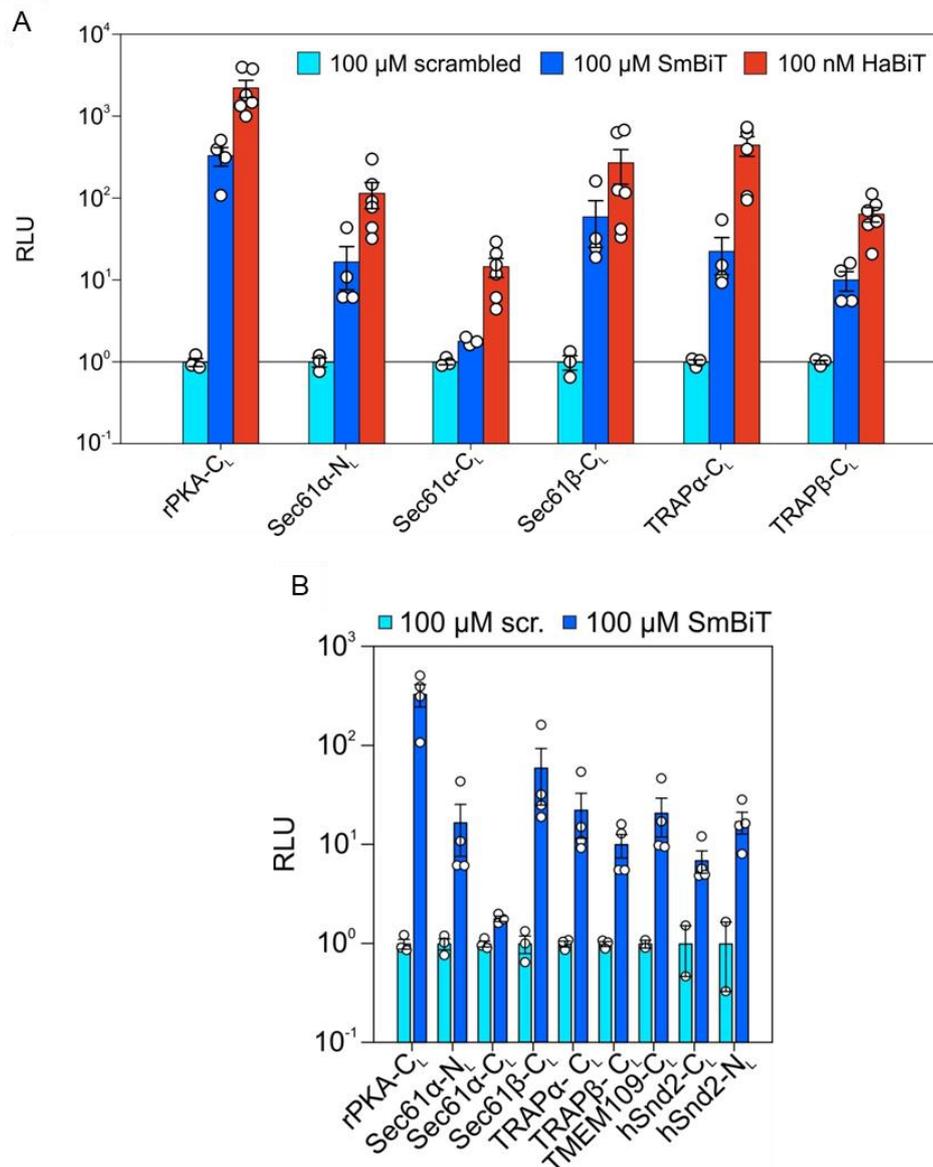


Abb. 35: Nachweis der NanoBit-Konstrukte durch synthetische Komplementation. Die zu detektierenden Proteine wurden plasmidgestützt in HeLa-Zellen exprimiert und deren Expression synthetischer Komplementation überprüft. Hierfür wurden die LgBiT-Konstrukte in der bekannten Weise in Zellen exprimiert und nach einer Semi-permeabilisierung durch Digitonin die komplementierenden Peptide zugegeben, um die Funktionalität der Luciferase zu ermöglichen. **A:** Nachweis eines Teiles der Konstrukte durch den HaBiT (rot) im Vergleich zum SmBiT (blau). Durch die Zugabe von 100 nM des HaBiT-Peptides erfolgte in allen Fällen eine effektivere Komplementation im Vergleich zum SmBiT (100 μ M). **B:** Bestimmung der relativen Expressionsverhältnisse der einzelnen Proteine. Die Signalstärke nach der Gabe des SmBiT-Peptides (blau, 100 μ M) wurde relativ zu der Signalstärke nach der Zugabe des *scrambled* (scr, hellblau, 100 μ M) bestimmt. Die Werte der Sec61- und TRAP-Konstrukte sind identisch zu den in Abbildungsteil A dargestellten Werten, und für eine bessere Vergleichbarkeit hier erneut dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Konstrukte entweder durch Antikörper oder durch die Komplementation mit dem SmBiT-Peptid in der lebenden Zelle nachgewiesen werden konnten. Auch konnte das Verhältnis der Affinität verschiedener Peptide (SmBiT *versus* HaBiT) in Zellen bestätigt werden. Die Expressionsstärke der LgBiT-Konstrukte ist mit wenigen Ausnahmen miteinander vergleichbar und moderat, was durch Western Blots gezeigt werden konnte. Dies ist auch erwartbar durch den verwendeten schwachen Promotor.

6.2. Beschreibung biochemischer Fehlfunktionen der ADTKD-assoziierten *SEC61A1*-Mutationen

Um die Funktion eines Proteins zu charakterisieren, ist es ein Ansatz, dass man die Auswirkung einer Mutation oder des Verlusts dieses Proteins ermittelt. Diese Herangehensweise wurde im Fall der Sec61 α -assoziierten Nierenerkrankung ADTKD genutzt. Durch die Charakterisierung der biochemischen Fehlfunktionen der Zelle, die durch die Mutation V67G und T185A im Sec61 α -Protein ausgelöst wurden, war es das Ziel ebendiese Krankheit in Ihrer Grundstruktur aufzuklären und im Zuge dessen auch zu verstehen. Dafür wurden sowohl Wachstumsexperimente, Proteinanalysen, als auch Sec61 spezifische Transport und *live-cell calcium imaging* Experimente durchgeführt.

6.2.1. Genetische und zellphysiologische Charakterisierung der Zelllinien

Aufgrund dessen, dass die in dieser Arbeit verwendeten HEK-Zellen genetisch modifiziert wurden, wurde zu Beginn der Arbeiten sichergestellt, dass grundlegende Parameter zwischen den Zellen übereinstimmen, sodass spätere Analysen auf identischen Annahmen basieren. Hierfür wurden die genetische Identität der Zelllinie bestätigt, das Zellwachstum und die Zellgröße, aber auch der minimale und maximale zytosolische Calciumgehalt der Zellen bestimmt.

Um sicherzustellen, dass die Zellen die beschriebene *SEC61A1-V67G und -T185A* Gensequenzen tragen, wurde die genomische DNA der einzelnen Zelllinien isoliert. Nach einer Kontrolle der erfolgreichen Aufreinigung per Agarosegel mit anschließender Färbung (Abb. 36B) wurde die genomische DNA als Ausgangsmaterial genutzt, um mittels *SEC61A1-FLAG* spezifischen Primern die artifiziell eingebrachten Gensequenzen zu amplifizieren. Die entsprechende Fragmentlänge wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestätigt (Abb. 36C) und das amplifizierte Fragment sequenziert (LGC Genomics, Berlin). Die abschließende in Abb. 36D dargestellte Analyse zeigte, dass die entsprechenden Mutationen V67G und T185A im transgenen Locus vorhanden waren.

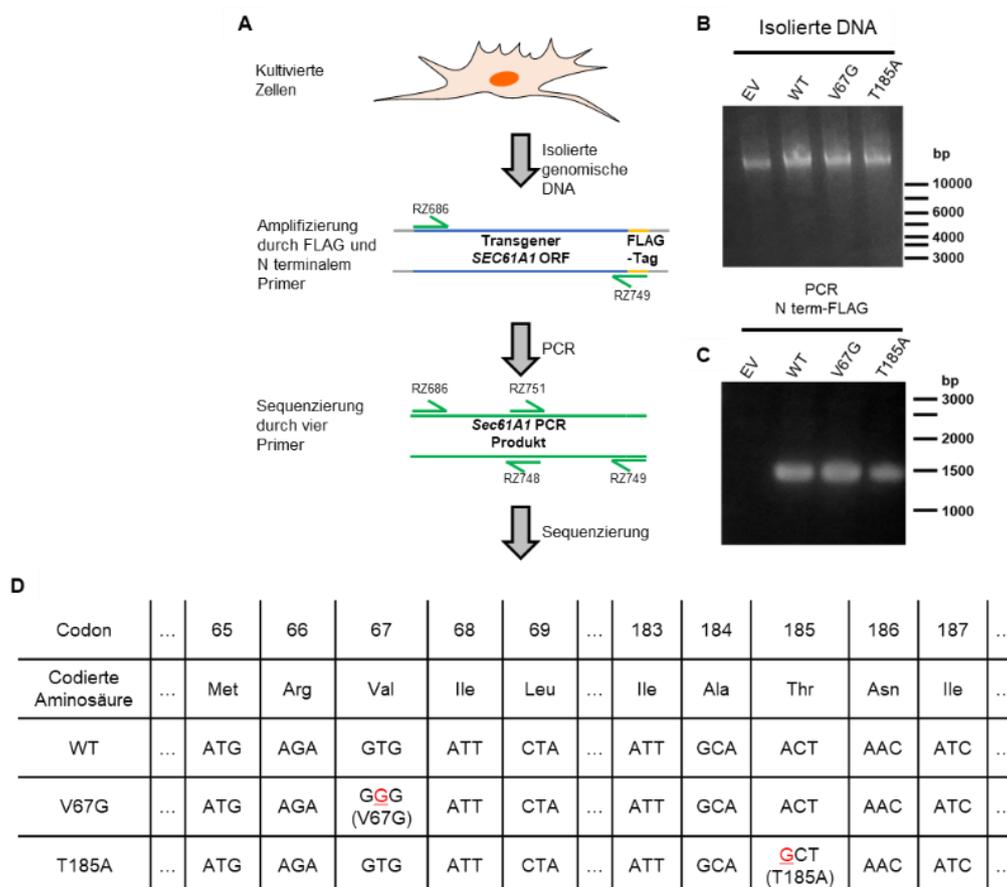


Abb. 36: Genetische Analyse der stabil transfizierten HEK-Zellen. **A:** Ablauf des Versuchsaufbaus. Aus den kultivierten Zellen wurde mithilfe des DNeasy® Blood & Tissue Kit die genomische DNA aufgereinigt und nur die transgene *SEC61A1*-Gensequenz mit Hilfe eines spezifischen Primerpaares amplifiziert. Das entsprechende PCR-Produkt wurde durch vier Primer sequenziert, um das vollständige Gen abzudecken. **B:** Die aufgereinigte genomische DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels GelRed gefärbt. **C:** Die Amplifizierung der inserierten *SEC61A1* DNA erfolgte wie erwartet nur in den Proben WT, V67G, T185A, was ebenfalls in einem mit GelRed angefärbten Agarosegel geprüft wurde. **D:** In der anschließenden Sequenzanalyse wurden die entsprechenden Mutationen (rot markiert) identifiziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics. Die jeweiligen Zelllinien sind: EV: Leervektor, WT: *SEC61A1*-WT-FLAG, V67G: *SEC61A1*-V67G, T185A: *SEC61A1*-T185A.

Ebenso wurde eine Bestimmung der Zellproliferation in einer Kinetik durchgeführt, bei der über einen Beobachtungszeitraum von 72 Stunden im Abstand von 24 Stunden mittels Cytometer die Lebendzellzahl gemessen wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Zellproliferation der T185A Zellen langsamer verlief (Abb. 37A), während die Zelllinie V67G nach 48 Stunden eine leicht höhere Zellzahl zeigte im Vergleich zum Wildtyp. Der ermittelte Durchmesser der vitalen Zellen, dargestellt in Abb. 37B, ist zwischen den Zelllinien nicht unterschiedlich.

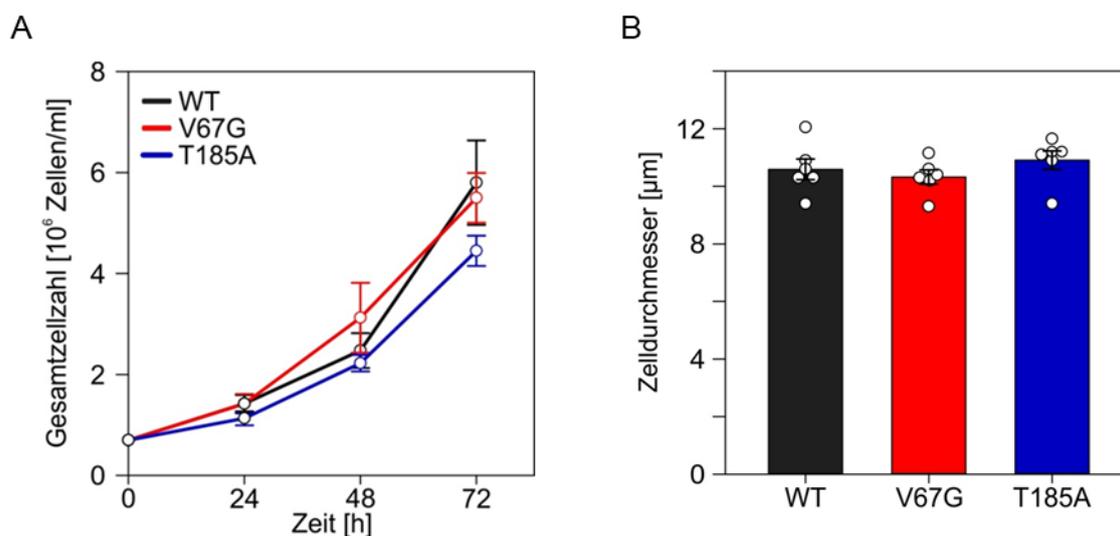


Abb. 37: Ermittlung phänotypischer Parameter per Countess® Automated Cell Counter. **A:** Zur Ermittlung der Geschwindigkeit des Zellwachstums wurden $0,7 \cdot 10^6$ Zellen der jeweiligen Zelllinie in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und die Lebendzellzahl zu diesem Zeitpunkt per Cytometer bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM innerhalb von fünf einzelnen Experimenten. **B:** Zur Bestimmung des Zelldurchmessers wurden Zellen verschiedener Passagen genutzt. Hierfür wurden die Zellen geerntet, per Cytometer vermessen, um so Durchmesser lebender Zellen zu bestimmen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SEM innerhalb von sechs einzelnen Experimenten.

Dies wurde in späteren Experimenten beachtet. Wenn eine möglichst identische Konfluenz der Zellkultur nach 48 h erreicht werden sollte, mussten im Vergleich weniger V67G Zellen als WT oder T185A Zellen ausgesät werden.

Für *live-cell calcium imaging*-Experimente wurde der minimale und maximale Calciumgehalt des Zytosols der drei Zelllinien mehrfach bestimmt. Dieser wurde mit Hilfe des ratiometrischen Farbstoffs Fura2-AM ermittelt. Die Zellen wurden durch eine intensive Ionomycin- und EGTA-Behandlung von Calcium befreit, um anschließend mit einem massiven Überschuss an Calcium das Zytosol wieder zu füllen. Daraus ergaben sich die minimale (R_{\min}) und maximale (R_{\max}) Calciumkapazität des Zytosols der einzelnen Zelllinien. Hierbei zeigten sich, wie in Abb. 38 dargestellt, keine Unterschiede für die ermittelten R_{\min} und R_{\max} Werte zwischen den Zelllinien. Daher ist davon auszugehen, dass Unterschiede in den nachfolgend gezeigten Ratios, gebildet aus der bei 340 nm und 380 nm bestimmten Emission, beim Vergleich der Zelllinien gleichbedeutend sind mit realen Änderungen der Calciumkonzentration. Es war daher nicht zwingend erforderlich eine Umrechnung der gemessenen Ratios in Calciumkonzentrationen durchzuführen, da die direkte Vergleichbarkeit zwischen den drei Zelllinien WT, V67G und T185A auch durch die 340/380 Ratio gegeben war.

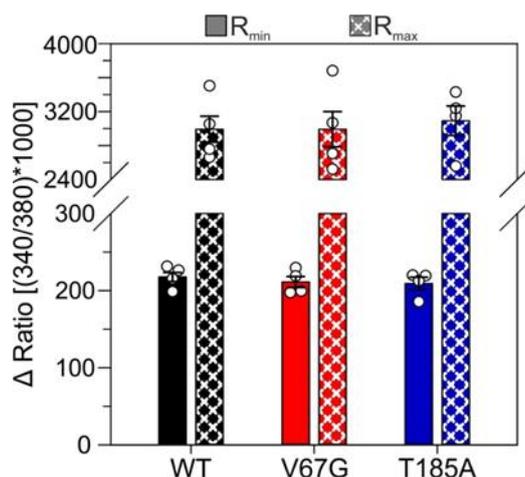


Abb. 38: Bestimmung der minimalen und maximalen Calciumkapazität des Zytosols. Zur Vorbereitung der Calciummessung wurden $6 \cdot 10^5$ (WT; V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ (T185A) HEK-Zellen ausgesät und für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden für 25 min mit FURA-2AM beladen. Die Calciumverhältnisse im Zytosol wurden vermessen. Hierbei wurde durch eine Kombination aus Ionomycin und EGTA lösliches Calcium vollständig aus der Zelle entfernt und ein Minimalwert ermittelt. Der angegebene Maximalwert ergab sich aus einer daran anschließenden Flutung des Zytosols mit Calcium durch dessen externe Zugabe.

Schlussfolgernd wird in diesen Experimenten deutlich, dass die Zellen die korrekten Gensequenzen tragen, eine leichte Anpassung der Zellzahl bei Messungen nach 48 h sinnvoll ist und die mittels *live-cell calcium imaging* bestimmten Ratios nicht durch die minimale oder maximale Calciumkapazität des Zytosols beeinflusst sind. Dies erlaubt eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den folgenden Analysen.

6.2.2. Veränderte Proteinabundanzen geben Hinweise auf Fehlregulation in der Calciumhomöostase

Neben der genetisch-morphologischen Beschreibung der verwendeten Zelllinien, wurde untersucht, ob durch die Anwesenheit des mutierten Sec61 α Abundanzänderungen anderer Proteine auffällig wurden. Dies ist hinsichtlich dessen interessant, da Sec61 α zum einen Teil eines trimeren Komplexes ist und viele Proteine als allosterische Faktoren mit diesem in Kontext des Translokons interagieren (Lang et al. 2017). Zum anderen erfüllt es vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle, sodass es Komponenten des Proteintransportes, der Calciumhomöostase und der ER-Stressregulation beeinflussen könnte, wodurch verschiedene Proteine in ihrer Abundanz beeinflusst sein könnten (Haßdenteufel et al. 2017; Lang et al. 2011; Lang et al. 2017; Linxweiler et al. 2017).

Hierfür wurden die Zellen, die nicht weiter spezifisch vorbehandelt waren, geerntet, gezählt (Kap. 5.5.2) und entweder als Zellysate (Kap. 5.5.6) oder als SPZ (Kap. 5.5.5) mittels immunologischer Detektion ausgewertet und statistisch analysiert (Abb. 39). Hierbei wurde zum einen das FLAG-markierte Sec61 α nachgewiesen, welches aufgrund des *tag* ein höheres Molekulargewicht aufwies als das endogene Sec61 α und so von diesem unterschieden werden konnte, wenn mit einem Antikörper gegen Sec61 α gearbeitet wurde. Bei der

Verwendung des α -FLAG Antikörpers wird das Fehlen der Banden in den hier zur Kontrolle verwendeten Leervektorzellen (*empty vector* = EV) deutlich. Diese Ergebnisse, die die Anwesenheit von Sec61 α -FLAG in den entsprechenden Zellen aufzeigten, bestätigten die im vorhergegangenen Kapitel nachgewiesenen genetischen Änderungen auf Proteomebene (Abb. 39A). Anhand der semiquantitativen Auswertung ließ sich feststellen, dass keine Unterschiede in der Proteinabundanz zwischen den eingebrachten Sec61-Varianten (V67G und T185A) bestand und auch keine Veränderung der endogenen Level von Sec61 α stattfand (Abb. 39F). Sec61 β , ein Teil des Sec61-Komplexes, zeigte eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikant gesteigerte Abundanz in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Proteine, die funktionell mit Sec61 α in Zusammenhang stehen, sind unter anderem Repräsentanten der verschiedenen Proteintransportsubstratwege. Als Beispiele für die einzelnen Transportwege wurden SR β , CAML, Asna1 und hSnd2 ausgewählt (Abb. 39B), die jeweils einen Teil der Proteintransportwege SRP, GET und SND darstellen (Abb. 4 und Abb. 5). Die Abundanz der genannten Repräsentanten zeigte keine signifikante Veränderung. Eine Steigerung des Proteingehaltes von BiP, GRP170 und PDI (Abb. 39C), was die Folge einer UPR-Aktivierung durch Proteinfaltungstress gewesen wäre, ist nicht detektiert worden. Dies spricht dafür, dass die Zellen keinem akuten oder anhaltendem Stress durch Fehlfaltungen von Proteinen ausgesetzt waren. Des Weiteren zeigen die Proteine Sec62, TRAP α , TRAP β und RPN1, die beispielhaft als Bestandteile des Translokons ausgewählt wurden, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien (Abb. 39D und F). Tendenziell konnte für diese Proteine, wie auch für Sec61 β , eine leicht gesteigerte Abundanz nachgewiesen werden.

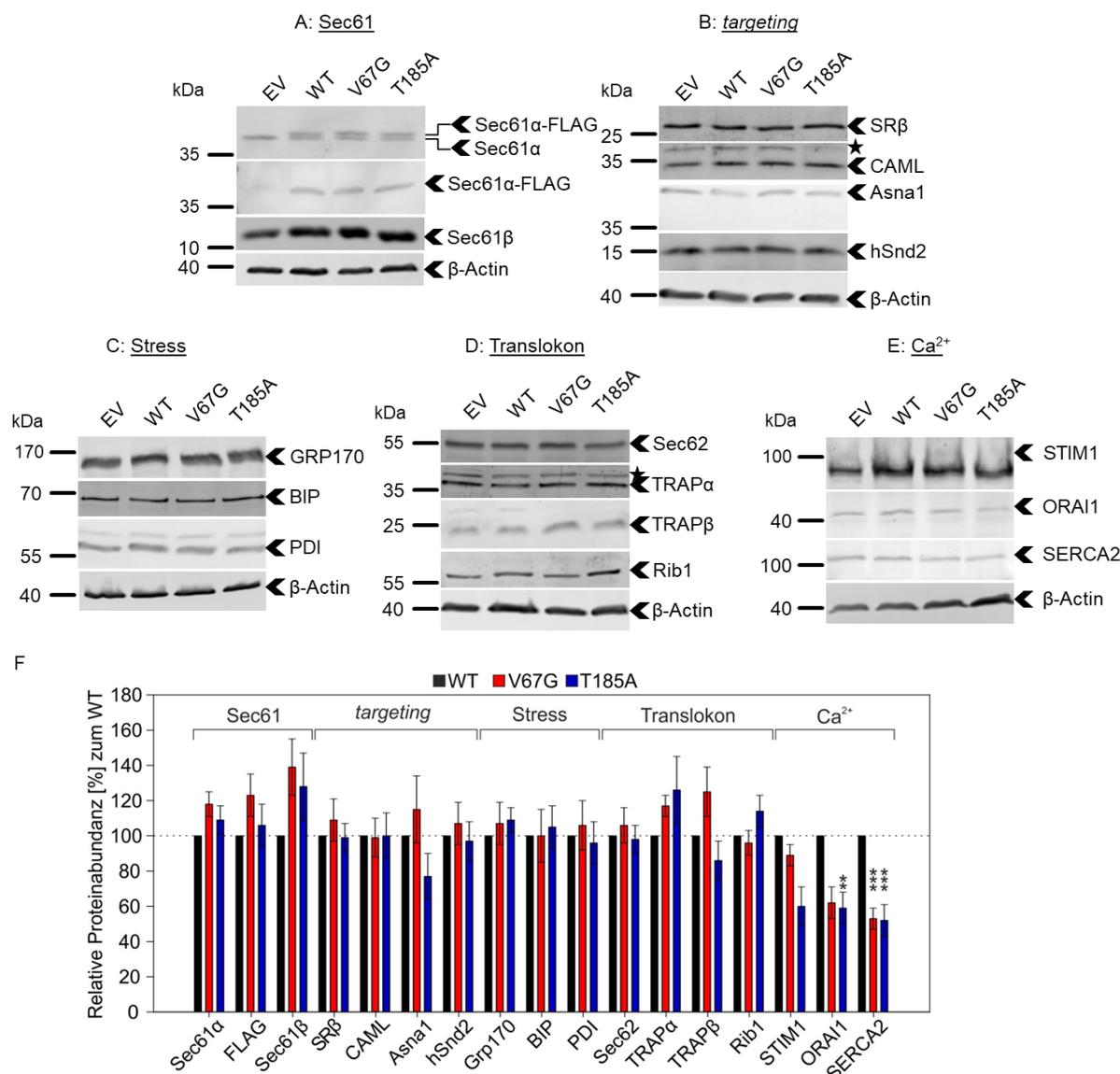


Abb. 39: Immunologische Detektion relevanter Proteine im Kontext der SEC61A1-Mutationen. Die Zellen wurden nicht gesondert vorbereitet. Nach dem Ernten und Zählen der Zellen wurden diese als Zellysate bzw. SPZ-Proben vorbereitet. Die Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt, es erfolgte eine Übertragung auf PVDF-Membranen per Western Blot. Auf diesen wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper gezielt nachgewiesen. Als Ladekontrolle fungierte β -Actin. Gezeigt werden repräsentative Blots **A:** Nachweis von Sec61 α -FLAG in den jeweiligen Zelllinien mittels α -FLAG- und α -Sec61 α -Antikörper. Ebenfalls wurde Sec61 β als Teil des Sec61-Komplexes nachgewiesen. **B:** Nachweis von Proteinen als Repräsentanten verschiedener Proteintargetingwege. **C:** Verschiedene Stressmarkerproteine zeigen keine erhöhte Abundanz. **D:** Proteine, die aus dem Kontext des Translokons bekannt sind, zeigen nur geringe Abweichungen zum Wildtyp. **E:** Proteine, die der Calciumregulation dienen zeigen die stärksten Abweichungen von der als Kontrolle verwendeten Wildtyp-Zelllinie. **F:** Semiquantitative Auswertung der immunologischen Detektionen aus A-E. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardfehler ($n > 4$). Statistische Analysen wurden mittels One-Way-ANOVA und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp.

Auf der Ebene der Calciumhomöostase, die ebenfalls funktionell mit Sec61 verknüpft ist, wurde eine andere Tendenz deutlich. Während die Menge von SERCA2 auf ca. die Hälfte reduziert war, ähnlich wie ORAI1, zeigte STIM1 nur im Falle der T185A Mutation eine deutliche Verringerung der Proteinabundanz (Abb. 39E und F). Während ORAI1 und STIM1 zentrale

Bestandteile des SOCE darstellen, also den Strom von Calcium aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol ermöglichen, agiert SERCA2 als Calcium-ATPase in der ER-Membran. Dadurch könnte eine Änderung in der Calciumhomöostase resultieren. Zur Feststellung, ob ebenfalls auch Änderungen auf Transkriptionsebene erfolgten, wurden mit der Unterstützung von Andrea Tirinci (UdS. Med. Biochemie, AG Lang) die mRNA-Level einzelner Zielproteine bestimmt. Hier zeigte sich, dass keine der betrachteten mRNA-Level für *SEC61B*, *ATP2A2*, *SRPRA*, und *SRPRB* aus denen die Synthese von Sec61 β , SERCA2, SR α , und SR β erfolgt, signifikant unterschiedlich zwischen WT und den Mutanten war.

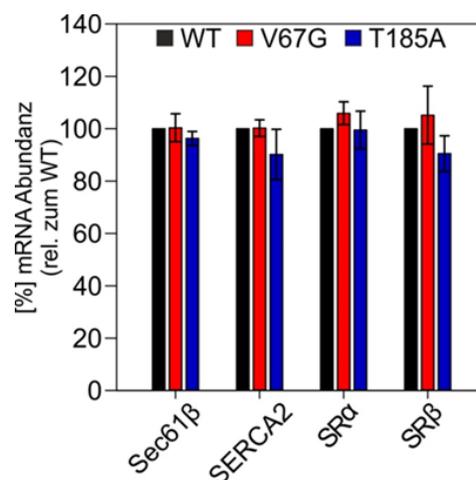


Abb. 40: Nachweis der mRNA Menge mittels qRT-PCR. Nachgewiesen wurden die mRNA-Mengen *SEC61B* (Sec61 β), *SRPRA* (SR α), *SRPRB* (SR β) und *ATP2A2* (SERCA2). Nach der Ernte der Zellen wurde aus diesen die mRNA aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann quantitative bestimmt durch die Verwendung von mRNA spezifischen Taqman Sonden. Dargestellt sind die relativen mRNA-Mengen der namensgebenden Proteine nach dem Abgleich mit der Referenz-mRNA zu β -Actin ($\Delta\Delta$ ct Methode). Die Auswertung repräsentiert Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten. Der Fehlerbalken stellt den Standardfehler des Mittelwertes von drei Experimenten mit jeweils Triplikaten dar. Unterstützt wurde die Datengenerierung durch Andrea Tirinci.

Als Folge aus den beschriebenen immunologischen Detektionen und der mRNA-Bestimmung kann festgestellt werden, dass nur relevante Änderungen in der Abundanz für Proteine ermittelt wurde, die in Verbindung mit der Calciumhomöostase stehen. Diese Änderung ist zumindest im Fall von SERCA2 nicht auf eine Änderung auf Ebene der mRNA zurückzuführen. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass sowohl in der Calciumbalance der Zelle als auch im Proteintransport über/in die ER-Membran, Fehlfunktionen bzw. Abweichungen zur Norm festzustellen sein könnten. Diese Änderungen im Proteintransport könnte nur spezifische Proteingruppen betreffen, da klassische Proteine der Transportwege nicht in ihrer Abundanz verändert sind (Abb. 39). Ebenso scheint die Assemblierung des Translokons und des Sec61-Komplexes nicht verändert zu sein.

6.2.3. Analyse der Calciumhomöostase der ADTKD Zellen

Basierend auf den Ergebnissen der immunologischen Ergebnisse die in Kapitel 6.2.2 vorgestellt wurden, lies sich vermuten, dass gewisse Anomalien in der Calciumhomöostase

der HEK-Zellen vorzufinden sind, die ein mutiertes Sec61 α beinhalten. Dies ist darin begründet, dass die Proteine STIM1 und ORAI1, welches die beiden Hauptkomponenten des SOCE darstellen, verringert sind. Dadurch könnte es zu einer verminderten Aufnahme von Calcium aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol kommen. Dieser Prozess wird ausgelöst, wenn das luminale Calcium depletiert wurde (Prakriya & Lewis 2015). Diese Depletion ist unter anderem vom Sec61 vermittelten Calcium *leak* und dessen Gegenspieler, dem SERCA-Protein, welches die Calciumionen aus dem Zytosol in das ER zurückführt abhängig, die in gesunden Zellen Teile eines sich ausgleichenden Kreislaufs darstellen (Lang et al. 2011; Stammers et al. 2015). Da zum einen die Menge an SERCA2 in den hier betrachteten Zellen verringert ist, aber auch Mutationen des Sec61 α in früheren Studien zu Änderungen des *leak* und der Gesamtcalciumkapazität des ERs geführt haben, wird in den folgenden Experimenten auf diese Aspekte Bezug genommen (Schäuble et al. 2012; Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020).

Zur Untersuchung der verschiedenen Aspekte wurde auf ein identisches Grundsetup zurückgegriffen. Hierbei handelte es sich um zytosolische Calciummessungen, die mit dem ratiometrischen Farbstoff FURA2-AM erfolgten und so Änderungen in der Calciummenge im Zytosol wiedergeben, die live verfolgt und manipuliert werden konnten (Kap. 5.6). Zu Beginn wurden Parameter kontrolliert, die unmittelbar mit Sec61 α in Verbindung stehen, wie beispielsweise der Sec61-vermittelte Calciumleckstrom. Wie in Abb. 41A und B zu erkennen ist, wurde durch die Zugabe von Thapsigargin die Entleerung des ERs durch die verschiedenen Leckkanäle sichtbar gemacht. Hierbei zeigten alle Proben einen identischen basalen Ausgangswert und eine zeitlich identische Reaktion auf die Behandlung. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Ausprägung des *leak*. Im Falle der T185A-Mutante war der *leak* signifikant reduziert. Die V67G-Mutation zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp. Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden, im Zuge zusätzlicher Messungen zur Bestimmung des SOCE. Hierbei wurde ebenfalls Thapsigargin eingesetzt, um das ER zu entleeren, in diesem Fall jedoch in einer EGTA freien Umgebungslösung. Erneut zeigte sich eine schwächere Antwort auf die Thapsigargin-Behandlung für die T185A-Zellen. Durch eine anschließende Calciumzugabe wurde die Stärke des durch die ER-Entleerung aktivierten SOCE gemessen. Der Rückstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum unterschied sich in den einzelnen Zelllinien nicht und die Funktionalität des SOCE war in den Zellen dementsprechend nicht beeinflusst (Abb. 41C und D).

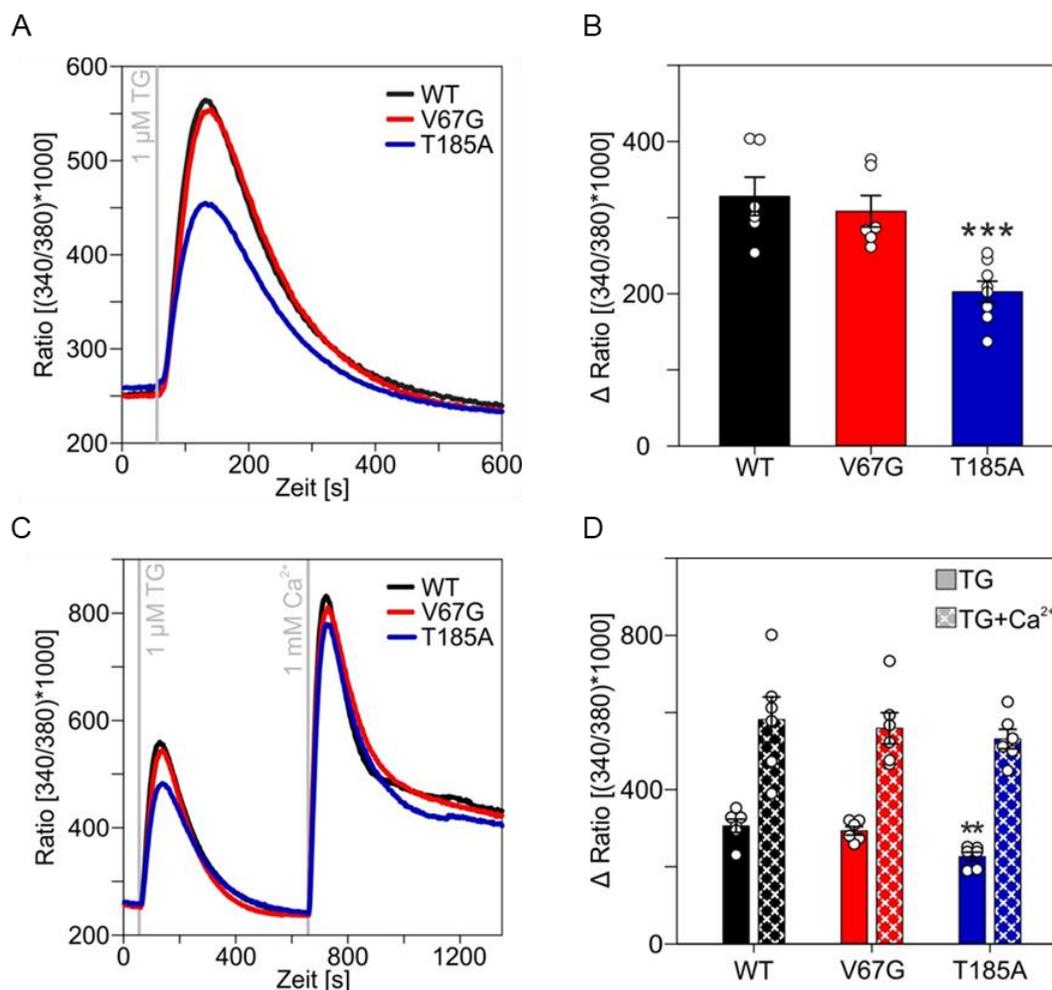


Abb. 41: Bestimmung des Calciumleaks und des SOCE der drei Zelllinien. Zur Vorbereitung der Calciummessung wurden $6 \cdot 10^5$ (WT; V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ (T185A) HEK-Zellen ausgesät und für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen werden für 25 min mit FURA-2AM beladen. Nachdem die Zellen zweimal mit ES (*external solution*) gewaschen wurde, wurden die Messungen in ES begonnen. Nach einer Minute, die zur Bestimmung des basalen Calciums diente, wurden unterschiedliche Messprotokolle gestartet. **A:** In diesem Fall beinhaltete die ES ebenfalls EGTA, um einen Einfluss von äußerlichem Calcium zu verhindern. Durch die Zugabe von Thapsigargin (TG) wurde die SERCA blockiert und der *leak* visualisiert. Die Messung wurde für neun Minuten nach Applikation fortgeführt. **B:** Die Differenz zwischen basalem Anfangswert und dem Maximum der Kurve wurde bestimmt. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in welcher 50 Zellen ausgewertet wurden. **C:** Die Zellen wurden für die SOCE-Messung ohne EGTA und ohne zugegebenes Calcium in der ES vermessen (nominal Calcium). Nach einer Minute wurde TG appliziert, um das ER zu entleeren. Calcium (f.c. 1 mM) wurde in Minute elf appliziert, wodurch der Rückstrom von Calcium in das Zytosol ermöglicht wurde. **D:** Die Differenz zwischen dem basalen Wert in der ersten Minute und den Maxima nach der Applikation von TG bzw. von Ca²⁺ wurde bestimmt. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in welcher 50 Zellen ausgewertet wurden. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp.

Wie beschrieben, haben sowohl Sec61 α als auch SERCA einen Einfluss auf die Anwesenheit von Calcium im ER-Lumen und bilden im Normalfall ein dynamisch ausbalanciertes System. Da in den Zellen sowohl der „Zulauf“ (SERCA) als auch der „Abfluss“ (Sec61 α) entweder in verringerter Menge oder in einer mutierten Form vorkommen, wurde in den nächsten Schritten untersucht, inwieweit das „Becken“ (ER Lumen) in seiner Füllung unterschiedlich ist. Die

Messungen, die mit dem Ionophor Ionomycin durchgeführt wurden (Abb. 42A und B), zeigten, dass die mutierten Zellen einen geringeren ER-Calciumpool aufwiesen, in beiden Fällen ca. 16 % weniger im Vergleich zum Wildtyp. Der Nachweis, dass diese Änderung spezifisch war für das ER, ist in Abb. 42C und D dargestellt. Nach einer Entleerung des ERs durch Thapsigargin wurde Ionomycin eingesetzt, um das verbleibende Calcium in weiteren Organellen freizusetzen, wie den Mitochondrien oder dem Golgi. Die Höhe des zweiten Peaks unterschied sich nicht zwischen den drei untersuchten Zelllinien. Die Speicherkapazität aller Organellen mit Ausnahme des ERs ist dementsprechend identisch. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass der Unterschied nach der Zugabe von Ionomycin (Abb. 42A und B), tatsächlich auf das ER zurückzuführen ist.

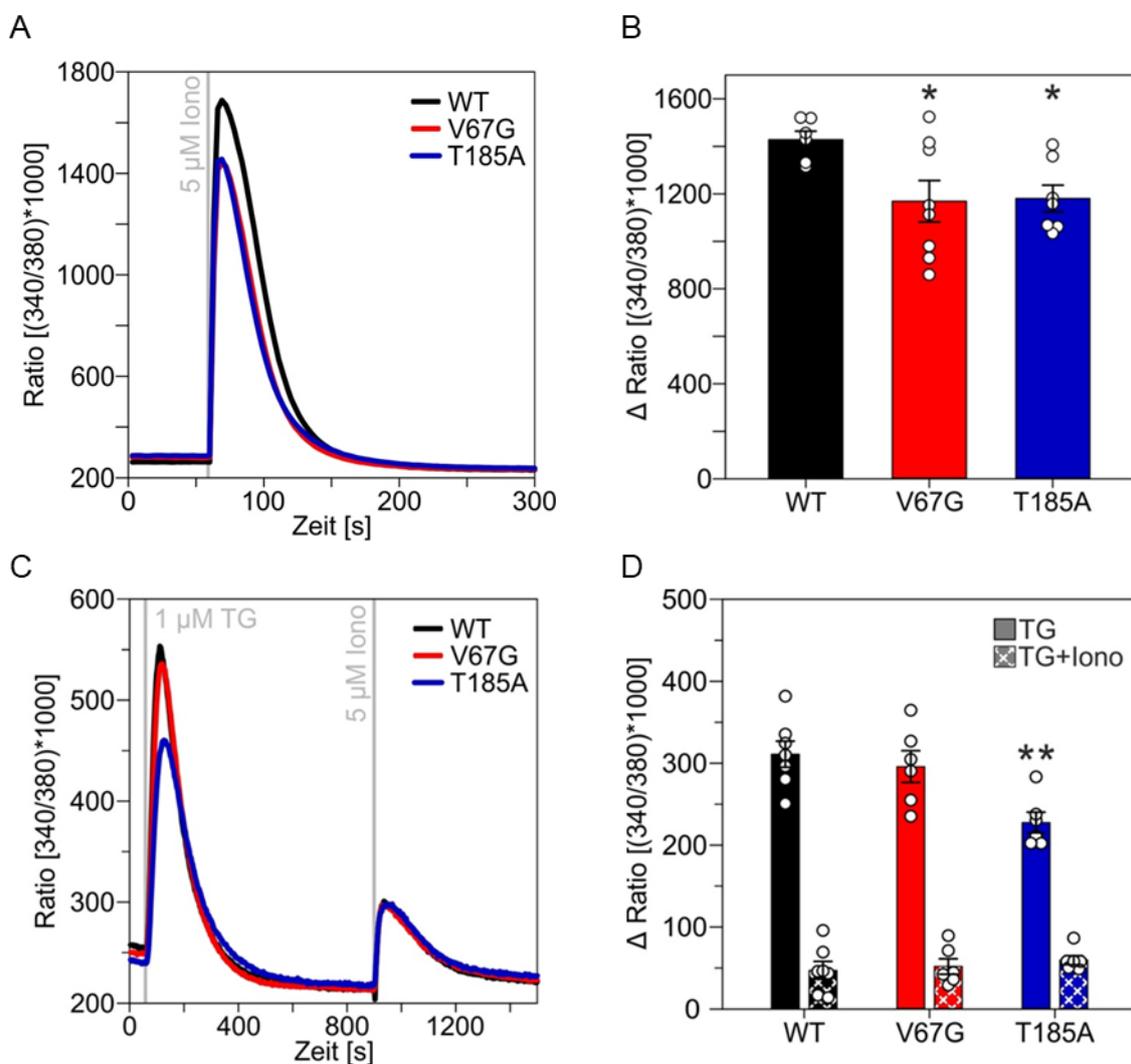


Abb. 42: Bestimmung der Menge des an löslichem Calcium im ER der gesamten Zelle. Zur Vorbereitung der Calciummessung wurden $6 \cdot 10^5$ (WT; V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ (T185A) HEK-Zellen ausgesät und für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen werden für 25 min mit FURA-2AM beladen. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, wurden die Messungen in ES+EGTA begonnen. Nach einer Minute, die zur Bestimmung des basalen Calciums diente, wurden unterschiedliche Messprozesse gestartet. **A:** Durch die Zugabe von Ionomycin (Iono) wurde freies Calcium aus allen von einer Membran umhüllten Komponenten der Zelle freigesetzt, was zu einer unmittelbaren, jedoch kurzfristigen Akkumulation im Zytosol führte. Die Messung wurde für vier Minuten

nach Applikation fortgeführt. **B:** Die Differenz zwischen basalem Anfangswert und dem Maximum der Kurve wurde bestimmt. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in welcher 50 Zellen ausgewertet wurden. **C:** Zur Bestimmung des Calciums, welches spezifisch nicht im ER gespeichert ist, wurde eine Kombination aus TG- und Iono-Behandlung gewählt. Nach einer Minute wurde TG appliziert, um das ER zu entleeren. Nach weiteren 14 min wurde Ionomycin zu den Zellen gegeben und so das in den Organellen verbliebene Calcium freigesetzt. Damit repräsentiert der zweite Peak die Speicherkapazität aller Organellen nach spezifischer Entleerung des ER durch TG. **D:** Die Differenz zwischen dem basalen Wert in der ersten Minute und den Maxima nach der Applikation von TG bzw. Iono wurde bestimmt und aufgetragen. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in welcher 50 Zellen ausgewertet wurden. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich die V67G- und die T185A-Zellen gleich hinsichtlich SOCE sowie verringerte Gesamtcalciumkapazität verhalten. Dieser Unterschied zum Wildtyp kann direkt auf einen Unterschied des ER-Calciumspeichers zurückgeführt werden. Unterschiedlich jedoch ist der durch Sec61 α -vermittelte Calciumleak, welcher in den T185A-Zellen stark verringert ist.

6.2.4. Entkopplung der Gesamtcalciumkapazität und dem Sec61-assoziierten Calciumleak

Wenn die Calciumkapazität des ERs, als ein einfaches physikalisches System visualisiert wird, beispielsweise als ein mit Wasser gefülltes Becken, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass eine verringerte Menge von Calcium im ER, also ein „geringerer Wasserdruck“ zu einem geringeren Ausstrom durch die Leckkanäle führen kann. Diese Modellüberlegung könnte auf die T185A-Mutante übertragen werden, für die weniger Gesamtcalcium und ein verringerter *leak* beobachtet wurde. Dies gilt nicht für die V67G-Mutante, bei der ein geringeres Gesamtcalcium und ein gleichbleibender *leak* festgestellt wurde. Daher wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob eine Verbindung zwischen diesen beiden Größen vorliegt.

Experimentell wurde so vorgegangen, dass die Zellen unter den Standardbedingungen für die Messung vorbereitet wurden (48 h auf Deckgläschen kultiviert, mit FURA2-AM beladen, zweimal gewaschen mit ES+EGTA) und deren Calciumleak und Gesamtcalcium vermessen wurden. Im Unterschied zu den bisher gezeigten Messungen wurde jedoch vor der Applikation von Ionomycin oder Thapsigargin bis zu 15 min abgewartet. Die daraus resultierenden Effekte sind in den Abb. 43 und Abb. 44 dargestellt. Bei einer standardmäßigen Behandlung nach einer Minute konnte der identische Effekt wie in Abb. 42A und B gezeigt, nachgewiesen werden. Wenn die Behandlung mit Ionomycin später als eine Minute nach Messbeginn erfolgte (Abb. 43), konnte eine geringere Resonanz auf die Behandlung festgestellt werden, was auf eine geringere Menge an freiem Calcium im ER zurückzuführen ist. Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Zeitdifferenz zwischen Messbeginn und Iono-Applikation und konnte in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden.

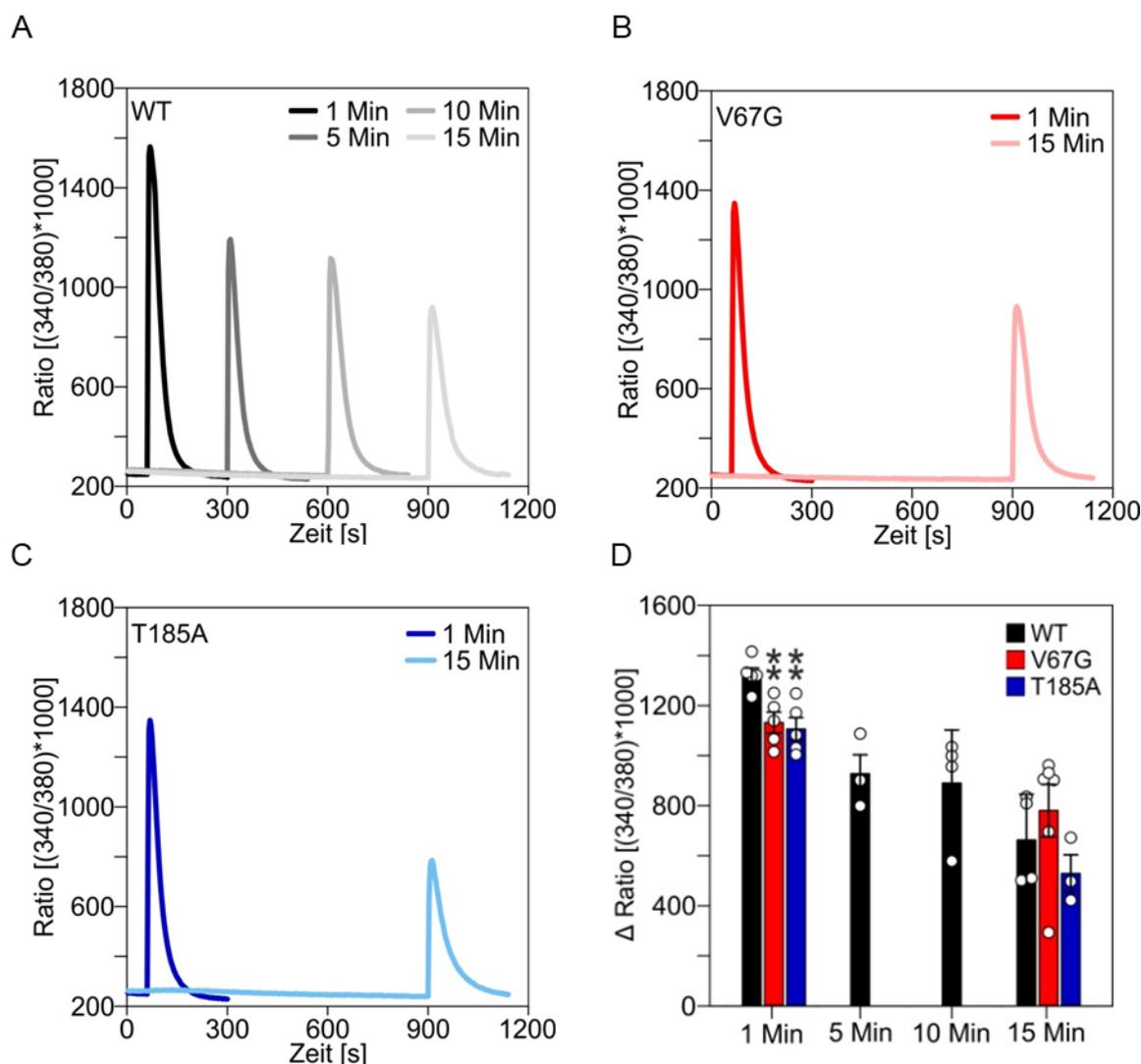


Abb. 43: Kinetik der Speicherkapazität des ERs. Zur Vorbereitung der Calciummessung wurden $6 \cdot 10^5$ (WT; V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ (T185A) HEK-Zellen ausgesät und für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen werden für 25 min mit FURA-2AM beladen und. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, wurden die Messungen in ES+EGTA begonnen. **A-C:** Durch die Zugabe von Ionomycin nach einer, fünf, zehn bzw. 15 min wurde Calcium aus allen von einer Membran umhüllten Komponenten der Zelle freigesetzt, was zu einer unmittelbaren, jedoch kurzfristigen Akkumulation im Zytosol führte. Die Messung wurde jeweils vier Minuten nach Applikation fortgeführt. Zu erkennen ist in allen Zelllinien eine mit der Zeit deutlich schwächer werdende Antwort auf die Behandlung mit Ionomycin durch die Zellen. **A** stellt die Messergebnisse des WT, **B** der V67G und **C** der T185A Zellen dar. **D:** Die Differenz zwischen basalem Anfangswert und dem Maximum der Kurve wurde bestimmt. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in der 50 Zellen ausgewertet wurden. Statistische Analysen wurden mittels *One-way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum identisch behandelten Wildtyp.

Im Vergleich wurden Thapsigargin-Messungen nach dem identischen Zeitschema ausgeführt. Hier wurden die Zellen mit Thapsigargin behandelt, um den Calciumleckstrom zum jeweiligen Zeitpunkt zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass durch eine spätere Applikation keine Änderungen in der Thapsigarginantwort zu messen war. Dies konnte für alle drei Zelllinien gezeigt werden. Auch die zu Beginn festgestellten Differenzen zwischen den T185A Zellen

und dem WT und V67G Zellen war bei einem Applikationszeitpunkt von 15 min noch immer präsent.

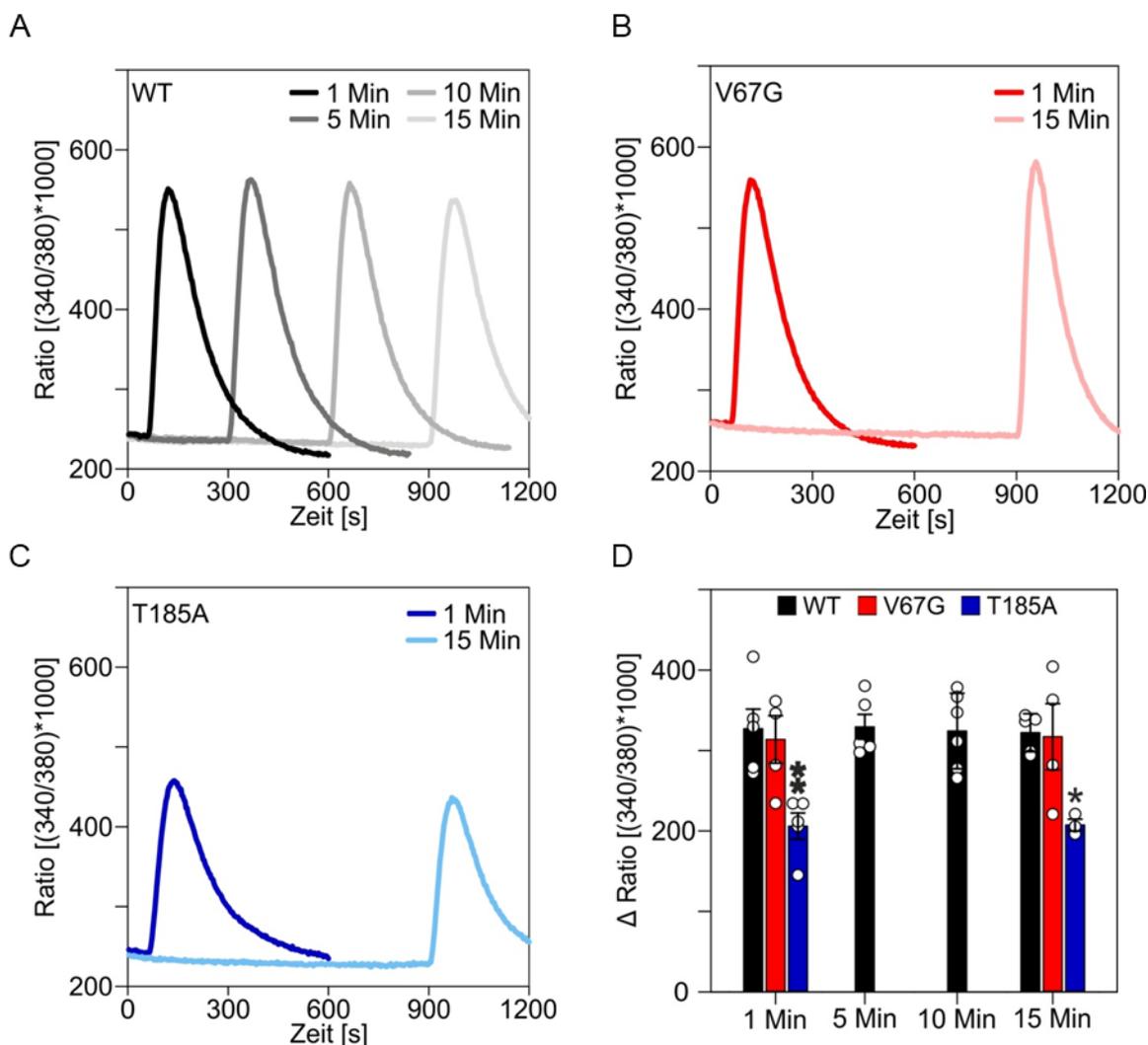


Abb. 44: Kinetik des Calciumleckkanals, visualisiert durch Thapsigargin. Zur Vorbereitung der Calciummessung wurden $6 \cdot 10^5$ (WT; V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ (T185A) HEK-Zellen ausgesät und für 48 Stunden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen werden für 25 min mit FURA-2AM beladen. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, wurden die Messungen in ES+EGTA begonnen. **A-C:** Durch die Zugabe von Thapsigargin (TG) nach einer, fünf, zehn bzw. 15 min wurde die SERCA blockiert und der Ausstrom von Calcium aus dem ER sichtbar. Die Messung wurde für jeweils mindestens fünf Minuten nach Applikation fortgeführt. Es kann keine Veränderung des *leak* in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt des TG beobachtet werden. **A** stellt die Messergebnisse des WT, **B** der V67G und **C** der T185A-Zellen dar. **D:** Die Differenz zwischen basalem Anfangswert und dem Maximum der Kurve wurde bestimmt. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in der 50 Zellen ausgewertet wurden. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum identisch behandelten Wildtyp.

Basierend auf diesen Experimenten lässt sich festhalten, dass der Sec61-vermittelte Calciumleak nicht im unmittelbaren Zusammenhang mit dem ER-Calciumpool steht. Bei einer Reduzierung des „Druckes“ des Pools ist es nicht die Folge, dass der leak, also der „Abfluss“, ebenfalls verringert wird, sondern dauerhaft konstant bleibt. Auch ist weiterhin der Unterschied

des *leak* der T185A-Mutante im Vergleich zu den anderen Zelllinien konstant. Bei einem geringeren Gesamtcalciumgehalt ist der *leak* identisch verringert. Die im beobachteten Maße reduzierte Menge des Gesamtcalciums hat also nicht den in T185A-Zellen beobachteten Effekt eines geringeren *leak* zur Folge.

6.2.5. Messungen im ER zeigen eine verlangsamte Calciumdepletion aus dem ER

Neben der Möglichkeit Calcium im Zytosol mit Hilfe des Farbstoffes FURA-2AM zu detektieren, können genetisch codierte Calciumindikatoren verwendet werden. Der genetisch codierte GCaMP₆₋₁₅₀ Reporter wurde eingesetzt, um die Calciumkonzentration speziell im ER-Lumen zu bestimmen. Durch die N-terminal liegende Signal- und die C-terminale KDEL-Sequenz gelangt der Reporter in das ER. Dort erfolgt in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit eine Änderung der fluorometrischen Eigenschaften des GFPs, welches als Signalgeber dient. Die Anwendung dieser Technik erlaubt es, den Ausstrom aus dem ER auf luminaler Seite zu messen, sozusagen spiegelbildlich zu den in Abb. 41A und B gezeigten Thapsigargin-Messungen. Da ein Unterschied des *leak* für die T185A mutierten Zellen im Vergleich zu den WT und V67G Zellen zu beobachten war, sollte nun untersucht werden, ob dieser Unterschied auch durch eine zweite Methode verifiziert werden kann (Kap. 5.6.3). Dazu wurden die Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und am Folgetag mit dem Sensor transfiziert. Die Messung, die am Folgetag durchgeführt wurde, erfolgte in einer calciumfreien Pufferlösung. Durch das exprimierte GFP konnte das ER der Zellen identifiziert werden und die Depletion des Calciums aus dem Organell verfolgt werden.

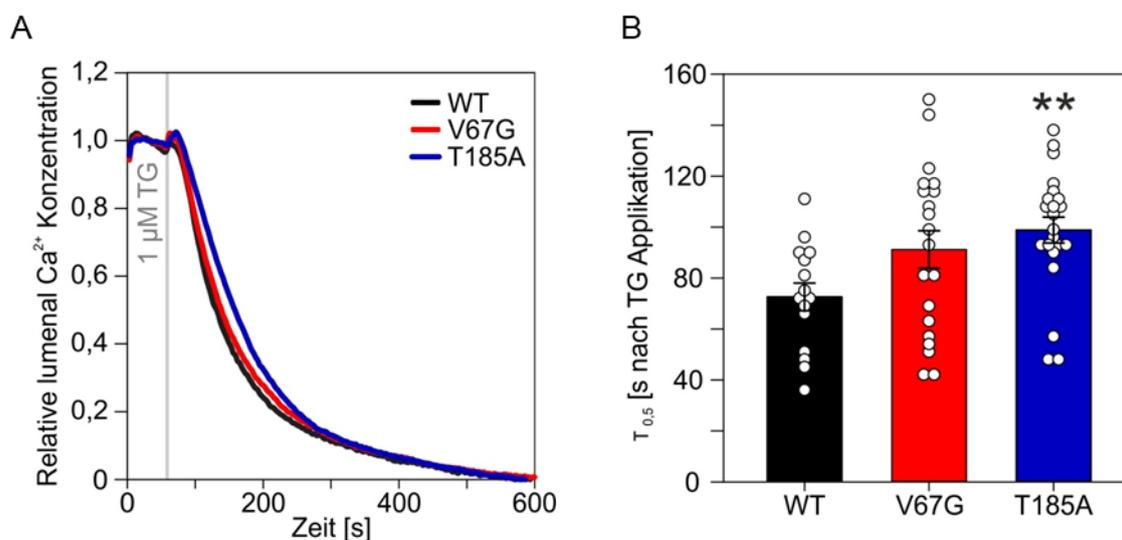


Abb. 45: Bestimmung der Calciumdepletion aus dem ER, ermittelt durch den genetisch codierten Calciumsensor GCaMP₆₋₁₅₀. Es wurden 3×10^5 in 3,5 cm Zellkulturschale auf Deckgläsern ausgesät. Die Transfektion mit dem GCaMP₆₋₁₅₀ Plasmid erfolgte nach 24 Stunden. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden im Inkubator gelagert. In dieser Zeit akkumuliert der auf GFP basierende Reporter durch die angefügte KDEL- und Signalsequenz im ER, wodurch das ER im Mikroskopiebild identifiziert und ausgewertet werden kann **A**: Nach einer Minute wurde Thapsigargin zu den Zellen gegeben und der

Abfall der Calciummenge aus dem ER über neun Minuten beobachtet. Vermessen wurden einzelne Zellen. Der Zeitpunkt, dem die Hälfte des Calciums aus dem ER depletiert wurde, definiert als $T_{0,5}$ wurde bestimmt und ist in **B** dargestellt. Ein Datenpunkt stellt den Messwert einer Zelle dar. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way* ANOVA und Post hoc Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp.

Zu Beginn der Messung wurde die relative Konzentration des luminalen Calciums der einzelnen Zelle gleich 1 gesetzt, was bedeutet, dass von einem „gefüllten“ ER ausgegangen wird. Durch die Applikation von TG wurde das Calciumgleichgewicht gestört und ein Rückführen des Calciums in das ER verhindert. Durch den weiterhin bestehenden *leak* kam es zu einem Abfall des luminalen Calciums im Verlauf der Messung. Diese zeigte keine besonderen Auffälligkeiten. Betrachtet man die Kinetik der Calciumdepletion durch die Bestimmung von $T_{0,5}$, also den Zeitpunkt, an dem die Hälfte des Calciums aus dem ER ausgeströmt ist, wird deutlich, dass die Mutanten eine langsamere Depletion zeigen. Für T185A konnte dieser Unterschied als signifikant verlangsamt nachgewiesen werden (Abb. 45).

Die Resultate der Calciummessungen, die das ER-Lumen betreffen, lassen sich durchaus in Übereinstimmung bringen mit den zytosolisch ermittelten Messwerten. T185A zeigt eine signifikant verlangsamte Calciumdepletion aus dem ER, während die zytosolische Messung einen geringeren Peak ergab. Wenn angenommen wird, dass die Calciumclearance der Zellen, also dem Herausführen von Calcium in den extrazellulären Raum, identisch ist, entsteht durch den verlangsamt *leak* ein geringerer maximaler Peak. Somit konnte auch hier gezeigt werden, dass die T185A-Mutation einen Einfluss auf den Calciumleckstrom durch Sec61 α ausübt.

6.2.6. Verringerte SERCA2-Abundanz führt zur erhöhten Aktivität der SERCA-Proteine

Basierend auf den Beobachtungen, die in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 gemacht wurden, die verringerte SERCA2-Abundanz auf Proteinebene (Abb. 39E und F) und die verringerte Menge des gespeicherten Calciumpools im ER (Abb. 42B) entstand die Fragestellung, wie aktiv die vorhandenen SERCA-Proteine sind. Eine verringerte SERCA2-Proteinmenge lässt nicht zwangsläufig darauf schließen, dass eine Verringerung dessen gesamter Aktivität vorliegt.

Um die Aktivität der verbleibenden SERCA-Proteine zu überprüfen, wurde ein auf Absorptionsmessungen basierender Assay etabliert. Zentral für diesen Assay sind drei Punkte: (I) SERCA kann spezifisch durch Thapsigargin inhibiert werden, (II) die Aktivität von SERCA ist gekoppelt an einen ATP-Verbrauch und (III) die Regeneration des verbrauchten ATPs wurde an die Oxidation von NADH zu NAD⁺ gekoppelt (Primeau et al. 2018; Sehgal et al. 2017). Das Konzept des Assays wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. T. Simmen (University of Alberta, Kanada). Für den Assay wurden die Zellen insoweit vorbereitet, als dass diese am Tag vor dem Experiment 1/2 passagiert wurden, um ein optimales

Wachstum zu ermöglichen. Am Tag des Experimentes wurden diese geerntet und als SPZ vorbereitet (Kap. 5.5.5). Dies war erforderlich, um eine direkte Zugänglichkeit der Puffer zur ER-Membran herzustellen, was die Funktionalität des Assays garantiert. Gemessen wurde der durch die Zellen erfolgte ATP-Verbrauch. Dieser wurde bestimmt durch das Abfallen des NADH-Levels über die Zeit (Kap. 5.2.8, Abb. 11). Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen SERCA-Proteine relativ zum Wildtyp gesehen, eine deutlich erhöhte Aktivität von ca. 200 % (V67G) bzw. ca. 180 % (T185A) zeigten.

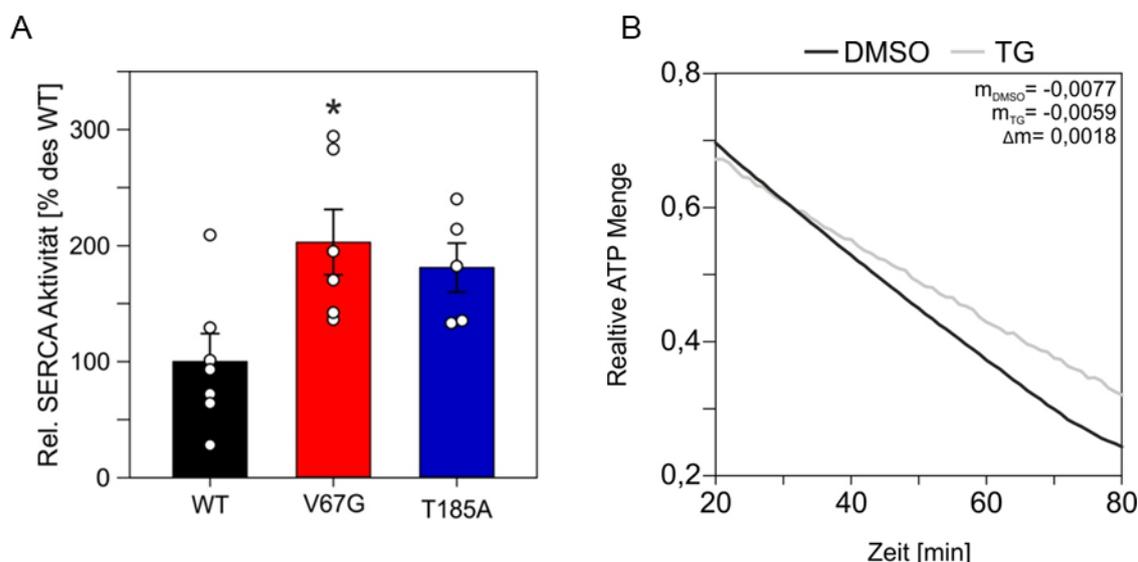


Abb. 46: Bestimmung der SERCA Aktivität. Die Zellen wurden ein Tag vor dem Experiment passagiert und am Tag des Experimentes als SPZ vorbereitet. Diese SPZ wurden mit DMSO als Kontrolle oder mit Thapsigargin versetzt. Durch das Thapsigargin wurde die SERCA blockiert und deren Anteil an zellulären ATP Verbrauch blockiert. Das im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht verbrauchte ATP wird dementsprechend SERCA zugerechnet. **A:** Nach einer Normierung mit der Proteinabundanz (Abb. 39F) konnte so eine relative SERCA-Aktivität der einzelnen Proteine in den Zellen bestimmt werden. Dargestellt ist die Auswertung mehrerer Experimente, wobei ein Datenpunkt den Mittelwert eines Triplets darstellt. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way* ANOVA und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp. **B:** Repräsentativer Messverlauf einer Messung (Triplikate) der WT-Zelllinie. Dargestellt ist die relative ATP Menge im ausgewerteten Zeitraum zwischen 20 und 80 Minuten der Messung. Die Proben wurden entweder zur Kontrolle mit DMSO behandelt (schwarzer Verlauf) oder Thapsigargin (TG, grauer Verlauf), was einen verlangsamten ATP Verbrauch aufgrund der inhibierten SERCA-Aktivität zur Folge hatte. Die Steigung (m) der jeweiligen Verläufe wurde bestimmt und das entsprechende delta gebildet.

Aus diesen Experimenten lässt sich folgern, dass in den mutierten Zellen eine höhere relative Aktivität der SERCA vorliegt. Dies kann dadurch bedingt sein, dass es sich um einen Ausgleichsmechanismus handelt, um die geringere Menge an vorhandenen SERCA2-Protein auszugleichen (Abb. 39). In Kombination mit den Ergebnissen aus Kapitel 6.2.3, der verringerten Calciumkapazität und des unveränderten SOCE des ERs, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass diese Aktivität dennoch nicht ausreichend ist, um ein normales Calciumniveau im ER zu garantieren.

6.2.7. Calciumleakmessungen geben keinen Hinweis auf UPR-Aktivität

Basierend auf den in Abb. 39C und F präsentierten Ergebnissen lässt sich vermuten, dass die Zellen aufgrund der eingeführten Mutation nicht in einem akuten Stresszustand versetzt wurden, der ausgelöst werden würde, wenn Stress durch fehlgefaltete oder akkumulierte Proteine entsteht. Die Abundanz der ER-Chaperone ist nicht erhöht, was für einen gestressten Zustand im Zuge einer UPR-Antwort der Zelle typisch gewesen wäre. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob die Zellen auch identisch auf artifiziell ausgelösten Fehlfaltungsstress durch die Zugabe eines Stressors von außen reagieren. Um dies zu überprüfen, wurde der Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin eingesetzt, welcher, wie in vorherigen Experimenten gezeigt (Abb. 25), die Glykosylierung und damit die vollständige Reifung von Proteinen im ER verhindert. Durch diesen unreifen Zustand der Polypeptide wird BiP zu selbigen rekrutiert, um die fehlgefaltete Form zu stabilisieren und eine Aggregatbildung zu verhindern. Dadurch erwirkt weniger BiP die Schließung des Sec61-Kanals und der *leak* wird stärker (Schäuble et al. 2012). Dadurch ist der verstärkte *leak* ein indirektes Maß für die akute Reaktion der Zelle auf eine Stressinduktion durch fehlgefaltete Proteine.

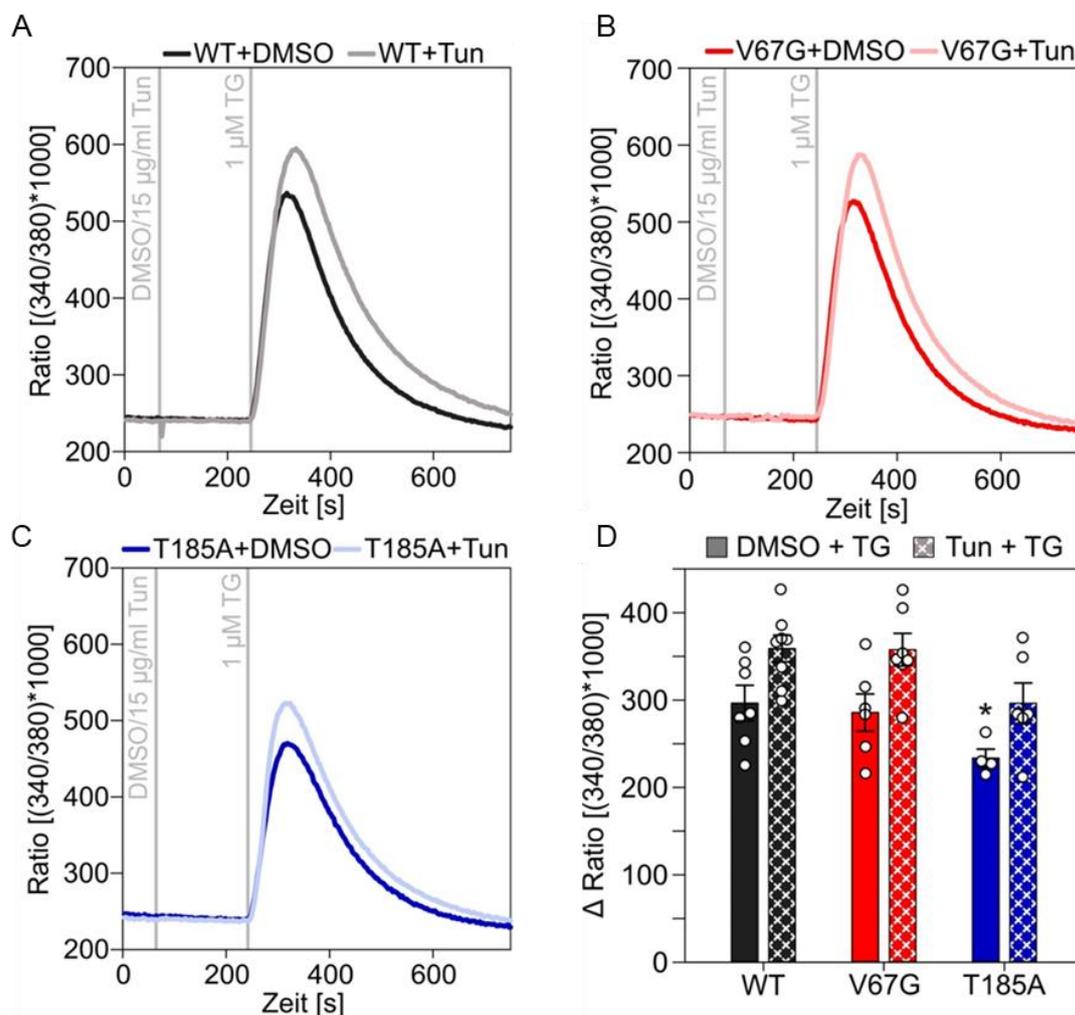


Abb. 47: Messung des stressinduzierten Calciumleaks ausgelöst durch die Behandlung mit Tunicamycin. Die Zellen wurden ein Tag vor dem Aussäen 1:2 gesplittet, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Es wurden $6 \cdot 10^5$ (WT/V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ Zellen (T185A) in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und für 48 Stunden auf den Deckgläsern kultiviert. Die Zellen wurden für 25 min mit FURA2-AM beladen. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, wurden die Messungen in dieser Lösung begonnen. **A-C:** Nach einer Minute wurde der Stressor Tunicamycin (15 μ g/ml) oder als Lösemittelkontrolle DMSO zugegeben. Nach weiteren drei Minuten erfolgte die Zugabe von Thapsigargin (TG) zur Visualisierung des Calciumleaks. Die Messung wurde neun Minuten fortgeführt. **A** zeigt den zeitlichen Verlauf der Messung der Wildtypzellen, **B** der V67G-Zellen und **C** der T185A-Zellen. **D:** Auswertung der Mittelwerte der einzelnen Messungen. Dargestellt ist das Delta zwischen dem basalen Anfangswert in der drei Minuten und dem Maximum des Peaks nach TG-Zugabe. Ein Datenpunkt repräsentiert eine Messung, in der 50 Zellen ausgewertet wurden. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum identisch behandelten Wildtyp.

Die Behandlung mit Tunicamycin selbst, zeigt keinen Effekt auf die Calciumhomöostase der Zelle, wie an dem gleichbleibenden Messverlauf innerhalb der ersten vier Minuten zu erkennen ist. Nach der Applikation von Thapsigargin zeigt der *leak* in DMSO behandelten Zellen vergleichbare Werte zu den in Abb. 41B dargestellten Werten. T185A zeigt einen signifikant verringerten *leak* im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien (V67G und WT). Nach einer Vorbehandlung mit Tunicamycin zeigt sich ein verstärkter *leak*. Dieser betrug in allen Zelllinien ca. 20 % mehr im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen.

Dadurch zeigte sich, dass alle drei Zelllinien identisch auf den hier ausgelösten akuten Fehlfaltungs-Stress reagieren. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Abschnitt 6.2.2 überein, bei denen gezeigt werden konnte, dass Markerproteine für Stress wie zum Beispiel BiP oder GRP170 auch in einer vergleichbaren Häufigkeit in den drei Zelllinien vorhanden sind. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen durch die Mutation nicht unterschiedliche zum Wildtyp auf das Auslösen des UPR-Stresses reagiert und möglicherweise auch keinem akuten UPR-Stress ausgesetzt ist.

6.2.8. Chemische Chaperone und SERCA-Aktivatoren zeigen einen positiven Einfluss auf den Zellindex

Verschiedene Mutationen des Sec61 α zeigen verringerte Sensitivität gegen unterschiedliche Substanzen, welche im Zusammenhang mit den durch die Mutation ausgelösten strukturellen Änderungen des Proteins stehen (Van Puyenbroeck & Vermeire 2018). Durch die hier untersuchten Mutationen sind ebenfalls strukturelle Veränderungen im Protein vermutet worden. Zum einen wird der *plug* durch die V67G-Mutation möglicherweise destabilisiert, des Weiteren könnte die Struktur der Region um den *pore ring* verändert sein durch die potenziell fehlenden Wasserstoffbindungen der T185A Mutation (Bolar et al. 2016).

Da die Mutation nicht nur einen Einfluss auf Sec61 α selbst auslöst, sondern wie in den Ergebnissen zuvor gezeigt, auch globale Effekte der Zelle zur Folge hat, wurde ein „Miniscreening“ im *96 well* Format durchgeführt, welches sowohl Sec61 α direkt als auch Sec61 abhängige Prozesse beeinflusst. Hier sind Eeyarestatin 1 als direkter Modulator des Sec61 α , chemische Chaperone (4-PBA, Tudca), Modulatoren der Calciumhomöostase (Forskolin, Thapsigargin, Ellagsäure) und Stress auslösende Substanzen eingesetzt worden (Thapsigargin, DTT, Tunicamycin, Puromycin, Oligomycin). Durchgeführt wurde dieser Screen mit Hilfe eines RTCA (Kap. 5.7). Dadurch können die Zellen kontinuierlich für eine beliebig lange Zeit beobachtet und deren Reaktion auf die Zugabe von Substanzen auch längerfristig vermessen werden. Bestimmt wurde während der Messzeit die Änderung der Zellgröße und der Zellzahl, deren Kombination als systemspezifischer Zellindex wiedergegeben, da eine Differenzierung zwischen beiden Kenngrößen nicht möglich ist mittels RTCA. Ein Vergleich der unterschiedlichen Behandlungen kann durch die Ermittlung der Steigung der Zellindices über die Zeit erfolgen, die normalisiert wurde gegen die entsprechende Lösemittelkontrolle, welche dem Wert 1 entspricht.

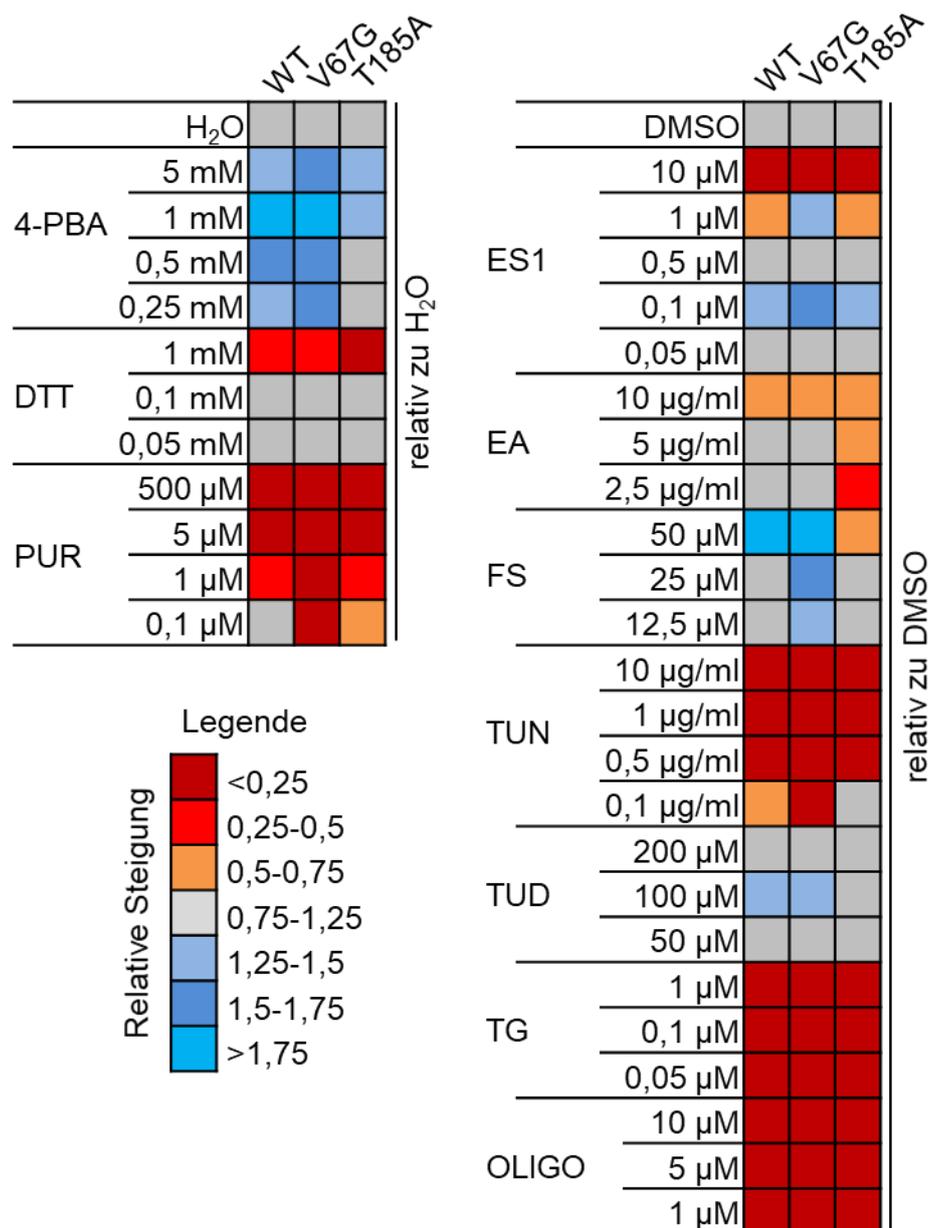


Abb. 48: Effekt der getesteten Substanzen auf den Zellindex der verschiedenen Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Lösemittelkontrollen. Es wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen pro *well* ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit den aufgeführten Substanzen behandelt und das Wachstum für 84 Stunden fortgesetzt. Die Steigung als zellzahlunabhängige Größe wurde 6 Stunden nach der Applikation der Substanzen und dem absoluten Maximum der Kurve bestimmt. Behandlungen, die ein Absterben der Zellen zur Folge hatten, wurden nicht ausgewertet. Diese Steigung wurde normiert zu der Lösemittelkontrolle der jeweiligen Substanz (links H₂O; rechts DMSO) und in sieben Kategorien eingeteilt, welche in der Heatmap farblich codiert sind. Die Messung erfolgte automatisiert und kontinuierlich durch die in der Platte eingelassenen Elektroden. Die Auswertung basiert auf einer individuellen Messzahl von 2 bis 12 Messungen je nach Substanz. PUR: Puromycin; ES: Eeyarestatin 1; EA: Ellagsäure; FS: Forskolin; TUN: Tunicamycin; TG: Thapsigargin; OLIGO: Oligomycin. Die gemessenen Werte sind im Anhang Tab. 17 aufgeführt.

In Abb. 48 sind die zueinander relativen Steigungen dargestellt. Diese geben dadurch Auskunft darüber, ob die Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (H₂O oder DMSO) einen gesteigerten oder einen geringen Zellindex aufwiesen. Dies kann als Maß für ein besseres oder schlechteres Zellwachstum und Proliferation gesehen werden. Die drei Zelltypen zeigen

in vielen Fällen eine identische Reaktion auf die Behandlung. Während die Behandlung mit Thapsigargin (TG) oder Oligomycin (OLIGO) oder Tunicamycin (TUN) immer eine geringe Steigung zur Folge hatte, wurde das Wachstum durch das chemische Chaperon TUDCA kaum beeinflusst. Hier zeigten der WT und V67G die Tendenz eines gesteigerten Zellindex für eine der betrachteten Konzentrationen. Durch die SERCA-Aktivatoren Ellagsäure (EA) und Forskolin (FS) ist ebenfalls kein einheitlicher Effekt auf die Zellen ausgelöst worden. Während EA die T185A-Zellen hemmte, konnte kein Effekt für WT und V67G-Zellen beobachtet werden. Der positive Effekt von FS, der in WT und V67G zu erkennen war, konnte in T185A-Zellen nicht nachgewiesen werden. Eeyarestatin 1 (ES1) welches direkt auf Sec61 wirkt, zeigt keinen regelmäßigen Effekt. Während eine Konzentration von 0,1 μM ES1 einen positiven Effekt hatten, zeigten niedrigere Konzentrationen keinen Effekt, während Konzentrationen über 0,5 μM tendenziell negative Auswirkungen hatten. Im Fall der wasserlöslichen Modulatoren zeigte sich ein klarer Unterschied zwischen positiven und negativen Effekten. Während Puromycin (PURO) Stress auslöst und dadurch das Zellwachstum einschränkte, was auch für DTT in hohen Konzentrationen der Fall war, führte die Zugabe von 4-PBA in fast allen Fällen zu einer höheren Steigung. Der Effekt wird detaillierter in Abb. 49A-D dargestellt. Es zeigte sich, dass der Zellindex durch die Behandlung mit 4-PBA in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle (H_2O dunkler eingefärbte Linien) gesteigert wurde. Für die WT- und V67G-Zellen bedeutet dies, dass die Plateauphase des Wachstums früher erreicht wurde und diese auch höher lag. Die T185A-Zellen erreichten in den 102 Stunden Beobachtungszeitraum noch nicht die Plateauphase, aber auch hier wurde deutlich, dass die Zellen durch die Behandlung schneller proliferierten. Der positive Effekt den 4-PBA auf den Zellindex ausübt war im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mM zudem in allen drei Zelllinien konzentrationsabhängig festzustellen. Dieser Vergleich ist in Abb. 49D zu erkennen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Zellen mit genetisch modifiziertem *SEC61A1* weitgehend vergleichbare Eigenschaften zum Wildtyp aufweisen. Es konnte nicht gezeigt werden, dass die Reaktion der Mutanten auf einen Stressor besser ausfiel, wobei besser in diesem Fall gleichzusetzen ist mit einem weniger eingeschränkten Wachstum. Einzig die V67G-Mutante zeigte eine tendenziell bessere Reaktion auf Forskolin und Eeyarestatin 1. T185A-Zellen zeigten sich anders als die anderen beiden Zelltypen durch die Applikation von Ellagsäure negativ beeinflusst und die Reaktion auf 4-PBA-Behandlung war nicht so stark positiv wie für WT- und V67G-Zellen. Gleichzeitig bestätigten diese Messungen die in Abb. 37A dargestellten Daten, dass die T185A Zellen langsamer wuchsen als die WT- oder V67G-Zellen.

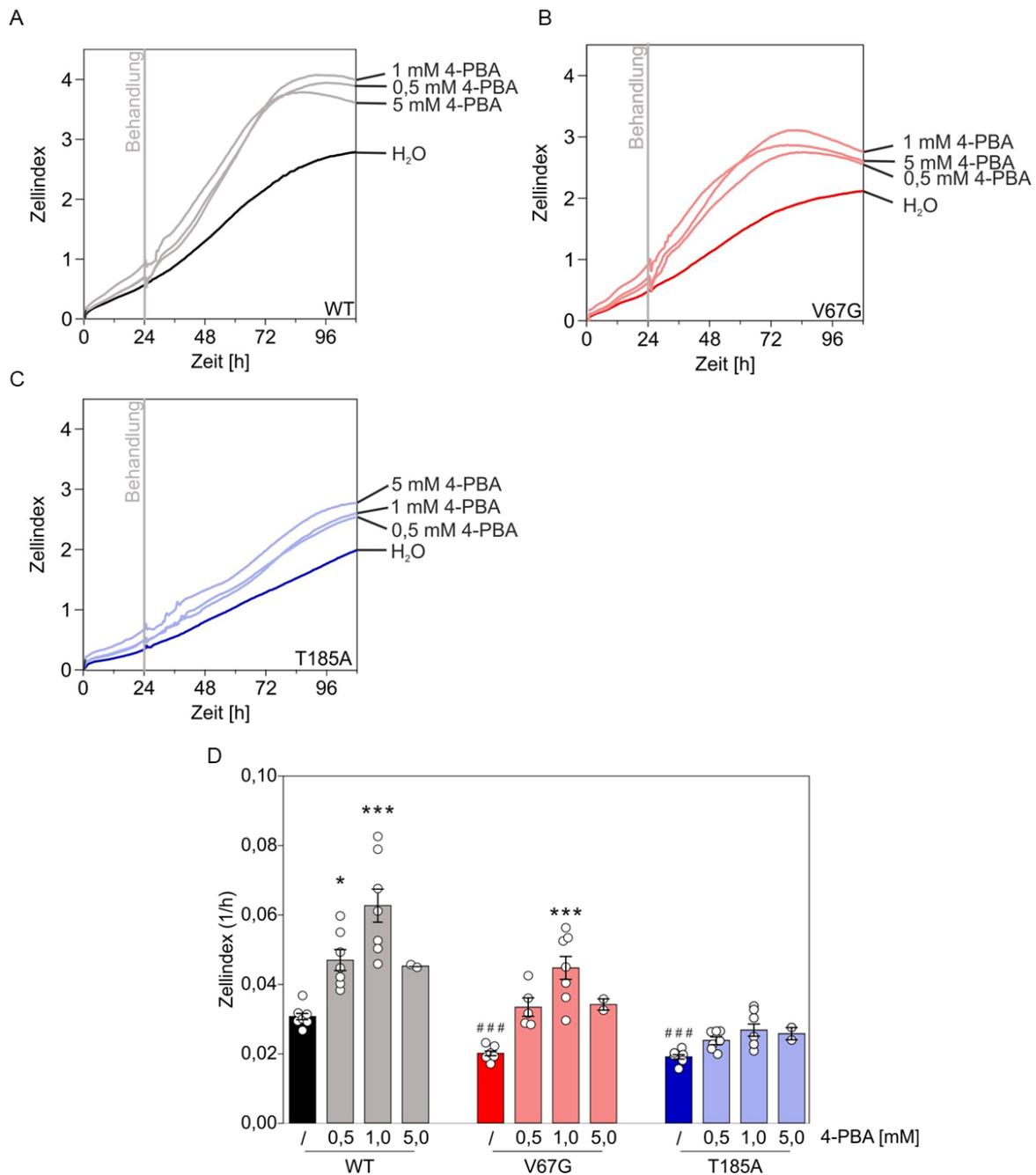


Abb. 49: Wirkung von 4-PBA auf die drei unterschiedlichen HEK-Zelllinien. Die 96 well E-plate wurde geblenkt und darauffolgend $5 \cdot 10^4$ Zellen pro well ausgesät. **A bis C:** Nachdem die Zellen sich in den ersten 30 min abgesetzt haben, wurde der Zellindex alle 15 min bestimmt über insgesamt 108 Stunden. **A** zeigt den Zellindex in Abhängigkeit der Zeit für WT-Zellen mit unterschiedlicher Behandlung **B** den Zellindex der V67G- und **C** den Zellindex der T185A-Zellen über die Zeit. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen 4-PBA behandelt, bzw. mit der Lösemittelkontrolle H₂O. Die Zellen wurden weiterhin für 84 Stunden vermessen. **D:** Für eine Vergleichbarkeit der Zellindices, wurde die Steigung der Graphen bestimmt, vom Zeitpunkt nach der Applikation bis zum absoluten Maximum der Kurve. Ein Messpunkt repräsentiert die Steigung des Zellindices in einem well. Die angegebenen Signifikanzniveau beschreiben die quantifizierten Unterschiede zur identisch kontrollbehandelten Probe (*) oder zum kontrollbehandelten Wildtyp (#).

6.2.9. Fehlfunktionen der Calciumhomöostase können durch eine 4-PBA Behandlung verringert werden

Ein verbessertes Zellwachstum, im vorhergegangenen Kapitel repräsentiert durch einen erhöhten Zellindex, ist nicht zwangsläufig als positive Eigenschaft zu definieren. Eine der grundlegenden Eigenschaften von Krebszellen ist es ein schnelleres „verbessertes“ Wachstum im Vergleich zu gesunden Zellen zu zeigen. Eine den Zellindex unterstützende Wirkung, konnte in den RTCA-Experimenten durch die Behandlung mit 4-PBA erzeugt werden. An dieser Stelle wird nicht davon ausgegangen, dass 4-PBA hier eine schädliche Auswirkung auf die Zellen hat, dies aus unterschiedlichen Gründen. (i) Zum einen wird 4-PBA als nicht krebserzeugendes, FDA zugelassenes Mittel gegen verschiedene Krankheiten bereits eingesetzt (Iannitti & Palmieri 2011), (ii) in der Funktion als chemisches Chaperon verhindert es die Fehlfaltung von Proteinen, was weniger Stress und ein verbessertes Wachstum erlauben könnte (Welch & Brown 1996), (iii) die mutierten Zelllinien V67G und T185A zeigen nach der Behandlung einen ähnlichen Zellindex wie die zur Kontrolle mit H₂O behandelten Wildtypzellen. Durch die Behandlung wurden die Mutanten also in die Richtung des „Normalzustandes“ gelenkt. Welchen spezifischen Einfluss jedoch 4-PBA auf die unterschiedlichen Parameter hat, kann durch die Messung des Zellindex nicht abgebildet werden. Daher wurde 4-PBA ebenfalls in den zu Beginn etablierten *live-cell calcium imaging* - Versuchen getestet (Kap. 6.2.3). Da Calcium als *second messenger* eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuert oder an diesen beteiligt ist, könnte ein verbesserter Zellindex mit einer veränderten Regulation des *leak* oder des Gesamtcalciums einhergehen. Theoretische Hinweise auf diese Überlegung liefern zum einen die Funktion des chemischen Chaperons an sich, also des verbesserten Transports von Proteinen, zum anderen auch die Literatur, in der beschrieben wurde, dass durch 4-PBA Behandlung die Abundanz des SERCA-Proteins in diabetischen Ratten erhöht werden konnte (Takada et al. 2012). Dadurch war es von Interesse, ob infolgedessen die Reaktion der Zellen auf eine Thapsigargin oder Ionomycin verändert ausfiel.

Um zu ermitteln, ob die Zugabe von 4-PBA einen unmittelbaren Effekt auf die Zellen ausübt, wurde identisch zu den bereits beschriebenen Experimenten eine Behandlung der Zellen während der Messung im *live-cell calcium imaging*-Setup durchgeführt. Nach der standardisierten Vorbereitung der Zellen für 48 Stunden und der Beladung der Zellen mit FURA2-AM wurden die Messungen in der ES+EGTA Lösung gestartet. Hier wurde zu den Zellen nach einer Minute 4-PBA bzw. die Lösekontrolle H₂O zugegeben. Ob allein dadurch eine Änderung im Verhalten der Zellen erfolgte, wurde für drei bzw. fünf Minuten beobachtet. Nach dieser Zeit wurde Thapsigargin appliziert, um die Veränderung des Sec61-vermittelten Calciumleaks beurteilen zu können.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 50 dargestellt. In den Abbildungsteilen A-F ist der zeitliche Verlauf der Messungen abgebildet. In diesen wird deutlich, dass in keiner der Zelllinien eine Reaktion auf die Applikation von 4-PBA per se erfolgte, weder über einen Zeitraum von drei noch von fünf Minuten. Gleiches gilt für die Kontrollexperimente mit H₂O. Unterschiedlich war jedoch die Reaktion der Zellen auf die anschließende Applikation von Thapsigargin. Der dadurch dargestellte Calciumleak aus dem ER war im Vergleich zur Lösemittelkontrolle gesteigert (Abb. 50 A-F in der helleren Farbe dargestellt). Des Weiteren zeigte sich in allen Zelllinien eine zeitliche Abhängigkeit dieses Effektes. Im Vergleich zwischen den drei und fünf Minuten mit 4-PBA behandelten Proben, zeigen die Proben, die für fünf Minuten behandelt wurden in allen Fällen einen stärker erhöhten Calciumleak (Abb. 50 G). Im Fall der T185A-Zelllinie war diese Steigerung des *leak* für beide Behandlungszeiträume signifikant erhöht im Vergleich mit der jeweiligen Lösemittelkontrolle.

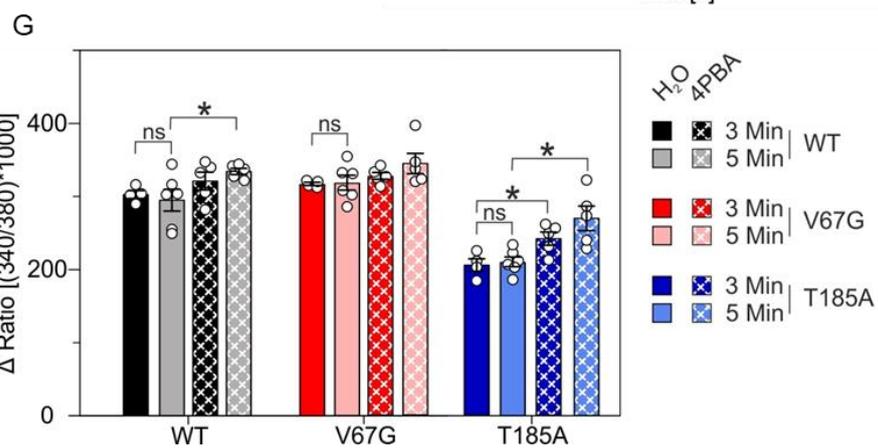
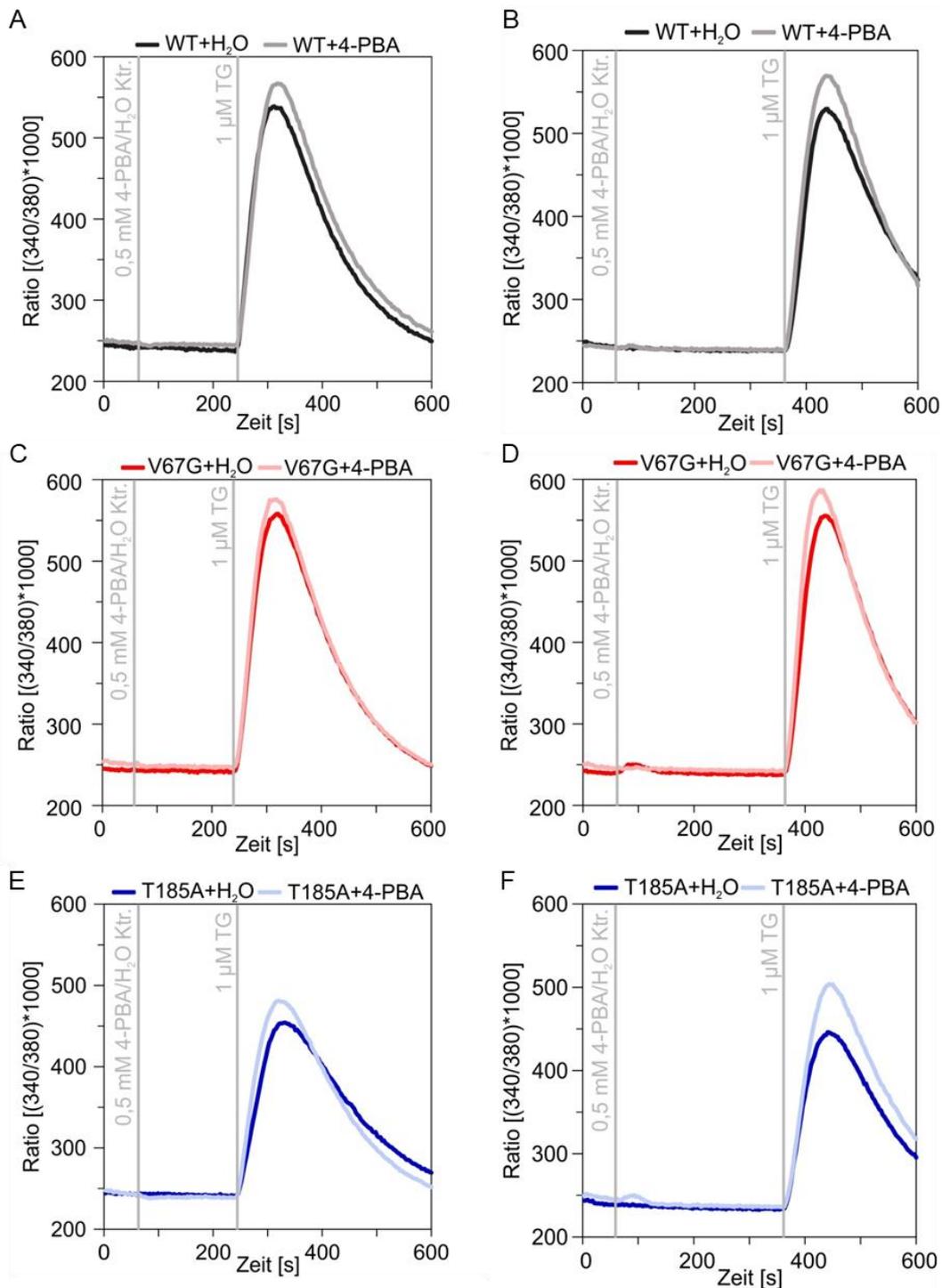


Abb. 50: Kurzzeitiger Effekt von 4-PBA auf den Calciumleak aus dem ER-Lumen. Die Zellen wurden einen Tag vor dem Aussäen 1:2 gesplittet, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Es wurden $6 \cdot 10^5$ (WT/V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ Zellen (T185A) in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden für 48 Stunden auf den Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden für 25 min mit FURA2-AM beladen. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, wurden die Messungen in dieser Lösung begonnen. Nach dem Messen der basalen Calciumratio für eine Minute wurde 4-PBA appliziert. Die Messung wurde für drei bzw. fünf Minuten fortgesetzt, worauf folgend Thapsigargin zugegeben wurde. Dadurch wurde der Calciumleak visualisiert, der durch den Sec61-Komplex erfolgt. Die gesamte Messdauer benötigte zehn Minuten. Abbildung **A** stellt den Messverlauf für die Wildtypzellen nach drei Minuten Behandlung dar, Abbildung **B** für fünf Minuten. Die entsprechenden Messungen für V67G sind in Abbildung **C** und **D**, für T185A in **E** und **F** dargestellt. **G**: Zusammenfassend wurden die Differenzen zwischen dem basalen Calciumwert und dem Maximum des Peaks gebildet. Ein Messpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert einer Messung aus der Analyse von 50 Zellen. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way* ANOVA und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveau beschreiben die quantifizierten Unterschiede zwischen den gekennzeichneten Bedingungen.

Es zeigte sich, dass 4-PBA einen schwach verstärkenden, von der Dauer der Inkubation abhängigen Effekt auf den Calciumleak in den Zellen ausübt. Dieser Effekt ist unabhängig vom genetischen Hintergrund der Zelllinie, ist aber im Vergleich zwischen den Wildtypzellen und V67G-Zellen identisch, jedoch stärker in den T185A-Zellen, die einen grundsätzlich schwächeren Calciumleak zeigen (vgl. Abb. 41A und B).

Ebenfalls wurde überprüft, ob eine kurzzeitige Behandlung mit 4-PBA zu einer Änderung im Gesamtcalciumgehalt der Zellen führt. Identisch zu den in Abb. 50 gezeigten Vorgehen wurden die Zellen mit 4-PBA bzw. H_2O behandelt, welches für fünf Minuten auf die Zellen einwirken konnte. Durch die Applikation von Ionomycin wurde das Calcium in den Zellen visualisiert.

In diesen Experimenten zeigte sich keine unmittelbare Auswirkung von 4-PBA auf die Calciumhomöostase während der fünfminütigen Behandlungszeit, zu erkennen in Abb. 51A-C. Gleichzeitig zeigte sich keine Änderung, sobald die Zellen mit Ionomycin behandelt wurden. Es konnte weder eine gesteigerte noch verminderte Gesamtcalciumkapazität der einzelnen Zelllinien festgestellt werden (Abb. 51D).

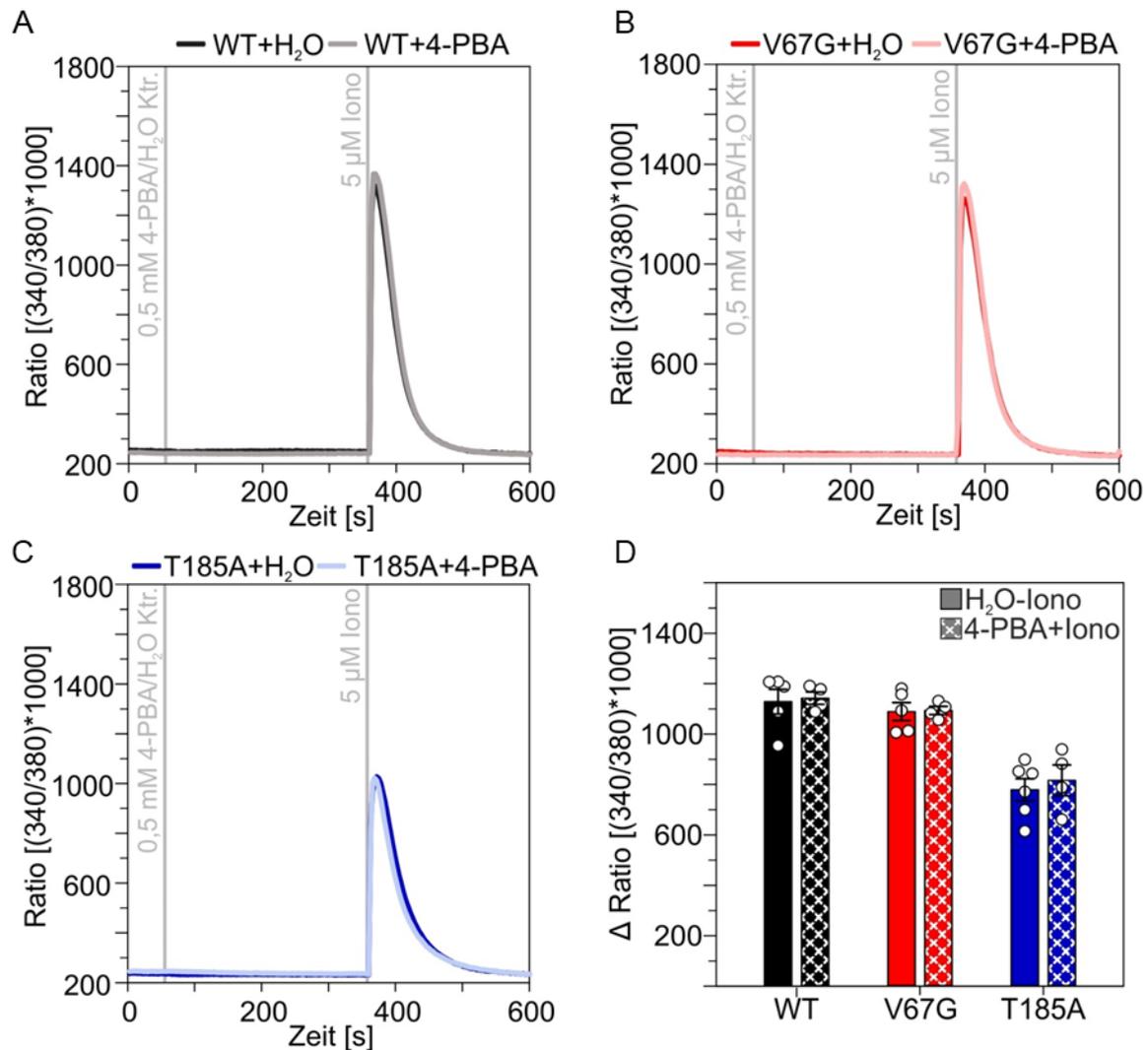


Abb. 51: Einfluss der kurzzeitigen Behandlung mit 4-PBA auf die Gesamtcalciumkapazität der HEK-Zelllinien. Die Zellen wurden ein Tag vor dem Aussäen 1:2 gesplittet, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Es wurden $6 \cdot 10^5$ (WT/V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ Zellen (T185A) in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach einer Inkubation von 36 h Stunden wurden die Zellen mit dem Farbstoff FURA2-AM für 25 min beladen. Die Deckgläschen wurden in den Messring eingespannt, die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen und auch in dieser Lösung vermessen. Nach einer Minute, in der die Baseline der Zellen bestimmt wurde, wurde 4-PBA, bzw. als Lösemittelkontrolle H₂O zu den Zellen gegeben. Nach weiteren fünf Minuten Messung wurde das Calciumionophor Ionomycin hinzugegeben, um alle Calciumpools zu entleeren. Die Reaktion wurde für vier Minuten beobachtet. **A:** Stellt den Mittelwert der Messungen für den Wildtyp, **B** für die V67G-Mutante und **C** für die T185A-Mutante dar. **D:** Auswertung der Differenz zwischen dem basalen Wert und dem Maximum der Kurve einzelner Messungen. Ein Messpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert einer Messung aus der Analyse von 50 Zellen. Statistische Analysen wurden mittels One-Way ANOVA und *Post-hoc* Test durchgeführt.

Mit Hinblick darauf, dass eine Behandlung mit 4-PBA unter anderem eine erhöhte Abundanz der SERCA zur Folge haben kann, war hier auch die Langzeitwirkung von 4-PBA von gesteigertem Interesse (Takada et al. 2012). Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit mit den vorhergegangenen Messungen zu gewährleisten, wurden die Zellen ausgesät und nach 8 Stunden mit 4-PBA behandelt. So konnten die Zellen für 36 Stunden weiterhin kultiviert

werden, sodass wie auch in den vorherigen Experimenten ein Anwachsen der Zellen für 48 Stunden auf den Deckgläschen der Fall ermöglicht wurde.

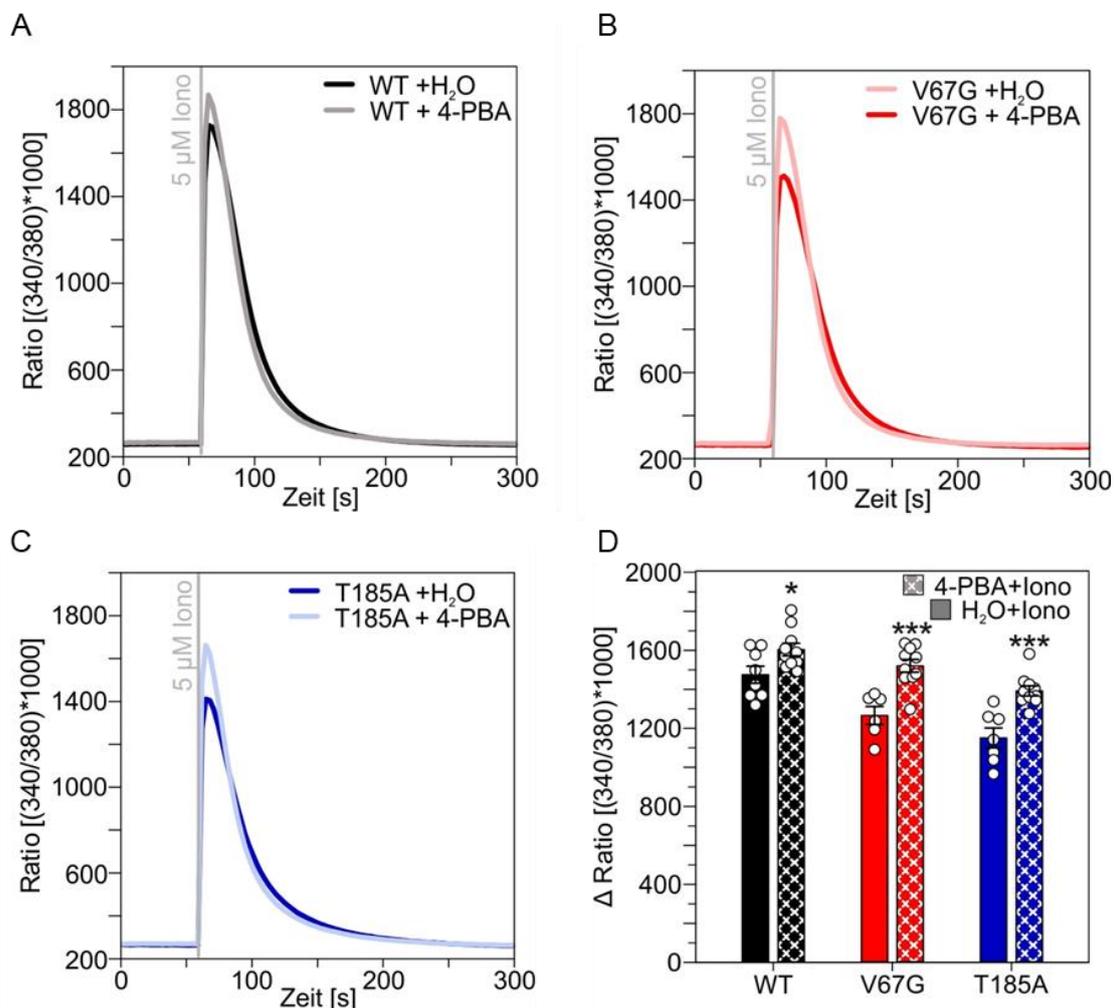


Abb. 52: Veränderung der Gesamtcalciumkapazität durch die Behandlung mit 4-PBA für 36 Stunden. Die Zellen wurden ein Tag vor dem Aussäen $\frac{1}{2}$ gesplittet, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Es wurden $6 \cdot 10^5$ (WT/V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ Zellen (T185A) in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach acht Stunden wurde den Zellen 4-PBA zugegeben (0,5 mM Endkonzentration) bzw. die identische Menge Wasser als Lösemittelkontrolle. Die Zellen wurden für 36 Stunden weiter auf den Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden für 25 mit FURA2-AM beladen. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, wurde die Messung in dieser Lösung begonnen. Nach dem Messen der basalen Calciumratio für eine Minute wurde Ionomycin appliziert, um das Calcium zu mobilisieren. Die Messung wurde für vier Minuten fortgeführt. **A:** Stellt den Mittelwert der Messungen für den Wildtyp, **B** für die V67G-Mutante und **C** für die T185A-Mutante dar. **D:** Auswertung der Differenz zwischen dem basalen Wert und dem Maximum der Kurve einzelner Messungen. Ein Messpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert einer Messung aus der Analyse von 50 Zellen. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zur zugehörigen Wasserkontrolle.

Die Zellen selbst wurden auf die bekannte Art und Weise analysiert (Abb. 42Abb. 52). Als Effekt der dauerhaften 4-PBA Behandlung konnte eine verstärkte Reaktion auf die Applikation von Ionomycin festgestellt werden. Dieser Effekt zeigte sich in allen drei Zelllinien. Im Fall der Zelllinien, die die Mutationen *SEC61A1-V67G* oder *SEC61A1-T185A* tragen, ist dieser Effekt ausgeprägter als im Wildtyp. Besonders zu beachten ist hier, dass das Gesamtcalcium der

zwei mutierten Zelllinien durch die Behandlung mit 4-PBA mindestens auf das Niveau der mit der Lösemittelkontrolle behandelten Wildtypzellen angehoben wurde.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Behandlung mit 4-PBA in beiden Experimenttypen einen Steigerungseffekt ausübte. Durch die kurzzeitige Behandlung folgte ein stärkerer Calciumleak, der parallel zur Behandlungszeit anstieg. Der Langzeiteffekt der Behandlung ist, dass der Gesamtcalciumgehalt der Zellen gesteigert wurde. In beiden Fällen ließ sich feststellen, dass vor allem die T185A-Zelllinie durch die Behandlung mit 4-PBA einen Calciumleak und ein Gesamtcalcium erreichte, die dem „Normalzustand“ der Wildtypzellen nach Behandlung mit der Lösemittelkontrolle oder im unbehandelten Zustand nahekam. Dies ist auch für V67G im Fall der verringerten Calciumkapazität der Fall. Worauf diese beiden Effekte schlussendlich basieren, konnte anhand dieser Experimente nicht eindeutig ermittelt werden. Die Vermutung jedoch ist, dass der verbesserte Transport von Proteinen mittels des Sec61 zu einer vermehrten Öffnung des Kanals führt und damit zu einem stärkeren *leak*. Dies könnte auf Dauer zu einer gesteigerten Abundanz von anderen Proteinen führen, die einen Einfluss auf den Gesamtcalciumhaushalt haben, wie zum Beispiel SERCA.

6.2.10. Mutiertes Sec61 α zeigt reduzierte Sensitivität gegenüber Eeyarestatin1

Der Sec61-vermittelte Calciumleckstrom wird in der Regel erst dadurch visualisiert, dass der Gegenspieler, SERCA, mit der Hilfe von Thapsigargin inhibiert wird. Die unterbundene Rückführung der Calciumionen führt zu deren Akkumulation im Zytosol und kann durch FURA-2AM vermessen werden. Eine direkte Visualisierung des Calciumleckstroms durch Sec61 ist jedoch ebenfalls möglich, indem ES1 zur Zellmanipulation eingesetzt wird. Dieses bindet im *lateral gate* des Sec61 α und arretiert den Kanal in einer Konformation, die einen dauerhaften Calciumausstrom, jedoch keinen Proteintransport erlaubt (Gamayun et al. 2019). Daher wurde dieser Modulator ebenfalls eingesetzt, um die direkte Wirkung auf die Sec61 α -Mutanten zu testen. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 dargestellt.

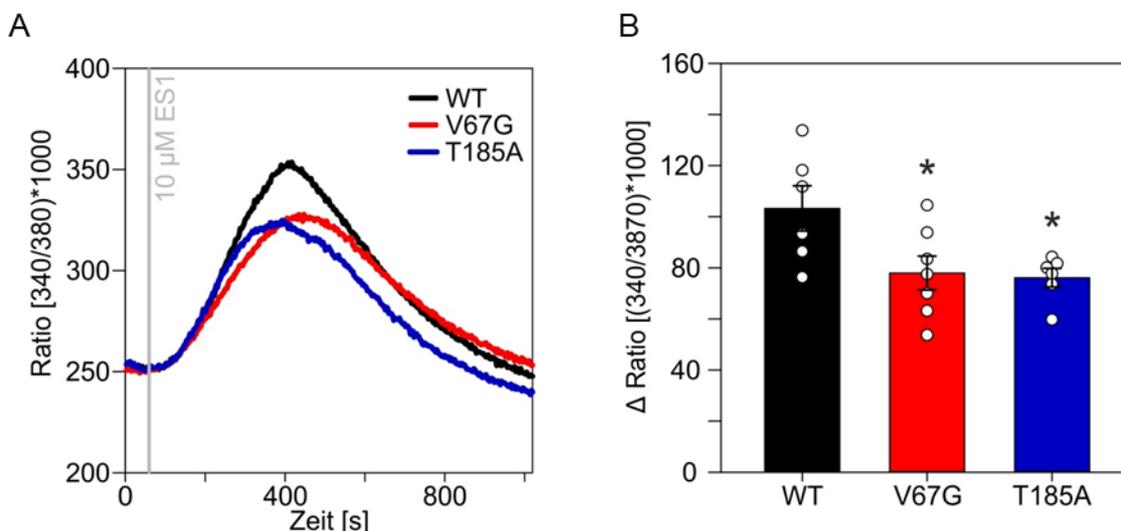


Abb. 53: Reaktion der HEK-Zellen auf die Behandlung mit Eeyarestatin 1 (ES1) im *live-cell calcium imaging*. Die Zellen wurden einen Tag vor dem Aussäen 1:2 gesplittet, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Es wurden $6 \cdot 10^5$ (WT/V67G) bzw. $6,5 \cdot 10^5$ Zellen (T185A) in einer 6 cm Zellkulturschale mit Deckgläschen ausgesät. Nach einer Inkubation für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen in kleinere Kulturschalen übertragen und durch die Zugabe von FURA2-AM für 25 min für die Calciummessung vorbereitet. Nachdem die Zellen zweimal mit ES+EGTA gewaschen wurden, erfolgte der Start der Messung in der genannten Lösung. **A:** Nach einer Minute Messzeit, um den basalen Calciumgehalt zu bestimmen, wurde Eeyarestatin 1 (ES1) zu den Zellen gegeben. Der daraus resultierende Effekt wurde für weitere 16 min beobachtet. **B:** Die Differenz zwischen dem basalen Anfangswert und dem Maximum der Kurve stellt die hier aufgeführte Δ Ratio dar. Ein Messpunkt repräsentiert eine Messung bei der jeweils 50 Zellen ausgewertet wurden. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp.

Hierbei zeigte sich, dass in den Zellen, die eine mutierte Variante des *SEC61A1* beinhalten, die Menge an ausströmendem Calcium signifikant um ca. 20 Prozent verringert ist im Vergleich zum Wildtyp. Ein zeitlicher Unterschied sowohl während der Akkumulation des Calciums im Zytosol als auch der Clearance besteht nicht.

Die hier gewonnenen Daten lassen die Vermutung zu, dass durch die hier präsenten *SEC61A1*-Mutationen der Effekt auf das Sec61 α -Protein weniger stark ausgeprägt ist. Durch die Mischpopulation des Sec61 α , wie sie auch in ADTKD-Patienten vorliegt, ist dieser Effekt jedoch in einer geringen Form ausgeprägt. ES1 interagiert laut der Literatur mit dem Sec61 α -Protein, indem es in das *lateral gate* eingelagert wird nachdem ein Transportvorgang stattgefunden hat (Gamayun et al. 2019). Das ES1 einen geringeren ausgeprägten Effekt in den Mutanten zeigte, könnte daher mit einer verringerten Transportfähigkeit des Sec61 α zusammenhängen. Die Experimente zur Untersuchung der Transportfähigkeit der ADTKD-Zellen ist in den nächsten Kapiteln beschrieben.

6.2.11. *In vitro* Transportstudien zeigen verringerte Transportkapazität spezifischer Substrate

In der Vergangenheit wurde beobachtet, dass verschiedene Mutationen des Sec61 α nicht nur einen Einfluss auf den Sec61 vermittelten Calciumleckstrom ausübten, sondern auch auf den Translokon vermittelten Transport (Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020). Das Gleiche könnte bei den hier untersuchten Mutationen V67G und T185A der Fall sein. Des Weiteren ist die geringere Sensitivität gegenüber Eeyarestatin1 im *live-cell calcium imaging* ein nächster Hinweis darauf, dass auch der Transport von Substraten beeinflusst sein könnte. Aus diesem Grund wurden mit der Unterstützung von Monika Lerner und Dr. Sven Lang *in vitro* Transportstudien durchgeführt, die zeigen sollten, ob, und wenn ja, welche Transportsubstrate durch die Mutationen beeinflusst sind. Hierbei wurden sowohl nierenspezifische Proteine wie Uromodulin und Renin getestet, aber auch von den HEK-Zellen und der ADTKD Erkrankung unabhängige Proteine.

Für den *in vitro* Transport wurden die Zelllinien vorbereitet, indem diese geerntet wurden und aus diesen SPZ präpariert wurden (Kap. 5.5.5). Diese wurden zusammen mit der genetischen Information für zu transportierende Proteine mit einem Reticulozytenlysat und ³⁵S-Methionin inkubiert und so während des Transportes radioaktiv markiert (Kap. 5.3.2). Abschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die synthetisierten und transportierten Proteine mittels Autoradiographie nachgewiesen (Kap. 5.3.3; Abb. 54B und D). Wie in der Abb. 54A und B dargestellt, war der posttranslationale Transport, sowohl von TA-Proteinen (Sec61 β , Cytochrom b5), als auch von kurzen sekretorischen Proteinen (Preprocecropin und Apelin) nicht durch die Mutation beeinflusst. Sowohl in V67G- als auch in T185A- mutierten Zellen ist kein Unterschied in der Transporteffizienz der Proteine im Vergleich zum Wildtyp auszumachen. Anders verhielt es sich für den Sec61 α -abhängigen cotranslationalen Transport (Abb. 54C und D). Hier ist es nicht möglich eine allgemeine Aussage über die Beeinflussung des Transportweges zu treffen. Da Proteine wie das Prionprotein (PRP) oder die Invariante Kette (IVC) nicht durch die Mutation beeinflusst sind, kann gefolgert werden, dass die grundsätzliche Funktionalität des Translokons für cotranslationalen Transport weiterhin besteht. Ebenso ist die Modifizierung durch Signalsequenzabspaltung und Glykosylierung weiterhin möglich (Abb. 54A und B). Dennoch zeigen Preprolactin (PPL) und das nierenspezifische Protein Renin (REN) sowohl in V67G als auch in T185A Zellen eine signifikante Reduktion der Transporteffizienz. In beiden Fällen ist der Anteil des transportierten, reifen Proteins ca. 50 % geringer im Vergleich zum Wildtyp. Ein Unterschied zwischen den beiden Mutanten wurde nur für das Modellsubstrat Uromodulin (UMOD) deutlich. Hier war Transport nur in V67G Zellen negativ beeinflusst, erneut etwa 50 %. In den T185A Zellen zeigte sich kein Transportdefekt für Uromodulin.

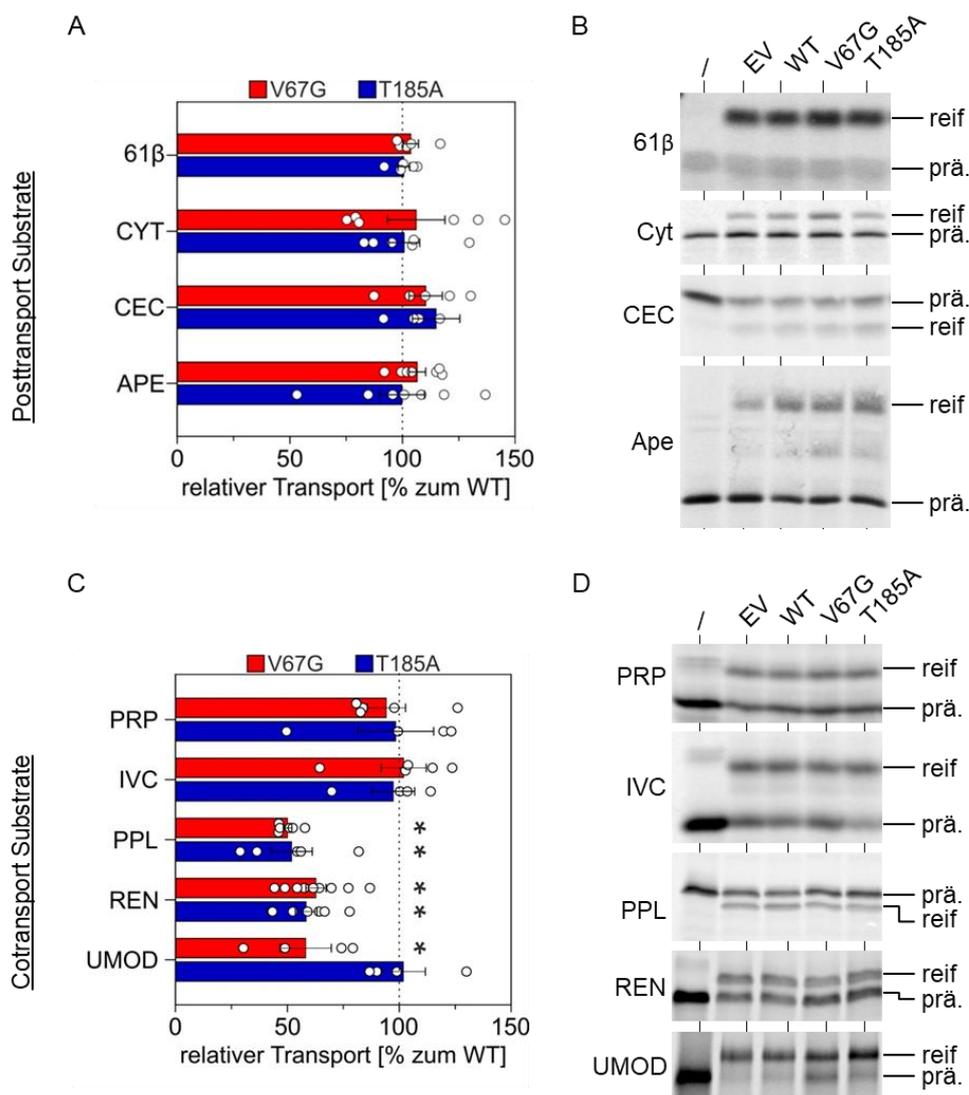


Abb. 54: Proteintransport verschiedener Substrate in V67G- und T185A-Zellen, die entweder in co- oder posttranslationalen Bedingungen transportiert wurden. Die relative Transporteffizienz ist dargestellt im Vergleich zum Transport in WT HEK-Zellen. Es wurden SPZ aller Zelllinien präpariert, die dann als ER-Fraktion im Transport eingesetzt werden konnten. Es wurden die aufgeführten Transportsubstrate genutzt. Nach dem *in vitro* Transport wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und autoradiographisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich durch eine Massenänderung (aufgrund von Modifizierungen) ein erfolgreicher Transport des Proteins in das ER. Vorläuferproteine sind durch „prä“ gekennzeichnet, die transportierte, reife Form durch „reif“. Die Bestimmung der Transporteffizienz erfolgte durch die Bestimmung des Verhältnisses von reifem Protein und gesamt synthetisiertem Protein (prä + reif). Die Ergebnisse wurden auf die wildtypischen HEK-Zellen bezogen normalisiert. **A:** Der Transport des Prionproteins (PRP), der prä-MHC Klasse II invarianten Kette (IVC), Präprolactins (PPL), Renins (Ren) und Uromodulins (UMOD) wurden unter cotranslationalen Bedingungen durchgeführt (Kap. 5.3.2). **B:** Repräsentative autoradiographische Darstellung eines Transportexperimentes der entsprechenden cotranslationalen Transportsubstrate. **C:** Der Transport von Sec6β (61β), Cytochrom b5 (CYT), Preprocecropin (CEC) und Apelin (APE) erfolgt im posttranslationalen Modus (Kap. 5.3.2). **D:** Repräsentative autoradiographische Darstellung eines Transportexperimentes der entsprechenden posttranslationalen Transportsubstrate. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum Wildtyp. Erstellt wurde der Datensatz mit der Unterstützung von Monika Lerner.

Dies lässt den Schluss zu, dass durch die *SEC61A1*-Mutationen nur bestimmte Transportprozesse beeinflusst sind, und die Transporteffizienz durch das Translokon nicht für

alle Substrate negativ beeinflusst ist. Eine strukturelle Gemeinsamkeit aufgrund der Topologie oder der posttranslationalen Modifikation konnte zwischen den beeinflussten Proteinen nicht festgestellt werden.

Da es sich bei Renin um ein sekretorisches Protein handelt, ist der Transport in das ER hinein nur ein Zwischenschritt der Biogenese dieses Proteins. Funktionell ist diese Proteinase erst, wenn sie aus der Zelle sezerniert wird und im Blut ankommt. Daher war es von Interesse festzustellen, ob die Menge des von den mutierten Zellen sezernierten Renins ebenfalls verringert ist. Hierzu führte der Kollaborationspartner ein Experiment durch, bei dem die proteinspaltende Aktivität des Renins ausgenutzt wurde. Durch die Spaltung eines Substrates im Medium wurde ein Lichtsignal generiert, welches die Aktivität und damit die Menge des im Medium vorhandenen Prorenins und Renins definierte (Abb. 55).

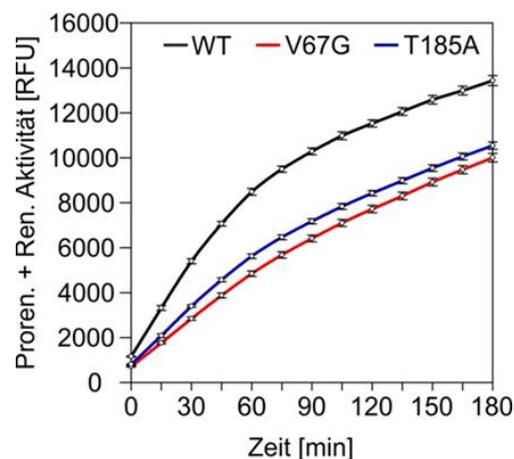


Abb. 55: Messung der proteolytischen Aktivität von Renin als Maßeinheit der Reninsekretion Die unterschiedlichen HEK-Zellen wurden mit einem Reninplasmid transfiziert und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Medium der Zellen wurde gesammelt und mit Trypsin behandelt, um das inaktive Prorenin in das proteolytisch aktive Renin umzuwandeln. Das Medium wurde in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben und mit einem modifizierten Reninsubstrat versetzt. Dieses Substrat (Sensolyte 520 Renin Assay Kit, AnaSpec) beinhaltet eine Kombination aus 5-FAM (Fluorophor) und QXL520 (Quencher). Durch die Renin-vermittelte Spaltung wird das Fluorophor aktiv und dessen Signal kann bei 528 nm alle 15 min vermessen werden. Die relative Fluoreszenz (RFU) gibt demnach die Aktivität und damit die Menge des sekretierten Renins in das Medium wieder. Der Datensatz wurde generiert und zur Verfügung gestellt mit freundlicher Erlaubnis von Dr. M. Živná (Prag).

In diesem Experiment zeigte sich, dass die relative Fluoreszenz zum abschließenden Zeitpunkt des Experimentes, nach drei Stunden, in V67G- und T185A-Zellen gleichwohl ca. 30 % geringer waren als in den zum Vergleich genutzten Wildtypzellen. Daraus lässt sich folgern, dass weniger Renin von den mutierten Zellen im selben Zeitraum sezerniert wurde.

Es kann festgehalten werden, dass der Sec61-Komplex trotz der Mutation weiterhin einen Transport von Substraten erlaubt und diese auch weiter prozessiert werden können. Während der posttranslationalen Transport in seiner Funktion nicht beeinflusst ist, konnten im cotranslationalen Transport Defekte für Preprolactin, Renin und im Fall der V67G auch

Uromodulin beobachtet werden. Der Effekt des verringerten Renin-Transportes setzt sich von der ER-Membran bis zur Sekretion fort, was durch eine verminderte extrazelluläre proteolytische Aktivität des Renins in den V67G- und T185A Mutanten nachgewiesen wurde.

6.2.12. ADTKD-Mutationen üben Signalsequenz spezifische Selektion aus

Im vorhergegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass der cotranslationale Transport von spezifischen Proteinen wie Renin, PPL oder in Teilen auch Uromodulin durch die Mutation des Sec61 α beeinflusst war. Es konnten keine Gemeinsamkeiten der reifen Proteine wie Glykosylierung oder Peptidlänge ausgemacht werden, die für die beeinflussten Substrate allein zutreffend wären. Daher sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob der Auslöser für den negativ beeinflussten Proteintransport die Signalsequenz ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden neue Transportsubstrate kloniert. Hierfür wurden Signalsequenzen von beeinflussten und nicht beeinflussten Substraten ausgetauscht (Abb. 56A). Als beeinflusstes Substrat wurde Renin (REN) ausgewählt und dessen Signalsequenz mit der des Apelin Proteins ausgetauscht (APE-REN), welches sich als nicht beeinflusst zeigte. Um einen negativen Effekt durch die potenziell determinierenden Signalsequenz zu verifizieren, wurde jene des bisher von den *SEC61A1*-Mutationen beeinflusste Apelin (APE) durch die Signalsequenz des negativ-beeinflussten Präprolactin Proteins ausgetauscht (PPL-APE). Somit wurden zwei Hybride generiert, deren Abhängigkeit von den *SEC61A1*-Mutationen unter cotranslationalen Bedingungen überprüft werden konnte.

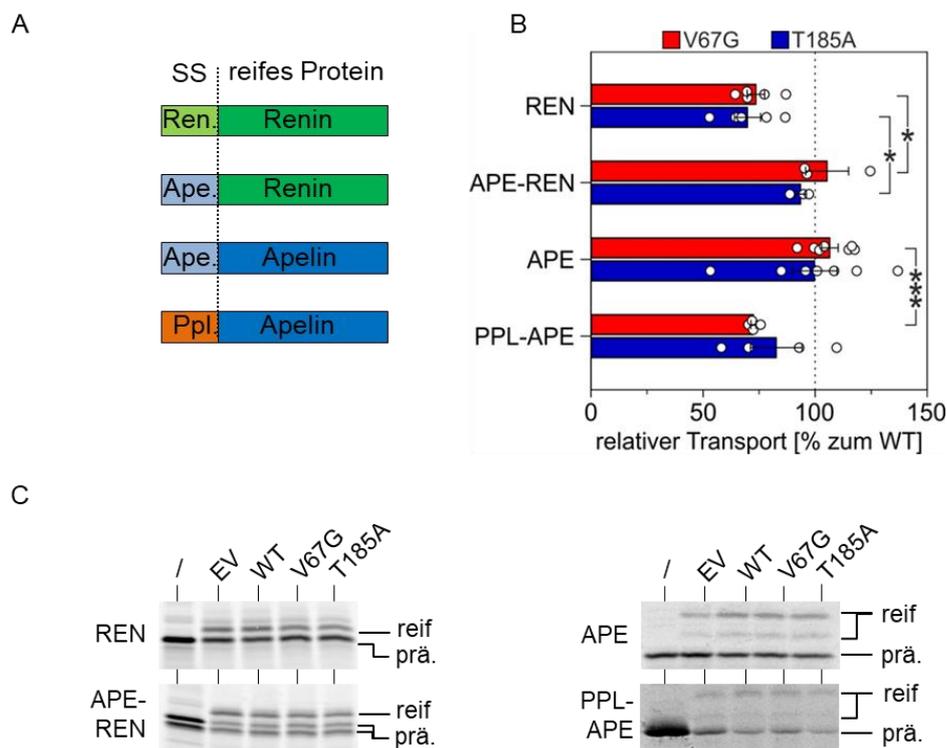


Abb. 56: Effekt des Signalsequenzaustausches auf den Transport in *SEC61A1*-mutierten ADTKD-HEK-Zellen. **A:** Durch den Austausch der Signalsequenzen verschiedener Proteine sollten negative Transporteffekte aufgehoben werden (APE-REN), bzw. generiert werden (PPL-APE). Zur Kontrolle werden die wildtypischen Sequenzen von REN und APE verwendet, die deren natürliche Signalsequenz beinhalten **B** und **C:** Die Transporteffizienz der verschiedenen Substrate wurde unter cotranslationalen Bedingungen überprüft. Die relative Transporteffizienz ist dargestellt im Vergleich zum Transport in Wildtypzellen. Es wurden SPZ aller Zelllinien präpariert, die dann als ER-Fraktion im Transport eingesetzt werden konnten. Nach dem *in vitro* Transport wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und autoradiographisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich durch eine Massenänderung durch Signalsequenzabspaltung und Glykosylierung des Renins ein erfolgreicher Transport in das ER. Vorläuferproteine sind durch prä. Gekennzeichnet, die transportierte, reife Form durch reif. Die Bestimmung der Transporteffizienz erfolgte durch die Bestimmung des Verhältnisses von reifem Protein und gesamt synthetisiertem Protein (prä. + reif). Die Ergebnisse wurden auf den WT bezogen. **B:** Der Transport der hybriden Transportsubstrate in beiden Zelllinien wurde ermittelt und statistisch ausgewertet. Zum Vergleich wurden die wildtypischen Transportsubstrate herangezogen. **C:** Repräsentative autoradiographische Darstellung eines Transportexperimentes der verschiedenen hybriden Transportsubstrate und den entsprechenden wildtypischen Kontrollen. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way ANOVA* und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum natürlichen Substrat. Erstellt wurde der Datensatz mit der Unterstützung von Monika Lerner.

Durch den Austausch der Signalsequenzen konnte gezeigt werden, welchen Einfluss diese auf den Transport in den ADTKD-assoziierten Zellen haben. Durch den Austausch der Signalsequenz von Renin mit der des Apelin-Proteins, konnte der negative Transporteffekt auf das Renin ausgeglichen werden und der Transporteffizienz von Wildtypzellen angenähert werden. Gleichzeitig konnte auch ein Effekt in die Gegenrichtung hervorgerufen werden. Das wildtypische Apelin, welches sowohl unter post- als auch cotranslationalen Bedingungen keine negative Beeinflussung durch die Mutationen des *SAC61A1* zeigte, wurde durch einen Austausch der eigenen Signalsequenz durch die PPL-Signalsequenz in der Transporteffizienz negativ beeinflusst. Hierbei wurden eine Transporteffizienzen von 75 % der in V67G- und

80 % in T185A-Zellen erreicht. Das PPL-APE-Konstrukt stellte sich als nicht so stark negativ beeinflusst heraus wie das wildtypische PPL (Abb. 54C).

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Beeinflussung des Transportes durch die Mutation selektiv auf Signalsequenzen basieren könnte, da gezeigt werden konnte, dass die Transporteffizienz durch den Austausch von Signalsequenzen modulierbar ist, sowohl in positive als auch in negative Richtung.

6.2.13. Verbesserung des Transportes in Anwesenheit von 4-PBA

Basierend auf den Beobachtungen, die in den RTCA und *live-cell calcium imaging* Experimenten gemacht wurden, war es die Überlegung, ob 4-PBA auch im *in vitro* Transport einen Effekt auf die Transporteffizienz von beeinflussten Substraten ausüben kann. Während im RTCA beobachtet werden konnte, dass die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von 4-PBA einen Zellindex-steigernden Effekt auf die Zellen hatten (Kap. 6.2.8), konnte im *live-cell calcium imaging* gezeigt werden, dass die kurzzeitige Behandlung mit 4-PBA einen verstärkenden Einfluss auf den Sec61-vermittelten Calciumleak hat (Kap. 6.2.9). Ebenso war ein Langzeiteffekt nach 36 Stunden Behandlung auf die Speicherkapazität des Gesamtcalciums der Zellen zu beobachten (Kap. 6.2.9).

Aus diesem Grund wurde zu den *in vitro* Transporten, die identisch zu den im vorherigen Kapitel beschriebenen Vorgehen durchgeführt wurden, während des Transportes 1 mM 4-PBA zugegeben, bzw. Wasser als Lösemittelkontrolle. Als Transportsubstrat wurde das Renin Protein ausgewählt, zum einen, weil es spezifisch für die HEK-Zellen und die Krankheit ADTKD ist, zum anderen, weil es in beiden mutierten Zelllinien ein um ca. 50 % reduzierte Transporteffizienz zeigte. Die Ergebnisse des Experimentes sind in der nachfolgenden Abb. 57 dargestellt.

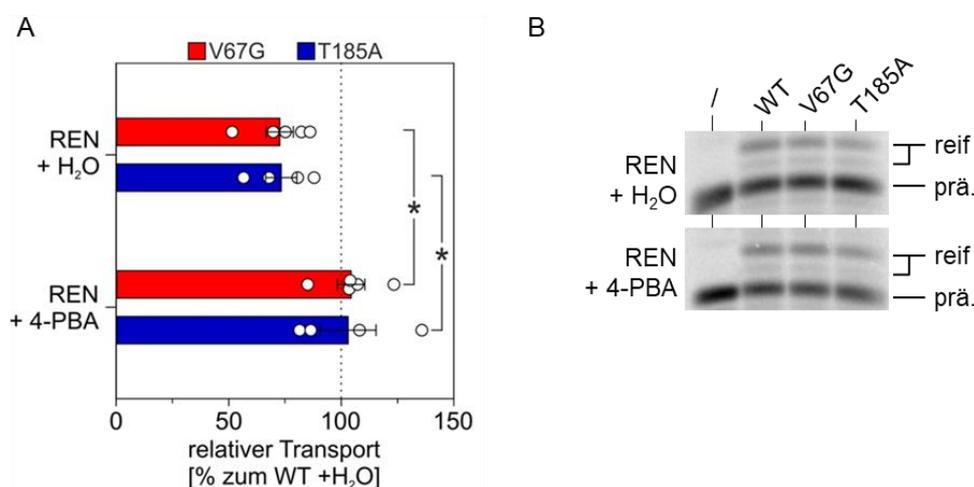


Abb. 57: Proteintransport des Renin-Proteins beeinflusst durch 4-PBA in V67G und T185A Zellen. Die relative Transporteffizienz ist dargestellt im Vergleich zum Transport in Wildtypzellen. Es wurden

SPZ aller Zelllinien präpariert, die dann als ER Fraktion im Transport eingesetzt werden konnten. Dem Transportansatz wurde zusätzlich 4-PBA in einer Konzentration von 1 mM zugegeben, bzw. die entsprechende Menge Wasser als Lösemittelkontrolle. Nach dem *in vitro* Transport wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und autoradiographisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich durch eine Massenänderung durch Signalsequenzabspaltung und Glykosylierung des Renins ein erfolgreicher Transport in das ER. Vorläuferproteine sind durch prä. gekennzeichnet, die transportierte, reife Form durch reif. Die Bestimmung der Transporteffizienz erfolgte durch die Bestimmung des Verhältnisses von reifem Protein und gesamt synthetisiertem Protein (prä. + reif). Die Ergebnisse wurden auf den WT bezogen. **A:** Der Transport von Renin in beiden Zelllinien unter Einfluss von Wasser als Lösemittelkontrolle oder 4-PBA als chemisches Chaperon wurde ermittelt und statistisch ausgewertet. **B:** Repräsentative autoradiographische Darstellung eines Transportexperimentes von Renin unter den verschiedenen Bedingungen. Statistische Analysen wurden mittels *One-Way* ANOVA und *Post-hoc* Test durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzniveaus beschreiben die quantifizierten Unterschiede zum H₂O behandelten Wildtyp. Erstellt wurden der Datensatz mit der Unterstützung von Monika Lerner.

Aus den Experimenten resultiert, dass 4-PBA eine unmittelbare Wirkung auf den Transport zeigt, so wie es auch in den *live-cell calcium imaging*-Versuchen bei der Betrachtung des Sec61 vermittelten *leak* zu beobachten war (Abb. 50). Wiederum konnte eine geringere Transporteffizienz für Renin in beiden Mutanten beobachtet werden, wenn H₂O als Lösemittelkontrolle zum Transportansatz gegeben wurde. Wenn jedoch 1 mM 4-PBA zu den Zellen gegeben wurde, konnte die Transporteffizienz auf das Niveau der WT-Zellen angehoben werden. In beiden Fällen wurde eine relative Transporteffizienz von ca. 100 % erreicht.

Daher lässt sich sagen, dass 4-PBA als chemisches Chaperon nicht nur einen Einfluss auf die Calciumhomöostase und das Zellwachstum im Allgemeinen ausübt, sondern ebenso den Sec61 α vermittelten Proteintransport positiv beeinflusst. 4-PBA ermöglicht es somit, mehrere der beobachteten Effekte, die dem pathologischen Phänotyp zugrunde liegen, im positiven Sinne zu modulieren.

6.3. Modellierung der Interaktion zwischen Sec61 α und 4-PBA

Bisherige Ergebnisse lassen darauf schließen, dass 4-PBA in unterschiedlichster Form einen Einfluss auf die Calciumhomöostase und den Proteintransport ausübt. Durch die Eigenschaften als chemisches Chaperon kann es an Proteine binden und diese in einem Transport und Faltungskompetenten Zustand erhalten. In diesem Kontext war es fraglich, ob 4-PBA ebenfalls mit Sec61 α interagiert, weswegen eine Modellierung dieser beiden Komponenten erfolgte. Diese wurde am Institut für Bioinformatik an der Universität des Saarlandes durchgeführt von Dr. Pratiti Bhadra in der Arbeitsgruppe von Prof. Volkhard Helms. Die Modellierung erfolgte als Molekulares Docking zwischen Sec61 α in der offenen Konformation und 4-PBA. Hierbei zeigte sich, dass 4-PBA mittels Wasserstoffbrücken der Sauerstoffatome und hydrophoben Interaktionen vorrangig an zwei Stellen des offenen Kanals interagiert. Die erste Stelle ist im zytosolischen Kanalteil Sec61 α , an der TMD 6. Die Affinität beträgt an dieser Stelle $-5,7 \pm 0,02 \text{ kcal/mol}$. Eine ähnliche Affinität, von $-5,3 \pm 0,02 \text{ kcal/mol}$, wurde für die zweite Bindestelle in der Nähe des *plug* berechnet im ersten Loop des Proteins.

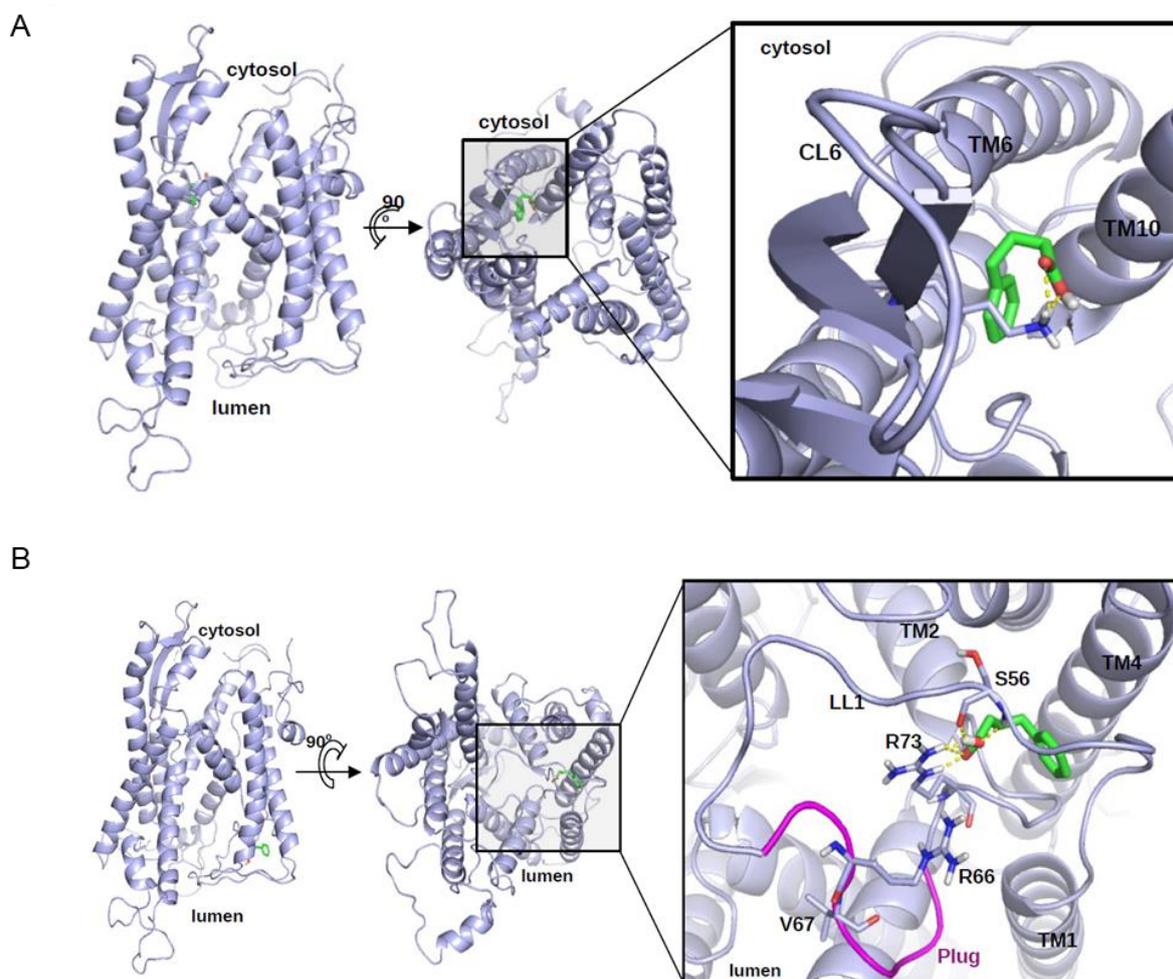


Abb. 58: Docking Simulation zwischen dem offenen Sec61 α -Protein und 4-PBA. Durch die Sauerstoffatome des 4-PBA entstehen Wasserstoffbrücken die eine Interaktion zwischen den zwei Komponenten ermöglichen, genau wie durch hydrophobe Wechselwirkungen. **A:** Die Interaktion zwischen 4-PBA und der TMD 6 wird dargestellt. **B:** Dargestellt ist die Interaktion zwischen 4-PBA und der *plug* Domäne. In beiden Abbildungen sind die jeweiligen Aminosäuren eingetragen, mit denen 4-PBA am stärksten interagiert. Durchgeführt wurden mehrere Simulationen nach dem Lamarckian Algorithmus (Morris et al. 2009). Die dargestellten Plots wurden mithilfe von PyMol1.8 generiert (DeLano 2002). Durchgeführt wurden die Simulationen und deren Auswertung von Dr. Pratiti Bhadra. Diese wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Ergebnisse der Docking Simulation zeigten dementsprechend zwei Interaktionspunkte zwischen Sec61 α in der offenen Konformation und 4-PBA. Diese sind zum einen an der TMD 6 und in der Nähe der *plug* Domäne, in der auch die Mutation V67G lokalisiert ist.

7. Diskussion

Die zentralen Aspekte der Arbeit, die Identifizierung bis dato unbekannter Komponenten des humanen SND Transportweges und der biochemischen Charakterisierung der ADTKD-assoziierten Mutanten *SEC61A1-V67G* und *SEC61A1-T185A*, wurden mit Hilfe unterschiedlicher Methoden bearbeitet. Der Nachweis von Proteininteraktion wurde sowohl über klassische Co-IP Ansätze, sowie mit Hilfe von Techniken untersucht, die diese Interaktion in lebenden Zellen bestätigen sollen. Der *in vitro* Transport, sowie das *live-cell calcium imaging* wurden verwendet, da beide Techniken einen Einblick in die zentralen Funktionen des Sec61 α , den Transport von neu synthetisierten Proteinen in das ER und den Sec61-vermittelten Calciumleak, ermöglichen (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2017). Durch die Etablierung der entsprechenden Techniken, bzw. Messprotokolle, konnte das Wissen in beiden Themenfeldern erweitert werden.

7.1. Topologie des hSnd2-Proteins in der ER-Membran

Der SND-Transportweg wird in der Hefe als ein Transportweg beschrieben, der aus drei Proteinen aufgebaut ist. Das Protein Snd1 ist an das Ribosom angelagert, Snd2 und Snd3 bilden einen Komplex in der Membran des ERs (Aviram et al. 2016; Fleischer et al. 2006). Im humanen System ist dieser Transportweg bisher unvollständig untersucht. Die bisher einzige bekannte Komponente ist hSnd2, das ebenfalls in der ER-Membran vorliegt und, ähnlich wie in der Hefe, funktionelle Überschneidungen und Ergänzungen zu den anderen Transportwegen darstellt (Aviram et al. 2016; Casson et al. 2017; Haßdenteufel et al. 2017). Dessen Partner in der Membran ist allerdings noch nicht beschrieben, was ein Ziel dieser Arbeit war. Für das Verständnis der Funktionsweise von hSnd2 als Interaktionspartner, sowie im weiteren Verlauf diskutierte Experimente war es grundlegend die Topologie des Proteins in der Membran zu kennen. Hier ergaben die Literaturrecherche und die Vorhersage mittels verschiedener Programme kein einheitliches Bild. Es werden Strukturen angenommen, die entweder auf drei oder vier TMD basieren, mit der Folge, dass der C-Terminus des Proteins entweder zytosolisch oder luminal lokalisiert ist. Der N-Terminus ist unabhängig davon in jedem Fall als zytosolisch lokalisiert vorhergesagt (Abb. 23). Aus diesem Grund wurde sich dieser Frage experimentell genähert (Kapitel 6.1.5). Hierbei zeigte sowohl die Detektion des C-Terminus im Verlauf einer Sequestrierung, als auch das Ausbleiben von Glykosylierungen *in vitro* und *in vivo*, dass der C-Terminus nicht im Lumen lokalisiert ist. Identisches konnte durch die Verwendung von Rauhen Mikrosomen aus Hundepankreas für einen anderen Organismus gezeigt werden. Da beide Experimente auf dem „Ausbleiben einer Bande“ also der nicht erfolgten Glykosylierung oder dem Abbau des C-Terminus beruhen, ist dies noch kein finaler Beweis auf die Lokalisierung des C-Terminus im Zytosol, sondern nur dass er nicht im Lumen liegt. Dieser Beweis wird jedoch durch die Verwendung des NanoBiT-Assays geliefert (Abb. 31). Hier konnte durch die an die Termini des Proteins angehängten LgBiT nur

eine Komplementation erreicht werden, wenn der Terminus der entsprechenden Partnerproteine, deren Topologie in der Literatur aufgeklärt ist, ebenfalls zytosolisch lokalisiert sind. Hier ist beispielhaft die Interaktion zwischen C-Terminus des hSnd2 und dem C Terminus von Sec61 α zu nennen. Die verwendeten Konstrukte von N_S-Sec63 und Sec61 β -C_L hätten Interaktionen auf luminaler Seite anzeigen können, wenn der C-Terminus von hSnd2 luminal lokalisiert wäre, zeigen diese jedoch nicht an. Gleiches gilt für den N-Terminus, der nicht experimentell in Sequestrierungsstudien adressiert wurde. Dieser Terminus wird in allen Studien gleich vorhergesagt und es konnten zusätzlich räumliche Colokalisationen mit zytosolischen Komponenten (Sec63, Sec61 α Abb. 31) gezeigt werden, die auf eine zytosolische Lokalisierung schließen lassen.

Gegen die Annahme, dass der C-Terminus von hSnd2 im Zytosol vorliegt, spricht die Studie von Lei et al. aus dem Jahr 2020. Hier wurde ebenfalls mit dem NanoBiT-System die Interaktion zwischen hSnd2 und β -Actin untersucht. Es zeigte sich, dass der N Terminus von hSnd2 mit β -Actin interagiert, der C-Terminus jedoch nicht. Dies ließ die Autoren zu dem Schluss kommen, dass der C-Terminus luminal lokalisiert ist. Eine Bestätigung der Interaktion auf luminaler Seite durch das verwendete Kontrollprotein P4HTM wurde jedoch nicht demonstriert. Das in dieser Publikation beobachtete Phänomen stellt möglicherweise auch gleichzeitig eine Schwäche des NanoBiT Systems dar. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, agieren nicht alle Nachweiskombinationen zwischen zwei Proteinen mit derselben Effektivität (Abb. 29) auch wenn sie spiegelbildlich zueinander konstruiert sind. Was bedeutet, dass eine der drei nicht gezeigten Interaktionen des C-Terminus von hSnd2 mit β -Actin möglicherweise zu einem Signal geführt hätte (Lei et al. 2020).

Das hSnd2-Ortholog in der Hefe, Snd2, wird mittels der in Abb. 23 verwendeten Software ebenfalls mit vier TMD vorhergesagt. Auffällig ist hier ebenfalls die Sequenzübereinstimmung an dem C-Terminus mit einem PRQM(R/K)R-Motiv (Haßdenteufel et al. 2017). Eine identische Lokalisation dieses positiv geladenen Motivs würde für die identische Funktion des Proteins in der Hefe und im humanen System durchaus Sinn machen, da die Ladung im Motiv ein entscheidender Faktor für transiente oder konstante Interaktionen sein könnte (Guseman et al. 2018).

Insgesamt überwiegen dementsprechend die Hinweise, dass der C-Terminus des hSnd2 im Zytosol liegt, hSnd2 also ein Membranprotein mit vier TMD darstellt. Für den weiteren Verlauf der Diskussion wird diese Topologie angenommen.

7.2. Verifikation des NanoBiT-Systems für membranständige Proteine

Für den Nachweis der Interaktion zwischen hSnd2 und TMEM109 wurde ein System genutzt, welches auf der Komplementation einer Luciferase beruht, das sogenannte NanoBit System

der Firma Promega. Durch das Anbringen von Reporterstrukturen an die Termini der jeweiligen Proteine von Interesse, können diese miteinander interagieren, wenn die Trägerproteine in räumlicher Nähe zueinander vorkommen. Das große Teilprotein einer Luciferase (LgBiT) wird durch ein in räumlicher Nähe befindliches kleines Teilprotein (SmBiT) ergänzt, wodurch eine funktionale Luciferase entsteht, die durch die Umsetzung von Furimazine ein Lichtsignal generiert (Dixon et al. 2016). Dieses Lichtsignal kann quantifiziert werden. In der Literatur sind zum jetzigen Zeitpunkt nur einzelne Studien bekannt, die das NanoBiT System nutzen, um Proteininteraktionen zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, die in einer intrazellulären Membran lagern. Diese beziehen sich auf Proteine des Golgi (Wiertelak et al. 2020) oder der Plasmamembranen (O'Neill & Knaus 2019). Daten aus der Literatur zu Interaktionen innerhalb der ER-Membran sind bis dato nicht bekannt. Daher ist es in diesem Fall essenziell das System zu verifizieren und dessen Grenzen zu bestimmen.

Sobald das Klonierungssystem etabliert war, konnte durch die Insertion von den gewünschten Proteinen in die Standardvektoren des Systems relativ einfach erweitert und zu einer „NanoBiT-Bibliothek“ ausgebaut werden. Die Synthese der modifizierten Proteine basierend auf den Plasmiden erfolgte in der Regel zuverlässig und in dem erwartbaren Maße. Die immunologischen Analysen mit Antikörpern gegen die markierte Proteine, erlauben die Feststellung, dass die Expression getrieben durch den HSV-TK Promotor in einer geringen Proteinabundanz resultierten. Dies ist von Vorteil, da so Interaktionen durch die Überexpression eines Proteins verhindert werden sollten. Dass die Expression durch den Vektor in allen Fällen vergleichbar ist, konnte ebenfalls mit Hilfe des Assays selbst verifiziert werden (Abb. 35A). Hier zeigte nur Sec61 α -C_L eine deutlich geringere Abundanz, die dennoch ausreichend war, um schwache Proteininteraktionen nachzuweisen (Abb. 31A und C). Die teilweise hohe Schwankung zwischen den Ergebnissen einzelner Experimente könnte mit der Anzahl der Passagierungen der HeLa-Zellen im Zusammenhang stehen oder, mit Unregelmäßigkeiten in der Plasmidtransfektion und biologischer Variabilität. Ebenfalls auffällig in dieser Analyse ist Sec61 β -C_L. Dieses zeigte die höchste Abundanz unter den im Rahmen der Arbeit generierten ER-Membran-Konstrukten, wobei der geringste Effekt durch die Komplementation nach der Zugabe des artifiziellen SmBiT-Peptides zu erwarten gewesen wäre. Die Überlegung beruht darauf, dass der C-Terminus von Sec61 β im ER-Lumen liegt, da es sich bei dem Protein um ein TA-Protein handelt (Abell et al. 2004; Raden et al. 2000). Da die Digitonin-Behandlung der Zelle vornehmlich die Plasmamembran permeabilisiert, sollte das Peptid nur in einem geringen Maße durch die Membran des ERs gelangen und zu einer Komplementation führen (Frenkel et al. 2014; Litvinov et al. 2018). Es lässt sich vermuten, dass der Übergang des Peptids über die ER-Membran ähnlich ineffektiv verläuft wie über die nicht-permeabilisierte Plasmamembran, was in Abb. 13A gezeigt wurde und damit die Komplementation des Sec61 β -C_L nur im geringen Maße erfolgen sollte. Diese ist jedoch im

Vergleich zu den anderen ER-Membran Proteinen stärker. Daraus folgt die Vermutung, dass ein Teil der Sec61 β -C_L-Proteine nicht korrekt in die Membran integriert wurde. Es konnte bereits beobachtet werden, dass ein C-Terminal verlängertes Sec61 β nicht auf dem typischen posttranslationalen Transportweg zum ER geführt wird, sondern cotranslational, was durch das Anfügen des LgBiTs hier der Fall sein könnte. (Stefanovic & Hegde 2007). Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass durch die Veränderung der TMD eines TA-Proteins Misslokalisierungen ebenjenes folgen, was die sensible Positionsregulierung dieser Proteine ebenfalls betont (Borgese et al. 2003). Dies und die Beobachtung, dass die Menge des identifizierten Sec61 β -C_L im Vergleich zu den anderen im Rahmen der Arbeit generierten Konstrukte am höchsten ist, führt zu der Vermutung, dass ein Teil der synthetisierten Sec61 β -C_L zytosolisch lokalisiert sein könnten, wodurch eine bessere Zugänglichkeit durch das SmBiT Peptid erreicht wird, ähnlich dem Kontrollpeptid des NanoBiT-Systems. Gleichzeitig muss beachtet werden, dass es sich bei den applizierten Proteinen um kurze Aminosäuresequenzen handelt. Für diese besteht die Möglichkeit über die sogenannten TAP-Transporter (*transporter associated with antigen procesing*) welcher Peptide von einer Länge bis zu 16 Aminosäuren in das ER überführt (Ritz & Seliger 2001). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass die Peptide aktiv in das ER überführt werden und auch dort eine Komplementation des LgBiTs auslösen. Dass dennoch ein Teil des synthetisierten Sec61 β -C_L korrekt in die Membran inseriert wurde, zeigt dessen Interaktionsmuster. Während keine Interaktionen auf zytosolischer Seite gemessen werden konnten, konnte eine Interaktion mit dem N-Terminus von Sec63 nachgewiesen werden (Abb. 31), der ebenfalls luminal lokalisiert ist (Linxweiler et al. 2017). Durch die Bestätigung weiterer aus der Literatur bekannter Interaktionen, wurde die Funktionalität des Systems weiterhin untermauert. Es wurde gezeigt, dass Sec61 α mit Sec63 in lebenden Zellen interagiert (Meyer et al. 2000a). Die Interaktionen zwischen Sec61 α und den Proteinen TRAP α und TRAP β , sowie die Interaktionen dieser beiden Proteinen untereinander, als Teil des TRAP-Komplexes, wurden ebenso bestätigt (Pfeffer et al. 2017; Pfeffer et al. 2016). Die Multimerisierung des TMEM109 Proteins erwies sich ebenfalls als nachweisbar (Venturi et al. 2011).

Der in Abb. 14 B und D gezeigte Versuch, der ebenfalls auf der Komplementation mittels des synthetischen Peptides beruht, zeigt einen weiteren Vorteil des Systems auf eine einfache, aber eindrucksvolle Weise. Durch die Titration des SmBiT-Peptides von 1-100 μ M finaler Konzentration konnte ein proportional stärkeres Signal generiert werden. Dieses resultierte auch in der höchsten Konzentration nicht in der Intensität eines Nachweises zwischen zwei real miteinander interagierenden Proteinen. Im Vergleich zu β -Actin, welches für die Western Blots als Ladekontrolle und hier als Kontrollpeptid genutzt wurde (Abb. 34, Abb. 35) und mit einer relativ hohen Konzentration von 1,7 μ M in der Zelle vorliegt, ist eine 50 fach höhere Konzentration des SmBiT-Peptides (100 μ M) eine enorme Menge (Hein et al. 2015). Dies zeigt

deutlich, dass die gemessenen Lichtsignale, auf denen die Analysen und Ergebnisse in Abb. 31 beruhen, nicht zufällig sind, oder aus der reinen Interaktion zwischen SmBiT und LgBiT getrieben sind. Die Interaktion erfolgt nur, wenn die Proteine gezielt zueinander gebracht werden, durch die nahe räumliche Lokalisation der Trägerproteine. Dies bestätigt die geringe Bindungsaffinität der beiden Luciferaseeinheiten die vom Hersteller angegeben wird. Zusätzlich wurde ein affineres Peptid (HaBiT) verwendet, welches eine vergleichbare Signalintensität zeigte, trotz einer 10.000-fach geringeren Menge des Peptides im Vergleich zum SmBiT-Peptid. Dementsprechend wurden mit diesem Peptid beim Nachweis der Konstrukte höhere relative Lichtmengen detektiert.

Die Sensitivität des Assays lässt sich ebenfalls anhand der gezeigten Interaktion zwischen Sec61 α und Sec61 β bestätigen. Hier zeigte sich anhand der starken Interaktion der Reporterproteine, dass eine geringe Distanz zwischen dem Sec61 α -N_L und dem N_S-Sec61 β Konstrukt liegt. Gleichzeitig wurde keine Komplementation der Luciferase durch Sec61 α -C_L und N_S-Sec61 β erreicht. Dies kann durch die Strukturen des Sec61-Translokons erklärt werden. In den Strukturmodellen wird deutlich (Abb. 59A), dass der N-Terminus des Sec61 α näher an dem N-Terminus von Sec61 β liegt (Voorhees et al. 2014; Voorhees & Hegde 2016a). Anhand weiterer räumlicher Strukturdaten lassen sich die gemessenen Intensitäten weiterer Verbindungen ebenfalls erklären. Hier ist insbesondere die Interaktion vom Sec63 mit unterschiedlichen Untereinheiten des Sec61-Komplexes zu nennen. Während auf luminaler Seite Sec61 β eine sehr starke Interaktion zeigte, konnte eine weitere starke Interaktion auf zytosolischer Seite mit dem N-Terminus des Sec61 α nachgewiesen werden. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass der luminaire N-Terminus des Sec63 mit einem Bereich der TMD 3 des Sec61 α -Proteins interagiert, zu dem benachbart das Sec61 β -Protein liegt (Itskanov et al. 2021; Itskanov & Park 2019). Eine weitere Erklärung für diese Interaktion, sowie die Interaktion zwischen dem C-Terminus des Sec63 und dem N-Terminus des Sec61 α Proteins selbst konnte eine andere Studie aus der Hefe aus dem Jahre 2018 liefern. Dort wurde ebenfalls gezeigt, dass Aminosäuren der TMD 3 von Sec63 mit der TMD 1 von Sec61 α interagiert, und zusätzlich die Interaktion mit den TMD der Hefeorthologe von Sec61 β und Sec61 γ (Wu et al. 2019). Funktionell ist diese Verbindung vor allem für den Transport von Membranproteinen entscheidend, da durch die Interaktion mit Sec62/63 in der Hefe das *lateral gate* geöffnet wird (Bhadra et al. 2021; Itskanov et al. 2021). Im humanen System konnte ebenfalls eine Bindung zwischen dem Sec62/63-Komplex und dem Ribosom für den cotranslationalen Transport nachgewiesen werden, deren Bestätigung durch das NanoBiT-System noch aussteht (Müller et al. 2010).

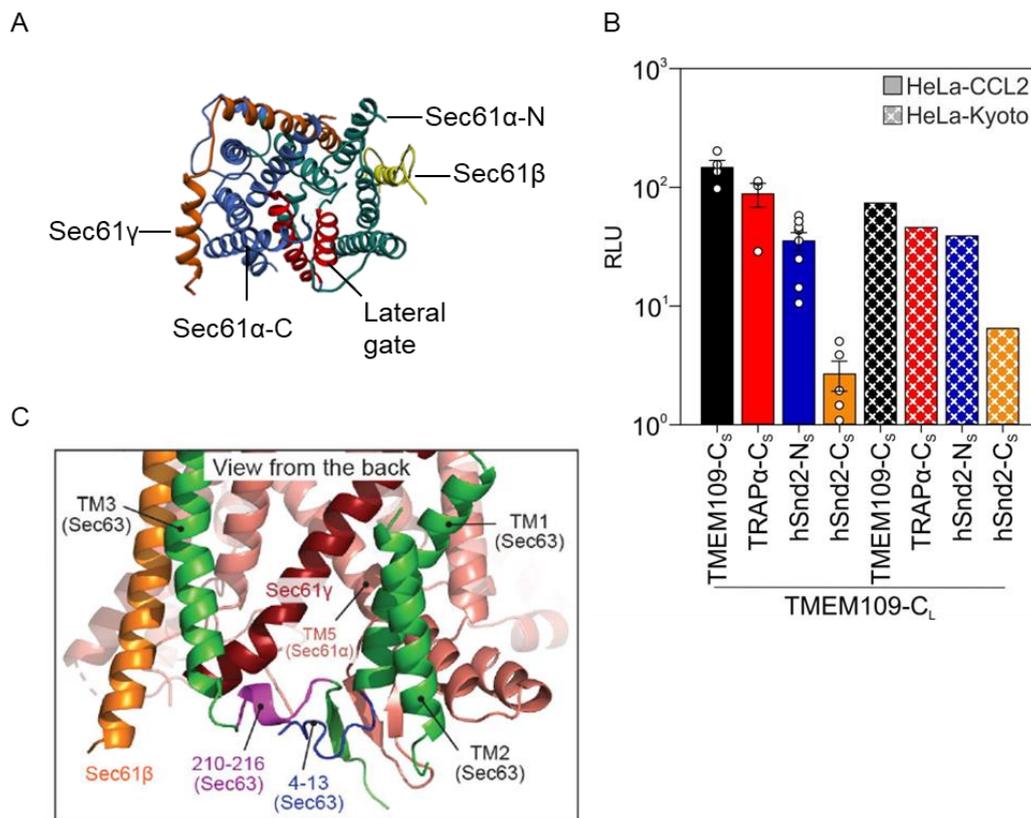


Abb. 59: Übertragung der NanoBiT-Ergebnisse auf Strukturdaten und Vergleichbarkeit des Systems in alternativen HeLa-Zellen. **A:** Strukturmodell des trimeren Sec61-Komplexes. Der letzte Teil des nachgewiesenen N-Terminus des Sec61β (gelb) liegt nahe dem N-Terminus des Sec61α, was die starke Interaktion dieses Terminus im Vergleich zum Sec61α-C-Terminus erklärt. Die Abbildung wurde abgeändert nach (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2017; Sicking et al. 2021). **B:** Die Interaktionsstudien wurden zusätzlich zu den standardmäßig verwendeten HeLa-CCL2-Zellen einmal in HeLa-Kyoto-Zellen auf identische Weise durchgeführt (Kap. 5.2.9). Die Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Juniorprof. Bianca Schrul, UdS, Homburg. Es wurde die Kombination aus dem TMEM109-C_L Konstrukt mit verschiedenen interagierenden und einem nicht-interagierenden weiteren Konstrukt vermessen. **C:** Strukturmodell des geschlossenen Sec61-Komplexes der Hefe. Die nah zueinander liegenden Sec61β-C Terminus und Sec63 N-Terminus sind unterstrichen. Diese Interaktion konnte durch das NanoBiT-System ebenfalls sehr effektiv nachgewiesen werden. Abbildungsteil C: Reprinted by permission from Springer Nature; nature structural & molecular biology; Stepwise gating of the Sec61 protein-conducting channel by Sec63 and Sec62, Samuel Itskanov et al. © 2021.

In einem ersten Test zeigte der experimentelle Aufbau Ergebnisse mit einer gleichen Tendenz in HeLa-Zellen, die dem Typ Kyoto entsprachen (Abb. 59B). Da diese Zellen, obwohl sie alle als HeLa-Zellen in der Literatur geführt werden, dennoch teils große Unterschiede aufweisen, ist das Ergebnis ebenfalls als positiv zu bewerten (Liu et al. 2019b). Dass nicht die identischen absoluten Werte erreicht werden, ist mit den in der Literatur beschriebenen Unterschieden zu erklären, sowie mit der geringen Anzahl der Experimente. Die Aussage jedoch, ob eine Interaktion vorliegt oder nicht, ist in beiden Zelllinien bisher identisch.

Durch die Bestätigung mehrere Proteininteraktionen innerhalb von Komplexen (TRAP Abb. 26 und Sec61 Abb. 27) aber auch zwischen diesen (Abb. 28, Abb. 31) stellt das NanoBiT-System eine Erweiterung der bisherigen Interaktionsstudien dar, allerdings in vitalen Zellen, wodurch

diese ebenfalls manipulierbar sind. Es konnte gezeigt werden, dass das System auf ER-Membranproteine anwendbar ist und es ermöglichte, nach der Erstellung einer Plasmidbibliothek, bereits bekannte Interaktionen zu bestätigen und neue zu identifizieren. Hierbei ist sowohl der Nachweis von Homomultimeren als auch der Nachweis von heterogenen Proteininteraktionen möglich. Die Expressionskontrolle der SmBiT Konstrukte durch die Verwendung mehrerer Antikörper war nicht in jedem Fall erfolgreich, durch den Einsatz von Peptiden wurden jedoch alle LgBiT-Konstrukte nachgewiesen.

7.3. Interaktionspartner des hSnd2-Proteins im Proteintargetingweg

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit rund um den SND-Transportweg in humanen Zellen war es, einen Interaktionspartner von hSnd2 zu identifizieren, der dieses Protein in der ER-Membran ergänzen könnte, ähnlich wie es bei Snd2 und Snd3 in der Hefe der Fall ist. Zu diesem Zweck wurden Co-IPs angewendet, um einen Interaktionspartner zu identifizieren, und diese mittels des NanoBiT-Systems in lebenden Zellen zu verifizieren. Durch die Co-IP wurde das Protein TMEM109, oder auch Mitsugumin 23 genannt, als ein Interaktionspartner von hSnd2 identifiziert (Kapitel 6.1.1 und 6.1.2). Diese Interaktion konnte ausgehend von beiden Proteinen nachgewiesen werden (Kapitel 6.1.3). Des Weiteren konnte in den Folgeexperimenten gezeigt werden, dass TMEM109 und hSnd2 in lebenden Zellen in räumlicher direkter Nähe am Translokon lokalisiert sind (Abb. 29). Auf der Basis, dass TMEM109 als Interaktionspartner von hSnd2 verifiziert wurde, stellt sich nun die Frage, ob TMEM109 funktionell geeignet ist, um den SND-Transportweg in humanen Zellen zu ergänzen.

In der Literatur werden für TMEM109, welches in der ER-Membran und der äußeren nukleären Membran lokalisiert ist, verschiedene Funktionen vermutet (Nishi et al. 1998). Es werden unter anderem Assoziationen zu Krebserkrankungen beschrieben, bei denen TMEM109 als Markerprotein identifiziert wurde, aber auch als ein Regulator der Reaktion der Zelle auf beschädigte DNA, während die UPR von TMEM109 unbeeinflusst zu sein scheint. (Kunitomi et al. 2020; Takenami et al. 2019; Yamashita et al. 2013; Yamazaki et al. 2010). Einen zentralen Anteil für die Funktionalität des Proteins nimmt der C-Terminus ein. Dieser ermöglicht die Interaktionen mit anderen Proteinen wie zum Beispiel dem Chaperon Alpha-B Crystallin und die Ausbildung eines Homohexamers (Takeshima et al. 2015; Venturi et al. 2011; Yamashita et al. 2013). Diese Bildung des Homomultimers, die ebenfalls durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente per Co-IP und in lebenden Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 20B und Abb. 29D) führt dazu, dass ein spannungsgesteuerter Kanal in der Membran gebildet wird, der unselektiv sowohl für K^+ als auch Ca^{2+} Ionen passierbar ist und vermutlich so einen Anteil des permanenten Calciumleaks einnimmt. Was diese

Assemblierung des Kanals auslöst, dessen Formation als instabil beschrieben ist, ist bisher nicht bekannt (Reilly-O'Donnell et al. 2017; Takeshima et al. 2015; Venturi et al. 2011).

Dass TMEM109 als Ergänzung zum hSnd2 dabei nicht die identischen Eigenschaften wie das Snd3-Protein in der Hefe aufweist, ist nicht weiter verwunderlich. Durch die PPod-Vorhersage, mittels derer hSnd2 als Ortholog zu Snd2 bestimmt wurde, wurde für Snd3 kein Ortholog im humanen System identifiziert, gleichzeitig für TMEM109 kein entsprechendes Pendant in der Hefe (Heinicke et al. 2007). Übereinstimmungen zwischen der Aminosäuresequenz oder der Nukleotidsequenz von TMEM109 bestehen ebenfalls nicht zu *S. cerevisiae* (Altschul et al. 1997; Altschul et al. 2005). Die einzige Gemeinsamkeit der beiden Proteine Snd3 und TMEM109 ist die duale Lokalisation sowohl in der Membran des ERs als auch in der nukleären Membran (Nishi et al. 1998; Tosal-Castano et al. 2021). Eine strukturelle sowie funktionelle Übereinstimmung zu Snd3 ist jedoch auch nicht grundlegend dafür, dass TMEM109 als Teil des humanen SND-Transportweges gelten kann. Die Komposition des Translokons selbst ist im Vergleich zwischen *Homo sapiens* und *S. cerevisiae* bereits unterschiedlich. In der Hefe ist beispielsweise kein TRAP-Komplex bekannt, und sowohl der SPC-Komplex als auch der OST-Komplex sind unterschiedlich strukturiert (Dudek et al. 2015). Dennoch leisten diese Komplexe elementare Beiträge zum Transport und der funktionellen Reifung von Proteinen in den jeweiligen Systemen und werden als akzessorische Komponenten des Sec61-Kanals betrachtet (Cherepanova et al. 2016; Gemmer & Förster 2020; Nguyen et al. 2018). Einen Unterschied zwischen Hefe- und Säugerzellen spezifisch auf Komponenten eines Proteintargetingwegs, wie es auch SND einer ist, bezogen konnte für den GET-Targetingweg beschrieben werden. Während mehrere Proteinkomponenten des Transportweges Homologien zwischen den Organismen zeigen, sind GET2 (Hefe) und CAML (Säuger) als Teil des membranintegrierten Rezeptors in deren Sequenz deutlich unterschiedlich. Die Topologie und die mögliche Funktion des N-Terminus sind die einzigen übereinstimmenden Charakteristika (Borgese 2020; Vilardi et al. 2014; Wang et al. 2014). Gleiches gilt auch für das SRP ermittelte Proteintargeting, der großteilig konserviert ist, allerdings ist kein Homolog zu SR β in *E. coli* bekannt (Keenan et al. 2001; Pool 2005). Daher ist es nicht zwingend, dass das humane hSnd3 eine eins zu eins Kopie des Hefe Snd3-Proteins darstellt. TMEM109 und hSnd2 können ebenfalls als akzessorische Komponente des Translokons betrachtet werden. In der durchgeführten Co-IP konnte Sec61 β zusammen mit TMEM109 aufgereinigt werden (Abb. 21B), und in den NanoBit-Analysen eine Interaktion sowohl mit TRAP α und Sec61 α selbst gezeigt werden (Abb. 31A). Aus diesem Grund, und weil der bisher einzige bekannte Teil des humanen SND-Transportweges ein ähnliches Interaktionsmuster zu diesen Translokonskomponenten zeigt, ist TMEM109 durchaus als Teil des SND-Transportweges anzusehen.

Reep5, welches nur mittels Massenspektrometrie nach einer Co-IP mit hSnd2 identifiziert werden konnte (Abb. 18C) und nur eine sehr begrenzte Interaktion mit hSnd2-FLAG in einer gegenläufigen Co-IP zeigte (Abb. 22A), kann eher den Transportsubstraten zugeordnet werden. Durch dessen Struktur mit einer mittig liegenden TMD (Voeltz et al. 2006) stimmt es mit einer Definition der Transportsubstrate überein, die von Aviram et al. (2016) und Haßdenteufel et al. (2017) publiziert wurde. Dies würde auch die erfolglose Aufreinigung von hSnd2 erklären, wenn Reep5 als *bait* verwendet wurde (Abb. 22).

Des Weiteren wurde durch die durchgeführten Co-IPs suggeriert, dass hSnd2-Multimere in der Membran ausgebildet werden könnten. Bei der Verwendung von hSnd2-FLAG als *bait*, konnte das endogene hSnd2 in der Massenspektrometrie (Abb. 18) nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen konnten nicht im NanoBiT-System bestätigt werden, da die Ergebnisse dieser Versuche keine Hinweise auf einen Homomultimer lieferten (Abb. 31). Die Untersuchung dieser Fragestellung sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

7.4. Insertion von SND-abhängigen Substraten in die ER-Membran und die Struktur des Translokons in vitalen HeLa-Zellen

Bisher ist weder bekannt, welches Protein als Kanal, bzw. als Insertase für die SND abhängigen Substrate in der ER-Membran fungiert, noch ist abschließend definiert, welchem Transportmodus, ob co- oder posttranslational, der SND Transportweg folgt. Sowohl in der Hefe, als auch im humanen System sind Kompensationsmechanismen zwischen den verschiedenen Transportwegen beschrieben worden und auch die Interaktion mit verschiedenen Insertasen konnte nachgewiesen werden (Aviram et al. 2016; Casson et al. 2017; Haßdenteufel et al. 2017; Talbot et al. 2019; Yang et al. 2021). In der Literatur mehren sich jedoch die Hinweise, dass der SND-Transportweg den Sec61-Kanal als Weg in und über die ER-Membran für dessen Transportsubstrate nutzt. Eine Interaktion mit Proteinen des EMC-Komplexes konnte zwar gezeigt werden, eine gegenseitige funktionelle Einflussnahme jedoch nicht (Talbot et al. 2019). Die ebenfalls beschriebenen Interaktionen zwischen Sec61 α , sowie dessen akzessorischen Komponenten, und die Multimerisierung des hSnd2-Proteins (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017; Yang et al. 2021) konnten in dieser Arbeit sowohl durch die Co-IP (Abb. 18, Abb. 19), als auch durch die NanoBiT Experimente bestätigt werden (Abb. 30B, Abb. 31A). Wie hoch der Grad der Multimerisierung ist, kann anhand der in dieser Arbeit vorliegenden Daten sowie den aus der Literatur gewonnenen Daten nicht bestimmt werden. Es wäre ebenfalls möglich, dass es sich hierbei nicht um einen Multimer handelt, da auch Proteine aus benachbarten Komplexen miteinander interagieren könnten.

Da hSnd2 bisher in keinen strukturellen Daten über den Sec61-Komplex Erwähnung findet, könnte man davon ausgehen, dass es sich hierbei um eine transiente, bzw. schwache Interaktion handelt. Dies könnten die Interaktionswerte der NanoBiT-Studien ebenfalls belegen, die im Vergleich zu Intrakomplex-Verbindungen (TMEM109-TMEM109, Sec61 α -Sec61 β) geringer ausfallen. Was sich jedoch in den NanoBiT-Studien zeigte ist, dass sowohl TMEM109 als auch hSnd2 mit dem C-Terminus des Sec61 α -Proteins interagierten. Das in diesem Vergleich stärkste Signal zeigte sich jedoch zwischen Sec61 α -N_L und hSnd2-N_S. Der N-Terminus von hSnd2 zeigte generell eine höhere Tendenz, um Interaktionen anzuzeigen als der C-Terminus des hSnd2 Proteins, was auch für die Interaktionen von hSnd2 mit Komponenten des TRAP-Komplexes gilt. Dies hängt möglicherweise mit einem positiv geladenen Patch in der Nähe des C-Terminus zusammen, der durch diese Ladung möglicherweise hinderlich ist für Proteininteraktionen, könnte diese aber auch gleichzeitig ermöglichen, wie es bei Sec63/Sec62 der Fall ist (Haßdenteufel et al. 2017; Jung et al. 2014; Müller et al. 2010). Der Effekt hängt von der Ladung des jeweils betrachteten Interaktionspartners ab. Hier wäre Interessant ob keine Interaktion zwischen Sec62 und hSnd2 besteht, was zu erwarten wäre, da Sec62 am N-Terminus ebenfalls positive Ladungen aufweist, durch die es unter anderem mit Sec63 interagiert, welches ebenfalls assoziative Tendenzen zu hSnd2 zeigt (Abb. 31) (Müller et al. 2010).

Die Interaktionen von TMEM109 und hSnd2 mit der direkten Transportkomponente Sec61 α und dessen akzessorischen Faktoren (TRAP und Sec63) und im Zusammenhang mit den bisher identifizierten Transportsubstraten, kann somit die Aussage getroffen werden, dass der SND-Proteintargeting im humanen System zumindest zu einem Teil auf das Sec61-Translokon angewiesen ist. Da der Transportweg in seiner Funktion und dem Spektrum der zu transportierenden Proteine jedoch äußerst flexibel zu sein scheint, ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die einzige Eintrittsmöglichkeit in die ER-Membran für Transportsubstrate des SND-Proteintargetingweges in humanen Zellen.

Abschließend lässt sich von dem humanen SND-Transportweg ein Schema konstruieren, indem hSnd2 und TMEM109 als akzessorische Komponenten des Translokons dargestellt werden können. Da jedoch beide Proteine bisher nicht in bildgebenden Verfahren am Translokon identifiziert werden konnten, kann vermutet werden, dass diese transient an das Translokon gebunden sind, ähnlich wie es für Sec62, Sec63 oder SRP der Fall ist (Jadhav et al. 2015; Pfeffer et al. 2017). Die Insertion von hSnd2-abhängigen Transportsubstraten verläuft damit zumindest partiell abhängig von Sec61 α .

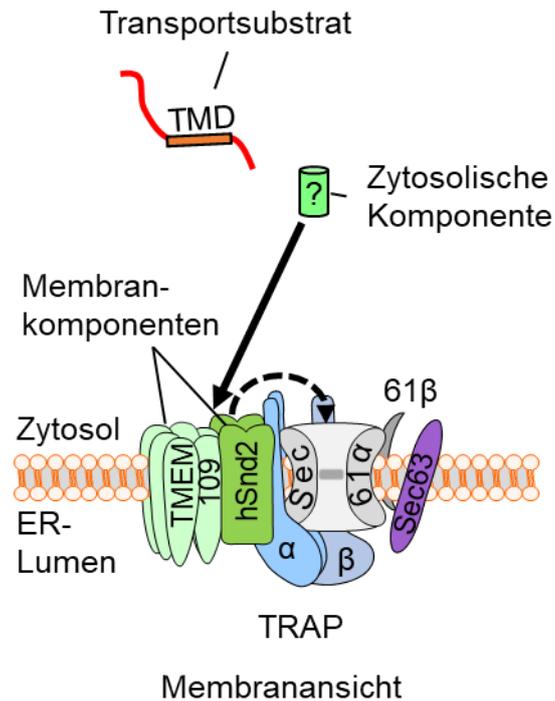


Abb. 60: Schematischer Aufbau des hSnd2 Transportweges in Kooperation mit dem Translokon. Die in der Arbeit generierten Daten zeigen, dass TMEM109 zusammen mit hSnd2 dem Translokon auf transiente Weise zugehörig ist. Die über den SND-Transportweg transportierte Proteine werden durch einen bisher nicht identifizierten Faktor im Zytosol erkannt, zur ER-Membran geführt und dort mittels hSnd2/TMEM109 erkannt. Die Insertion erfolgt zumindest für Teile der Substrate mittels Sec61 α . Dargestellt ist die Ansicht aus der Perspektive der Membran.

7.5. SEC61A1-V67G und -T185A führen zu Fehlfunktionen im Proteintransport und der Calciumhomöostase

Bei der ADTKD handelt es sich um eine Nierenerkrankung, die von verschiedenen Symptomen begleitet wird und sich final in einem Verlust der Nierenfunktion manifestiert. Als Auslöser für diese genetische Erkrankung konnten in der Vergangenheit unterschiedliche Mutationen ermittelt werden. Hierbei handelt es sich sowohl um Proteine, die einen direkten Bezug zur Niere aufweisen, wie Renin und Uromodulin, aber auch um nicht nierenspezifische Proteine wie Mucin 1 und den Transkriptionsfaktor HNF1- β (Devuyst et al. 2019). Im Jahr 2016 wurde beschrieben, dass Punktmutationen des *SEC61A1*, die einen Austausch von V67G und T185A zur Folge haben, diesen Krankheitstyp ebenfalls auslösen (Bolar et al. 2016). Während die pathologischen Ausprägungen der wenigen Patienten, die unter einer der Mutation des *SEC61A1*-Gens leiden, anhand dieser beschrieben werden konnte, ist die Erkrankung auf biochemischer Basis bisher nur unzureichend charakterisiert. Basierend auf der Lokalisation der zwei Mutationen, V67G in der *plug* Domäne und T185A in der *constriction zone* des Sec61 α , wurde jedoch vermutet, dass in beiden Fällen sowohl Proteintransport als auch Calciumhomöostase beeinflusst sind (Bolar et al. 2016). Diese Fragestellung wurde innerhalb dieser Arbeit mit Hilfe von *live-cell calcium imaging* und *in vitro* Transporten bearbeitet (Kap. 5.3 und 5.6).

Hierbei zeigten sich viele Gemeinsamkeiten und nur wenige Unterschiede zwischen den Zelllinien, die eine der beiden Mutationen stabil im Genom integriert haben. Diese Zelllinien sollen den heterogenen Zustand der Patienten in der Zellkultur simulieren. Zusammengefasst sind diese in der nachfolgenden Tab. 13. Interpretation und mögliche Zusammenhänge werden in den nachstehenden Kapiteln beschrieben.

Tab. 13: Zusammenfassung der Effekte, die von den Mutationen SEC61A1-V67G oder SEC61A1-T185A ausgelöst werden. Es zeigte sich, dass die Mutationen häufig ähnliche Effekte aufwiesen. Im Fall der T185A-Mutation ist der Calciumleak reduziert. In der V67G-Zelllinie ist neben dem eingeschränkten Transport von PPL und Ren auch UMOD in der Transporteffizienz beeinflusst. Der Vergleich erfolgte jeweils zu den Ergebnissen aus Messungen in denen der Wildtyp analysiert wurde. ✓ symbolisiert eine Übereinstimmung mit dem Wildtyp, während ↓ anzeigen, dass der untersuchte Parameter verringert ist (weniger Transport, geringerer *leak*, usw.)

Untersuchter Effekt	Quelle	V67G	T185A
Proteinabundanz	Abb. 39	ORAI1, SERCA2 ↓	STIM1, ORAI1, SERCA2 ↓
Sec61-vermittelter Calciumleak	Abb. 41	✓	↓
ER-Calciumspeicher	Abb. 42	↓	↓
SOCE	Abb. 41	✓	✓
Stressreaktion	Abb. 47	✓	✓
Luminale Calciumdepletion	Abb. 45	✓	↓
ES1-Sensitivität	Abb. 53	↓	↓

Posttranslationaler-Transport	Abb. 54	✓	✓
Cotranslationaler-Transport	Abb. 54	REN, UMOD und PPL↓	REN und PPL↓

ADTKD-Mutationen zeigen keinen Hinweis auf einen Stresszustand der Zelle.

In bereits durchgeführten Studien zu verschiedenen Mutationen von Sec61 α konnte gezeigt werden, dass die Mutation in Änderungen im Proteintransport und in der Calciumhomöostase resultierte (Schäuble et al. 2012; Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020). Beide Faktoren können die UPR als Folge des daraus resultierenden ER-Stresses auslösen (Mekahli et al. 2011; Oakes & Papa 2015). Ein erhöhter Stress, basierend auf den beiden genannten Gründen ist in den Sec61 α -Mutationen V85D und Q92R festgestellt worden die ebenfalls krankheitsassoziiert sind (Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020). Hier wurde dieser ER-Stress jedoch entweder nach der Überexpression der Sec61 α -V85D Mutante, bzw. mittels Fibroblasten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes des Indexpatienten nachgewiesen. Die Autoren der Studie, welche die Mutationen V67G und T185A initial beschrieben, äußerten eine übereinstimmende Vermutung, da ADTKD-Varianten, die durch Mutationen des Renins oder Uromodulins ausgelöst wurden, in Gewebeproben von Patienten Hinweise auf erhöhten ER-Stress und im zweiten Fall erhöhte BiP-Level aufwiesen (Adam et al. 2012; Bolar et al. 2016; Lee 2005; Živná et al. 2009). Aus diesem Grund wurde das Stressniveau der HEK-Zellen bestimmt, die durch die heterogene Expression des wildtypischen Sec61 α und einer der beiden Mutationen den Krankheitstyp simulieren, wobei sowohl der Gehalt von BiP als auch das Verhalten der Zelle auf unmittelbar ausgelösten Stress überprüft wurde. Hierbei wurde deutlich, dass weder der Gehalt von BiP noch ein weiteres ER-luminales Chaperon in der Zelle erhöht ist (Abb. 39). Da BiP die zentrale Regulationskomponente der UPR ist, deutet dies darauf hin, dass die Sec61 α Mutationen in den HEK-Zelllinien nicht zu einem erhöhten Zellstress führen (Wang et al. 2009). Ebenfalls würde der Sec61-vermittelte Calciumleak nach einer künstlichen Stressinduktion stärker ausfallen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 47), da im Stresszustand vermutlich BiP vom Sec61 wegrecruitiert werden würde und den Kanal dementsprechend nicht mehr verschließen könnte (Melnik et al. 2015; Schäuble et al. 2012). Falls eine erhöhte UPR-Aktivität vorliegen würde, wäre die Antwort auf die Tunicamycin- und Thapsigarginbehandlung stärker. Die Reaktion der Zellen auf Langzeitstress ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 48). Für das Zellkulturmodell konnte somit gezeigt werden, dass die Mutationen V67G und T185A in Sec61 α keinen verstärkten Stress auslöst. Beachtet werden muss hier, dass die hier geführten Nachweise indirekt sind, da weder die Aktivität noch der Proteingehalt eines der drei UPR-Wege spezifisch adressiert wurde. BiP als deren Regulator ist jedoch nicht auffällig erhöht. Eine weitere Möglichkeit die Ergebnisse zu interpretieren wäre, dass das

Zellkulturmodell eine Anpassung an diesen Stresszustand erfahren hat, sodass dieser nicht mehr als UPR-Stress nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Hier wäre es interessant zu ermitteln, ob Probenmaterial der betroffenen Patienten einen möglicherweise erhöhten Stresszustand zeigen, um diese Theorie auszuschließen.

ADTKD-assoziierte Zellen zeigen eine geringere Calciumkapazität

Die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase ist ein zentraler Punkt für die Funktionalität und Viabilität der Zelle. Hierbei ist das ER als zentraler Speicher des Calciums von entscheidender Rolle (Clapham 2007; Emkey & Emkey 2012).

In den hier untersuchten ADTKD simulierenden Zellen konnte festgestellt werden, dass ein geringerer Calciumpool im ER vorlag (Abb. 42). Einen Hinweis wie dieser Calciummangel entsteht, kann in den immunologisch erhobenen Daten gefunden werden (Abb. 39). Dort konnte festgestellt werden, dass die SERCA2-Abundanz in beiden Zelltypen signifikant verringert war. Dieses Protein ermöglicht als einzige Calcium-ATPase-Typ2 der ER-Membran den Transport von Calcium gegen den Gradienten in das ER hinein (Primeau et al. 2018). Als Folge daraus ist die geringere Calciummenge im ER der ADTKD Zellen eine logische Konsequenz. Die Überprüfung der SERCA-Aktivität deutet darauf hin, dass diese Aktivität per se pro Molekül deutlich erhöht ist (Abb. 46), jedoch trotzdem nicht ausreichend ist, um das ER bis zum Wildtypniveau mit Calcium zu füllen. Warum gerade SERCA2 eine geringere Abundanz zeigt, und warum die Wiederherstellung des physiologischen Calciumspiegels durch den Einsatz von 4-PBA potenziell ein sekundärer Effekt der erhöhten SERCA-Abundanz ist, wird in Folgeabschnitten (7.7 und 7.9) diskutiert.

Eine alternative Theorie für dieses Phänomen wäre, dass calciumbindende oder regulierende Proteine im ER überrepräsentiert wären. Hinweise hierauf konnten in der Arbeit jedoch nicht festgestellt werden, da zum Beispiel BiP, PDI oder GRP170 nicht in erhöhter Menge vorkamen (Abb. 39) (Coe & Michalak 2009; Lievreumont et al. 1997; Melnyk et al. 2015; Wang et al. 2015). Allerdings ist die Datenlage noch nicht vollständig genug, dass dieser Punkt mit abschließender Sicherheit ausgeschlossen werden kann, bzw. doch einen Anteil an dem Phänomen einnimmt. Hier wäre es interessant Proteine wie Calreticulin zukünftig zu überprüfen (Ostwald & MacLennan 1974; Park et al. 2001). Häufig wird der ER-Stress, resultierend aus dem verringerten Calciumpool, als ursächlich für die Entstehung der Krankheit beschrieben, ein solcher Stresszustand konnte in den hier verwendeten Zellen jedoch nicht identifiziert werden (Mekahli et al. 2011). Da die Regulation des Calciums in der Zelle jedoch für unterschiedliche Prozesse entscheidend ist, ist die Etablierung eines „normalen“ wildtypischen Calciumpools ein attraktives Ziel, welches durch die 4-PBA Behandlung verfolgt wurde und in folgenden Abschnitten diskutiert wird.

T185A zeigt einen verringerten Calciumleak

Dass Sec61 α ca. 60 % des Calciumleaks aus dem ER ausmacht, konnte durch knock-down Experimente dieses Proteins gezeigt werden (Gamayun et al. 2019; Lang et al. 2011). Im weiteren Forschungsverlauf zeigte sich ebenfalls, dass dieser Calciumleak durch verschiedene akzessorische Proteine des Sec61-Komplexes reguliert wird, da diese das Öffnen, bzw. Schließen des Kanals modulieren (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2017; Zimmermann et al. 2011). Daher war es ein Ziel dieser Arbeit zu evaluieren, welchen Einfluss die beiden Mutationen auf den Sec61- vermittelten Calciumleak ausüben. Hierbei zeigte sich keine Änderung des *leak* in der V67G Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die T185A Variante zeigte hingegen einen signifikant geringeren *leak* (Abb. 41). Dieser könnte daraus resultieren, dass die Entleerung des ERs langsamer erfolgt (Abb. 44). Bei einer identischen Aktivität der calciumregulierenden Kanäle in der Plasmamembran, die Calcium wieder hinaus aus dem Zytosol führen, würde dies zu einer geringeren maximal messbaren Calciummenge im Zytosol führen (Clapham 2007). Dass eine gleichmäßige Aktivität der calciumabführenden Komponenten vorliegt, kann anhand der mit Thapsigargin durchgeführten Experimente vermutete werden. Nachdem die Menge des Calciums im Zytosol auf ein Maximum angestiegen ist, nimmt die Kurve innerhalb der folgende vier Minuten gleichmäßig ab, und die Calciumkonzentration im Zytosol erreicht erneut den basalen Wert. Dieser Abfall der Kurve ist in allen Zelllinien und Experimenten vergleichbar, was auf eine ähnliche Aktivität der Kanäle und Transporter in der Plasmamembran hindeutet, die jedoch nicht speziell adressiert wurde.

Zusätzlich wurden keine Änderungen in der Proteinabundanz verschiedener akzessorischer Komponenten (TRAP α , Sec62, Rib) nachgewiesen, was wiederum darauf hindeutet, dass der Effekt spezifisch auf der Mutation des Sec61 α basiert (Abb. 39). Warum gerade die T185A Variante einen verringerten *leak* zeigt, könnte durch die Position der mutierten Aminosäure im Protein zu begründen sein. Die Aminosäure ist mittig in der TMD 5 lokalisiert und im geöffneten Zustand ist die Aminosäure zum Kanal hin orientiert, wie in Modellierungen gezeigt werden konnte (Abb. 61). Im geschlossenen Zustand ist der Aminosäurerest von der zentralen Pore weg orientiert. Vermutet wurde, dass als Folge des Austausches von Threonin zu Alanin eine Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung wegfällt, die die Stabilität des Proteins in einer bisher noch unbekanntem Art und Weise beeinflusst (Bolar et al. 2016). Als Folge daraus könnte die Flexibilität und das sogenannte *gating* des Kanals beeinflusst sein. Durch eine unterschiedliche Öffnungs-, bzw. Schließgeschwindigkeit könnte dies die Calciumpermabilität beeinflussen. Hierbei ist wahrscheinlicher die Schließung des Kanals betroffen, da der *leak* selbst dann erfolgt, wenn die Translokation von Proteinen abgeschlossen ist und der Kanal noch nicht wieder verschlossen ist (Wirth et al. 2003). Dieser Logik folgend, würde der Kanal schneller wieder verschlossen werden, was einen langsameren Calciumverlust aus dem ER und einen geringeren *leak* zur Folge hätte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass durch

die im Threonin enthaltene OH-Gruppe die Hydrathülle des Ca^{2+} -Ions imitiert werden könnte, wodurch es indirekt einen positiven Einfluss auf die Calciumpermeabilität des Translokons ausübt. Durch das Fehlen einer solchen OH-Gruppe könnte der Calciumfluss verändert sein. Ein solche strukturelle Auffälligkeit ist für die V67G-Mutation nicht gegeben, da diese auch durch die Flexibilität während der Öffnung des Kanals nicht strukturell modelliert werden kann. V67G liegt im geschlossenen Zustand in der Mitte des luminalen Teil des Translokons.

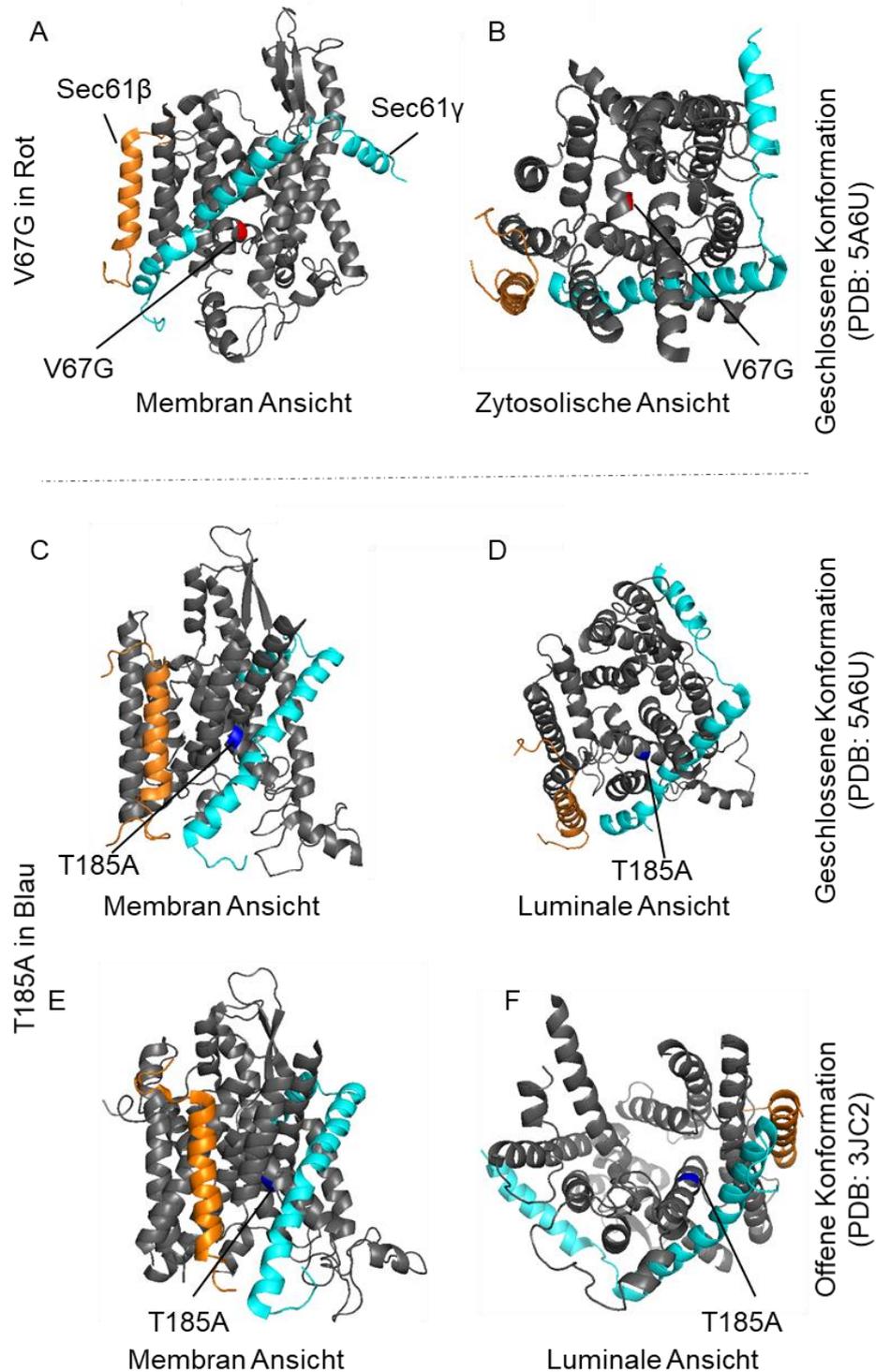


Abb. 61: Sec61 α -Struktur mit der eingezeichneten Position der jeweiligen Mutationen V67G oder T185A. Sec61 α ist in grün, Sec61 β in orange, Sec61 γ in hellblau dargestellt. **A** und **B**: In der geschlossenen Konformation des Sec61-Translokons wird die Position der Aminosäure 67 in Rot dargestellt. Diese ist in der *plug* Domäne in der Mitte des Kanals positioniert. **C** und **D**: Die Aminosäure 185 ist in Blau markiert in der geschlossenen Konformation ist die Aminosäure von der Kanalpore weg orientiert, in der offenen Stellung (**E** und **F**) ist sie zur Pore hin gerichtet. Die für die Modellierung genutzten PDB Datensätze sind 5A6U und 3JC2 (Pfeffer et al. 2015; Voorhees & Hegde 2016a).

Die Beobachtung, dass nur T185A zu einer Verringerung des *leak* führt, zeigt weiterhin, dass der *leak* per se nicht abhängig ist von der Konzentration des löslichen Calciums im ER, was

ebenfalls mit Hilfe einer Zeitreihenmessung der Reaktion auf Thapsigargin und Ionomycin bestätigt werden konnte (Abb. 43 und Abb. 44). Diese Aussage ist wahrscheinlich nur bis zu einem bestimmten Punkt richtig, im Falle der hier beobachteten Reduzierung des Gesamtcalciums jedoch zutreffend (Camello et al. 2002). Grundlegend für den Effekt der immer weiter reduzierten Menge des löslichen Calciums über die Zeit sind vermutlich die verschiedenen Akteure der Calciumhomöostase in der Plasmamembran, sowie der Aufbau des Experimentes, da durch das Vermessen in einer calciumfreien Umgebung der SOCE unterbunden wurde, welcher das ER wieder auffüllen würde (Clapham 2007). Durch den konstanten Transport von Calcium aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum verliert die Zelle an Calcium, da dieses im extrazellulären Raum in dem hier angewendeten Versuchsaufbau durch EGTA chelatiert und damit nicht mehr für die Zelle zugänglich ist (Kap. 5.6). Dadurch entsteht ein auf Dauer geringerer Calciumgehalt in der Zelle.

Transportdefekte geben Hinweis auf den ADTKD-Phänotypen

Die zweite, aus funktioneller Sicht möglicherweise bedeutsamere, Säule bildet der Proteintransport von neu synthetisierten Polypeptidketten in und über die ER-Membran. Dies betrifft etwa 30 % des Proteoms und für Polypeptidketten, die cotranslational oder teilweise auch posttranslational transportiert werden, ist der Sec61-Komplex der Kanal in der Membran, der diesen Vorgang ermöglicht (Deshaies et al. 1991; Kalies et al. 1994; Lang et al. 2012; Linxweiler et al. 2017; Rapoport et al. 1996). Daher wurde neben der Calciumhomöostase ebenfalls der Proteintransport durch *in vitro* Transportversuche experimentell betrachtet.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass der Transport verschiedener Proteine unterschiedlich beeinflusst wurde durch die beiden Mutationen des Sec61 α . Die hier getesteten posttranslational transportierten Proteine zeigten sich nicht beeinflusst (Abb. 54). Bei diesen handelt es sich zum einen um kurze sekretorische Proteine (CEC und APE) sowie zwei TA-Proteine (61 β und CYT). Dass die betrachteten TA-Proteine nicht negativ beeinflusst sind durch die Mutationen ist nicht erstaunlich, sondern eher als Kontrolle für einen weiterhin funktionsfähigen TA-Proteintransport zu sehen. Bei Betrachtung bisheriger Studien von krankheitsassoziierten *SEC61A1*-Mutationen, in denen die Untersuchungen nach einer Depletion des endogenen, „gesunden“ Sec61 α durchgeführt wurden, konnte zumindest immer der Transport von Sec61 β als typisches posttranslationales, Sec61-unabhängiges Substrat als unverändert nachgewiesen werden (Schäuble et al. 2012; Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020). Das kurze sekretorische Proteine im Allgemeinen unbeeinflusst sind, kann aus den hier getesteten Substraten nicht gefolgert werden. Da diese Proteine im allgemeinen trotz der anwesenden N-terminalen Signalsequenz zu kurz sind um cotranslational zum ER geführt zu werden, erfolgt deren posttranslationaler Transport dennoch über den Sec61-Komplex (Haßdenteufel et al. 2018; Haßdenteufel et al.

2019). Es ist jedoch nicht als allgemein anzusehen, dass kurze sekretorische Proteine von den Mutationen nicht beeinflusst sind, denn wie in einem der folgenden Abschnitte beschrieben (Kap. 7.7), ist ein ausschlaggebender Faktor hierfür vermutlich die Aminosäuresequenz des Signalpeptides.

Interessant ist der Unterschied in den cotranslational durchgeführten Experimenten (Abb. 54). Auch hier zeigte sich kein allgemeiner Defekt, sondern ein spezifischer für Renin, Präprolaktin und im Fall der V67G Variante ebenfalls für Uromodulin. Dass ein Defekt vorliegen könnte, war durch die zuvor durchgeführten ES1-Messungen zu vermuten (Abb. 53). Hier zeigten beide Zelllinien eine verringerte Antwort. Dies könnte in Verbindung mit der verringerten Anzahl an Öffnungsereignisse des Sec61-Kanals stehen, was ausgelöst wird durch den geringeren Transport. Da ES1 nur nach einer solchen Öffnung in das *lateral gate* des Kanals eingelagert wird, reguliert die geringere Anzahl der Öffnungsereignisse, die durch einen Transportvorgang ausgelöst werden, ebenfalls die Effektivität einer ES1 Behandlung (Gamayun et al. 2019). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Menge des sekretierten Renins ebenfalls verringert ist, was vermutlich eine direkte Folge des verringerten Renin-Transportes am Translokon ist. Was der Grund dafür ist, dass nur bestimmte Substrate im Transport betroffen sind und welche Effekte dies zur Folge hat, wird in den nächsten Abschnitten diskutiert.

7.6. SEC61A1-Mutationen lösen sekundär den ADTKD-Phänotypen aus

Der Oberbegriff ADTKD umfasst ein breites Spektrum an Erkrankungen, deren zentrales Charakteristikum der fortlaufende Verlust der Nierenfunktion ist. Begleitet wird dieser Verlust von weiteren unterschiedlich ausgeprägten Symptomen wie einer interstitiellen Fibrose, tubulären Atrophien, Veränderungen der tubulären Basalmembran und Mikrozysten. Der spezifische genetische Defekt, welcher die Symptome auslöst kann jedoch nur mit Hilfe einer Gensequenzierung ermittelt werden (Eckardt et al. 2015). Die Gruppe der Erkrankungen wird zum aktuellen Zeitpunkt in sechs Unterkategorien aufgeteilt, basierend auf den fünf bisher identifizierten Genen, die durch deren variable Mutation die Krankheit auslösen. In der sechsten Unterkategorie werden aktuell alle ADTKD-Formen zusammengefasst, für die die genetische Ursache bisher unklar ist. Die betroffenen Proteine sind Mucin1, Hnf1 β , Uromodulin, Renin und Sec61 α (Bleyer et al. 2017; Bleyer & Kmoch 2014; Devuyst et al. 2019). Für die beiden Proteine die auch in dieser Arbeit als Transportsubstrat genutzt wurden, Renin und Uromodulin, wurde in der Literatur beschrieben, dass die mit ADTKD in Verbindung stehenden Mutanten dieser zwei Proteine Transportdefekte auslösten. Für Renin konnte dies sowohl beim Transport über die ER-Membran, als auch für den weiteren sekretorischen Transport gezeigt werden (Schaeffer et al. 2019; Živná et al. 2009). Als Protease ermöglicht Renin die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin 1 und ist somit einer der initialen

Faktoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches als zentraler Regulator des Blutdrucks und der Natrium Retention gilt (Rahimi et al. 2014). Nahezu exklusiv in der Niere wird es aus dem Juxtaglomerulären-Apparat in das Blut sezerniert, gesteuert durch einen exozytotischen Vorgang .

Im Fall von Uromodulin sind Defekte für den Transport aus dem ER heraus, dem sekretorischen Weg folgend, bekannt. Für einen Teil der etwa 125 verschiedenen ADTKD assoziierten Mutationen ist beschrieben, dass Uromodulin im ER verbleibt und dort ER-Stress sowie UPR auslöst (Dahan et al. 2003; Kidd et al. 2020; Rampoldi et al. 2003; Williams et al. 2009). Da die genaue Funktion von Uromodulin noch nicht bekannt ist, kann nicht genau bestimmt werden, warum die pathologischen Effekte entstehen. Bekannt ist, dass dieses Glykoprotein, welches durch den hohen Cysteinanteil in dessen Sequenz in hohem Maße im ER modifiziert wird, ein nierenspezifisches Protein ist. Es wird in Epithelzellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife exprimiert und ist innerhalb der Zellen an der apikalen Plasmamembran lokalisiert (Bachmann et al. 1985; Bachmann et al. 1990; Rampoldi et al. 2011). Vermutet wird, aufgrund der Interaktion des Proteins mit Ionen und der geänderten Expression nach Gabe eines Diuretikums, dass sowohl der Elektrolyt- als auch der Flüssigkeitshaushalt mit dem Protein in Verbindung stehen, ebenso wie der Schutz vor Nierensteinen und Harnwegsinfektionen (Devuyst et al. 2019; Wiggins 1987; Ying & Sanders 1998).

Betrachtet man nun die Symptomatik der unterschiedlichen Patientengruppen genauer, wird im Kontext der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse deutlich, warum eine so hohe Überschneidung der Phänotypen gegeben ist (Tab. 1). Die Symptome der ADTKD-*REN* Variante überschneiden sich deutlich mit denen beider ADTKD-*SEC61A1* Mutationen, während Symptome wie die Ausbildung einer Gicht, was nur für *UMOD*-Mutationen beschrieben ist, nur in Patienten mit der V67G-Mutante vorkommen (Tab. 1 und Kap. 4.5.2.1). Dies ist übereinstimmend mit den jeweiligen Transportdefekten, da nur die V67G-Variante einen Defekt im Uromodulin Transport zeigt, beide Mutanten jedoch einen Defekt für Renin aufweisen (Abb. 54).

Daraus lässt sich folgern, dass die Ausbildung des Krankheitsphänotyps dadurch ausgelöst werden könnte, dass ein nicht funktioneller Transport von Renin oder Uromodulin stattfindet, entweder initial beim Eintritt in das ER oder durch die Arretierung des Transportsubstrates im ER. Beides führt zu einer geringeren sezernierten Menge des jeweiligen Proteins. Dieser Transportverlauf konnte zumindest für Renin ebenfalls im Zellkulturmodell für beide Zelllinien durch den Kooperationspartner nachgewiesen werden (Abb. 55). Für Renin stimmt diese Beobachtungen mit anderen Formen der ADTKD überein. Hier ist der Defekt in der Regel auf einen fehlerhaften Import zurückzuführen, denn vier von fünf der bekannten Mutationen liegen

in der Signalsequenz des Proteins, deren ΔG_{app} -Wert durch die Mutation jeweils gesteigert wird im Vergleich zum wildtypischen Renin ($>2,48$) (Bleyer et al. 2017). Wie dieser Wert den Transport beeinflusst, wird im folgenden Kapitel beschrieben. Im Fall von Uromodulin ist dies gegensätzlich: Hier ist eher die reife Domäne von den Mutationen betroffen, wodurch die finale Struktur des gefalteten Uromodulins beeinflusst ist, was erklärt, warum hier die Retention des Proteins im ER-Lumen die größere funktionelle Auswirkung hat (Kidd et al. 2020). Ebenfalls wäre es denkbar, dass die Synthese des GPI-Ankers des UMOD beeinflusst sein könnte, insbesondere im hier vorliegenden Fall der *SEC61A1*-Mutationen. Diese Überlegung basiert darauf, dass Sec62 und Sec63, Proteine die eng mit Sec61 α interagieren, einen Anteil an der Reifung von GPI-Anker Proteine einnehmen (Davis et al. 2015). Die Abundanz der Proteine ist nicht beeinflusst (für Sec62 gezeigt in Abb. 39), aber möglicherweise ist deren Interaktion mit Sec61 α durch die Mutationen beeinflusst, was eine eingeschränkte GPI-Anker Synthese zur Folge haben könnte.

Es ist dementsprechend anzunehmen, dass die Ausbildung der Phänotypen, die in ADTKD-*SEC61A1*-Patienten zu beobachten sind, sekundäre Effekte darstellen, die auf einem verringerten Transport und als Folge daraus einer geringeren Sekretion der beiden entscheidenden Proteine Uromodulin und Renin basieren. Auch die abnormale Struktur von Nieren in *SEC61A1* mutierten Zebrafischen kann durch den Transportdefekt erklärt werden, da Uromodulin und Renin schon früh während der embryonalen Genese ausgebildet werden und an der Nierenentwicklung beteiligt zu sein scheinen (Bolar et al. 2016; Gomez & Sequeira-Lopez 2016; Gubler & Antignac 2010; Zimmerhackl et al. 1996).

Inwieweit die gemessenen Änderungen der Calciumhomöostase einen Einfluss auf die Pathologie ausüben, lässt sich nur begrenzt abschätzen. Einerseits könnte der verringerte Calciumausstrom aus dem ER in der T185A-Zelllinie einen Einfluss auf die Energiehomöostase ausüben (Klein et al. 2018). Des Weiteren wird die Sezernierung von Renin unter anderem auch von der zytosolischen Calciumkonzentration in den juxtaglomerulären Zellen gesteuert. Hier inhibiert ein Anstieg des zytosolischen Calciums die Sekretion von Renin. Dies ist speziell untersucht worden in Bezug auf den SOCE (Beierwaltes 2010; Churchill 1985; Schweda et al. 2000). Da in der Arbeit keine Veränderungen im SOCE und eine verringerte Menge Gesamtcalcium im ER nachgewiesen wurde, ist keine Einschränkung der Reninsekretion basierend auf Unterschieden im aktivierten SOCE zu erwarten. Es wäre jedoch denkbar, dass die geringere Menge des löslichen luminalen Calciums (Abb. 42A und B) wie in vorhergegangenen Studien vermutet, zu einem verstärkten präaktiviertem SOCE führt und so die Schwelle zur SOCE Aktivierung verringert wäre (Klein 2019). Initiale Messungen zeigten hierfür jedoch keine Anhaltspunkte, die eine daraus resultierende verringerte Renin-Sezernierung schlussfolgern ließen. Ebenfalls macht diese

calciumabhängige Reninfreisetzung nur ca. 25 % des gesamten freigesetzten Renins aus, der verbleibende Anteil wird konstitutiv als Prorenin aus der Zelle heraustransportiert, was den Effekt des reduzierten zellulären Gesamtcalciums für die Sezernierung zusätzlich schmälert (Castrop et al. 2010; Schweda et al. 2007).

7.7. Signalsequenzanalysen zeigen Gemeinsamkeiten betroffener Substrate

In der Vergangenheit stellte sich durch die Analyse von Transkriptom- und Proteomdaten die Abhängigkeit des Transports verschiedener Substrate von bestimmten Komponenten des Translokons heraus. Hierbei konnte die Verbindung zwischen Signalsequenzen mit einem hohen GP-Gehalt und dem TRAP-Komplex, oder Signalsequenzen mit einer geringen Hydrophobizität der H-Region mit Sec62, Sec63 und dem TRAP-Komplex gezeigt werden (Nguyen et al. 2018; Schorr et al. 2020). Daher war es auch in den hier vorliegenden Untersuchungen interessant, ob eine Gemeinsamkeit der durch die Mutation betroffenen Substrate zu erkennen war. Dass die Signalsequenz von besonderem Interesse für diese Analyse ist, konnte durch Abb. 56 gezeigt werden. Hier wurde die Signalsequenz von effizient und weniger effizient transportierten Proteinen ausgetauscht und dadurch ein Effekt erzeugt, der zeigte, dass die Signalsequenz ein entscheidender Faktor für das Stattfinden des Transportes ist. Als betroffen in beiden Mutationen konnten mittels *in vitro* Transportversuchen die Transportsubstrate Renin und PPL identifiziert werden. Des Weiteren besteht die Vermutung, dass die Proteine ORAI1, STIM1 und SERCA2 ebenfalls in deren Transporteffizienz beeinflusst sind, da diese in geringeren Mengen in den Zellen vorzufinden sind. Die Quantifizierung des mRNA-Gehaltes (Abb. 40) von *ATPA2A* (SERCA2) zeigte, dass diese nicht in der Abundanz verändert ist. Gleiches konnte durch die Transkriptomanalyse bestätigt werden, und auch für *ORAI1* und *RENIN* gezeigt werden (Abb. 63). Dies lässt auf einen Defekt während der Translation oder des Transportes schließen. Da die wichtigste Interaktion von Transportsubstraten mit Sec61 α die Signalsequenz oder die erste TMD ist, welche sich an das hydrophobe Patch des Sec61 α anlagert, wurden diese Sequenzen auf ihre physikochemischen Eigenschaften hin analysiert (Rapoport 2007). Auffällig in diesem Kontext ist zum einen, dass negativ beeinflusste Substrate im N-Terminus der Signalsequenz, bzw. der TMD innerhalb der ersten drei Aminosäuren in fast allen Fällen eine negative Ladung beinhalten. Diese ist in den nicht beeinflussten Substraten, deren Klassifizierung ebenfalls auf den *in vitro* Transportexperimenten (Abb. 54) und den Western Blot Analysen (Abb. 39) basiert, nicht der Fall. Was die Funktion dieser negativ geladenen Aminosäuren im N-Terminus der Signalsequenz ist, konnte noch nicht sicher bestimmt werden. Allerdings zeigt der Verlust von positiven Ladungen, also einer Änderung der Nettoladung in den negativeren Bereich, beispielhaft für kleine sekretorische Post-substrate gezeigt, einen Transportdefekt (Guo et al. 2018a). Gleichzeitig entspricht die Anwesenheit einer negativen Ladung am N-Terminus der Signalsequenz deren klassischem Aufbau, der gekennzeichnet ist durch eine positive Ladung

innerhalb der ersten Aminosäuren und für deren Orientierung im Sec61-Kanal entscheidend ist (Lang et al. 2017; von Heijne 1990). Dies könnte dafür sprechen, dass Polypeptidketten mit einer geringeren positiven Nettoladung im N-Terminus der Signalsequenz erschwert transportiert werden, da sie ebenfalls nicht dem Idealtyp der *positive-inside-rule* folgen (von Heijne 1992; von Heijne & Gavel 1988; Wallin & Heijne 1998).

Tab. 14: Auflistung von Proteinen, die durch die SEC61A1-Mutationen V67G und T185A in deren Transporteigenschaft oder Abundanz negativ beeinflusst sind. Aufgeführt sind die Signalsequenzen oder die Sequenz der ersten TMD der einzelnen Proteine. Proteine mit einer Signalsequenz sind jeweils über der gestrichelten Linie, mit einer TMD unter der gestrichelten Linie dargestellt. Die Indices Z (zytosolisch) oder E (ER-luminal) am Ende der Sequenz beschreiben die Orientierung des C-terminalen Endes dieser TMD in der Membran. Die negativ geladenen Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) sind jeweils in rot markiert, während die positiv geladenen Aminosäuren Arginin (R), Leucin (K) und Histidin (H) blau markiert sind. Ebenfalls ist der Wert für ΔG_{app} der jeweiligen Sequenzen dargestellt, welcher die Wahrscheinlichkeit der eigenständigen Insertion der Sequenz in eine Membran wiedergibt. Dieser Wert steht ebenfalls in Zusammenhang mit der Interaktion zwischen Sec61 α und der jeweiligen Sequenz. Erstellt wurde dieser Wert mit Hilfe der Website <https://dgpred.cbr.su.se/index.php?p=home> (Hessa et al. 2005; Hessa et al. 2007). Die Sequenzen wurden der Uniprot Datenbank entnommen (release Version 2019_10 und später)

	Name	Sequenz des Signalpeptides oder der ersten TMD						ΔG_{app}
		1	6	11	16	21	26	
Beeinflusste Proteine	REN	M D G W R	R M P R W	G L L L L	L W G S C	T F G		+2,25
	PPL	M D S K G	S S Q K G	S R L L L	L L V V S	N L L L C	Q G V V S	+5,36
	STIM1	M D V C	V R L L W	L L W G L	L L H Q G	Q S		+1,83
	SERCA2	L L E L V	I E Q F E	D L L V R	I L L L A	A _E		+4,11
	Orai1	A S S R T	S A L L S	G F A M V	A M V _E			+3,31
Nicht beeinflusste Proteine	APE	M N L R L	C V Q A L	L L L W L	S L T A V	C G		-0,19
	CEC	M N F S R	I F F F V	F A C L T	A L A M V	N A		-0,32
	PRP	M A N L S	Y W L L A	L F V A M	W T D V G	L C		+0,32
	TRAP α	M R L L L P	R L L L L	L L L V F	P A T			-0,55
	BiP	M K L S L	V A A M L	L L L S A	A R A			-0,02
	PDI	M L R R A	L L C L A	V A A L V	R A			-0,36
	Sec62	F V M G L	I L V I A	V I A A T	L F P L W	P _E		-1,55
	IVC	G A L Y T	G F S I L	V T L L L	A G Q A T	T A Y F L	Y _E	-1,06
	SR β	L L S V V	V A V L A	V L L T L	V F W K L	I _Z		-2,51
	hSnd2	F Y L R I I	I L G A N	A Y C L V	T L V F F _E			-0,93
CamI	I F R L V	G C A L L	A L G V R	A F V C K	Y _E		-0,51	

Eine weitere Eigenschaft, die sich anhand der Sequenz des Signalpeptides bzw. der TMD bestimmen lässt, ist der ΔG_{app} -Wert. Berechnet wird dieser basierend auf den biophysikalischen Eigenschaften der einzelnen Aminosäure, deren Anzahl sowie deren Position innerhalb der Sequenz. Daraus resultierend ergibt sich ein Wert, der beschreibt, wie wahrscheinlich es ist, dass die Sequenz in eine Membran inseriert werden kann, ohne dass weitere Faktoren benötigt werden. Hierbei stehen negative Werte (Anwesenheit hydrophober Aminosäuren) für eine hohe Wahrscheinlichkeit, positive (Anwesenheit polarer und geladener Aminosäuren) für eine geringere Wahrscheinlichkeit der „Eigeninsertion“ (Hessa et al. 2005; Hessa et al. 2007). Zum Vergleich wurde der ΔG_{app} -Mittelwert von 3471 humanen

Signalsequenzen bestimmt, sowie von der ersten TMD von 4852 Proteinen, die mindestens eine TMD besitzen. Diese beliefen sich auf einen ΔG_{app} -Wert von +1,74 für Signalsequenzen und -0,51 für die TMD. Die der Berechnung zugrundeliegenden Sequenzen wurden der UniProt Datenbank entnommen (release Version 2019_10 und spätere). Beim Vergleich der betroffenen Substrate mit dem Mittelwert fällt auf, dass diese, teils deutlich, von diesem ins positive Abweichen. Nicht beeinflusste Substrate zeigen bis auf das Prionprotein (PRP) einen negativen ΔG_{app} -Wert, was die eigenständige Insertion des Proteins in die Membran unterstützt. Da das Prionprotein einen positiven, aber dennoch unterhalb des Mittelwertes der Signalpeptide liegenden ΔG_{app} -Wert aufweist, kann vermutet werden, dass es einen Schwellenwert gibt, der zwischen +0,32 und +1,83 liegt und der als Grenze für einen effizienten Insertion formuliert werden könnte. Da der ΔG_{app} -Wert nicht nur als Maß für die Eigeninsertion, sondern vermutlich auch für die Integration in den geöffneten Sec61-Komplex verwendet werden kann, ist diese Beobachtung durchaus interessant (Hessa et al. 2005).

Die Literatur ermöglicht es, hier eine Gemeinsamkeit zwischen verschiedenen *SEC61A1*-Mutationen zu bestimmen. Bei der Untersuchung der V85D-Mutante, welche PAD-assoziiert und ebenfalls heterogen in den Zellen exprimiert ist, konnte ebenfalls festgestellt werden, dass das Substrat PPL in dessen Transporteffizienz um ca. 50 % eingeschränkt war, wobei zeitgleich kein solcher Effekt für Cytb5 beobachtet werden konnte, übereinstimmend zu den hier vorliegenden Daten. Die Mutation E381* wurde diesbezüglich nicht untersucht (Schubert et al. 2018). Anders verhielt es sich für die Mutante Y344H, welche einen diabetischen Phänotyp auslöst, wenn sie homozygot vorliegt. Hier war PPL nicht im Transport eingeschränkt, jedoch das Protein ERj3, dessen Signalpeptid einen ΔG_{app} -Wert von +1,0 aufweist (Schäuble et al. 2012). Als nicht beeinflusst von den Mutationen Q92R und V67G konnte das Sec61 β Transportsubstrat nachgewiesen werden, was ebenfalls in der vorliegenden Arbeit der Fall war (Van Nieuwenhove et al. 2020). Zu beachten ist hier, dass alle genannten Studien (Schubert et al. 2018, Schäuble et al. 2012 Van Nieuwenhove et al. 2020) durchgeführt wurden mit Zellen, in denen endogenes Sec61 α depletiert und die mutierte Form des Proteins durch die Expression von Plasmid-DNA wieder eingebracht wurde. Dieses Vorgehen resultiert bei einer starken Depletion es endogenen Sec61 α und der effizienten Komplementation mit dem mutierten transgenen Sec61 α Lokus zu einer nahezu homozygoten Ausprägung der Mutation. Dieser wird in einem relativ kurzen Zeitraum von ca. 60 Stunden erzeugt. Die tatsächlichen Patienten der oben genannten Mutationen auch hier einen heterozygoten Genotyp aufweisen. Daher wurde in dieser Arbeit erstmals versucht auf zellulärer Ebene ein konstant heterozygoten Modell zu generieren und zu studieren. Die Tendenz zur Substratselektion, ist jedoch in allen Studien identisch.

Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen beruhen auf zwei Überlegungen, die sowohl einzeln als auch in Kombination Gültigkeit besitzen könnten. Durch die strukturellen Änderungen, die durch die Mutationen im Sec61 α ausgelöst werden, wird die Dynamik des Kanals selbst eingeschränkt. Diese Theorie könnte vor allem für die V67G-Mutante relevant sein, da diese direkt in der *plug* Domäne der TMD 2a liegt. Dieser *plug* muss für einen effizienten Transport „zur Seite“ verlagert werden, um den Kanal zu öffnen (Junne et al. 2006; Lang et al. 2017; Li et al. 2007; Voorhees & Hegde 2016a). Wie genau diese Mutation die Stabilität der Konformation oder intramolekulare Interaktionen beeinflusst, lässt sich gerade im offenen Zustand des Kanals nicht vorhersagen. Daher ist es spekulativ anzunehmen, dass dies der Grund ist, dass der Kanal nur erschwert durch ein eingebrachtes Signalpeptid geöffnet werden kann. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Helixstruktur des *plug* durch den Austausch zu einem Glycin gestört ist (López-Llano et al. 2006; Pace & Scholtz 1998). Falls diese Struktur gestört ist und damit die positiv geladene Aminosäure 66 (Arginin) nicht korrekt lokalisiert ist, könnte dies einen Einfluss auf die *positive-inside* rule haben, was zumindest für V67G erklärt, warum gerade Proteine mit einer positiven Ladung zum Beginn der Signalsequenz oder der TMD betroffen sind (Goder et al. 2004; Junne et al. 2006). Ähnlich verhält es sich mit der T185A Mutante. Hier ragt die betreffende Aminosäure an Position 185 in den Kanal im geöffneten Zustand und im geschlossenen ist es von diesem weg orientiert (Abb. 61). Hier wurde bereits die Vermutung geäußert, dass durch das Fehlen einer OH-Gruppe des Threonins, potenziell der Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung die Folge ist (Bolar et al. 2016). Dieses Fehlen hemmt möglicherweise die Öffnung des Kanals, was ebenfalls durch die verringerte ES1-Sensitivität und den geringeren Calciumleak verdeutlicht wird (Abb. 41; Abb. 53). Die zweite Theorie wäre, dass akzessorische Faktoren von Sec61 α nicht mehr effizient rekrutiert werden. Als diese stellten sich in der Vergangenheit unterschiedlichste Faktoren wie BiP, der TRAP-Komplex, Sec62 und Sec63 und weitere heraus, die teilweise konstant, teilweise transient mit dem Sec61-Komplex interagieren (Jadhav et al. 2015; Klein et al. 2020; Lang et al. 2019; Linxweiler et al. 2017; Meyer et al. 2000a; Nguyen et al. 2018; Pfeffer et al. 2017; Schorr et al. 2020). Die Gemeinsamkeit all dieser Proteine ist, dass sie den Transport von Proteinen mit bestimmten Signalsequenzen ermöglichen, die in einer Form von der Norm abweichen und als „schwache“ Signalpeptide bezeichnet werden (Lang et al. 2017). Betrachtet man die Öffnung des Kanals als einen enzymatischen Prozess, dann steuern diese Substrate eine geringere Energiemenge bei, die das Öffnen des Kanals ermöglicht und werden daher durch die Bindung von Sec61 mit weiteren Faktoren energetisch unterstützt. Geht man nun davon aus, dass der überdurchschnittlich positive ΔG_{app} -Wert ebenfalls ein Indiz dafür liefert, dass diese durch die Signalsequenz oder die TMD bereitgestellte Energie geringer ist als im Durchschnitt, dann wären solche akzessorischen Komponenten nötig, um eine effiziente Öffnung zu erlauben.

Wenn durch die Mutation im Sec61 α die Interaktionen mit diesen akzessorischen Komponenten gestört wäre, würde es an Energie fehlen, und eine Öffnung erfolgt seltener (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2017). Gleichzeitig wäre es möglich, dass beide genannten Theorien, ein in seiner Moleküldynamik eingeschränkter Komplex und die verminderte Interaktion mit akzessorischen Komponenten zusammenspielen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Selektion, ob ein Transportsubstrat durch die Mutation des Sec61 α in dessen Transporteffizienz beeinflusst ist, auf der Signalsequenz basiert. Durch den Austausch solcher Sequenzen, konnten zum einen negative Transporteffekte aufgehoben, aber auch erzeugt werden. Des Weiteren wurden auf Ebene der Primärstruktur Gemeinsamkeiten der beeinflussten Signalsequenzen festgestellt, sowohl was deren Ladung am N-Terminus betrifft, als auch deren ΔG_{app} -Wert. Gleiches gilt für Proteine mit einer TMD, die anstelle einer Signalsequenz als Insertionssignal fungieren kann. Ob der Transportdefekt schlussendlich aus einer geringeren Dynamik des Kanals, einem Fehlen von akzessorischen Komponenten oder beidem resultiert, kann an dieser Stelle noch nicht abschließend beantwortet werden. Vermutlich ist die Öffnungsenergie, die benötigt wird, um den Kanal zu öffnen durch die Mutation so beeinflusst, dass ein höherer Schwellenwert überschritten werden muss, bis eine Öffnung erfolgt. Die Energie, die durch die Signalsequenzen oder TMD mit einem hohem ΔG_{app} -Wert bereitgestellt wird, ist nur im bedingten Maße ausreichend, um diese Funktion zu erfüllen, was in einem verringerten Transport aufgrund von weniger Öffnungsevents des Kanals resultiert.

7.8. Globale RNA-Analyse gibt Hinweise auf fibrotische Nierenpathologie

Da alle in dieser Arbeit generierten Daten auf die Beschreibung spezifischer Funktionen des Sec61 α abzielten, konnte der Einfluss der Mutation auf die unmittelbar mit dem Protein zusammenhängenden Funktionen beschrieben werden. Dies umfasst die Calciumhomöostase und den Transport von Proteinen mit Hilfe dieses Proteins. Durch die Analysen verschiedener Proteine per Western Blot konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Proteine beeinflusst waren, die Folgeeffekte auslösen. Hier ist als Beispiel SERCA2 zu nennen, welches durch die geringere Abundanz ein geringeres Calciumlevel im ER zur Folge hat. Aus dem Missstand, dass ein Protein weniger in der Zelle zugegen ist, damit dessen Funktion nicht voll erfüllt werden kann, ist eine Gegenregulation auf genetischer Ebene eine mögliche Folge (Gonzalez et al. 2021). Aus diesem Grund wurde eine Analyse der Gesamtheit der in der Zelle befindlichen RNA, also des Transkriptoms, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine markierungsfreie RNA-Analyse der Zellen bei der Firma Novogene durchgeführt. Hierfür wurde mit freundlicher Unterstützung von Dražena Hadžibegdanović (UdS, Med. Biochemie, AG Lang) die entsprechende Probenvorbereitung (RNA Isolierung, Qualitätskontrolle) durchgeführt. Von der Firma wurden die Folgeschritte des partiellen Verdauens der RNA, dem

konvertieren in DNA-Abschnitte, dem Anfügen von Adaptoren und der Amplifikation der jeweiligen Konstrukte vorgenommen. Der Prozess wurde durch unterschiedliche Qualitätskontrollschritte begleitet. Die Sequenzierung erfolgte durch Next Generation Sequencing. Daraus resultiert ein bereitgestellter Datensatz, der die Mengen der einzelner mRNAs in den einzelnen Zelllinien quantitativ miteinander vergleicht, sodass sich eine differentielle Genexpressionsanalyse ergibt.

Erste Ergebnisse geben hierbei interessante Informationen und Hinweise im Kontext der in der Arbeit generierten Ergebnisse. In Abb. 62 ist dargestellt, welche Funktionen durch die stärkere oder schwächere Expression einzelner Gene, welche die signifikanteste Änderung erfuhren. Die Gene sind in den dargestellten Funktionsgruppen zusammengefasst. Das gleiche Gen kann dabei aber auch mehreren der genannten Funktionen zugehörig sein. Auffällig ist, dass sowohl für die V67G- als auch die T185A-Zelllinie festgestellt werden konnte, dass mRNAs, die funktionell mit der Ausbildung von extrazellulärer Matrix in Zusammenhang stehen, stärker exprimiert werden (extracellular matrix, extracellular matrix component). In der Zelllinie V67G gilt das Gleiche für die Ausbildung von Kollagenen (complex of collagen). Sowohl Kollagene als auch die extrazelluläre Matrix generell spielen in der Wundheilung eine entscheidende Rolle, führen jedoch bei einer gesteigerten Präsenz zur krankhaft vermehrten Ausbildung von Bindegewebe, welches zu einer Verhärtung und Funktionsverlust des Gewebes führen kann, was unter dem Begriff Fibrose bekannt ist (Herrera et al. 2018; Karsdal et al. 2017; Wight & Potter-Perigo 2011). Unter der Berücksichtigung, dass die Mutationen V67G und T185A eine Nierenerkrankung auslösen, die in der Regel mit fibrotischen Anomalien einhergeht, deuten die Analyse der mRNA genau diese Veränderungen ebenfalls in dem Zellkulturmodell an (Baues et al. 2020; Bolar et al. 2016; Djurdjaj & Boor 2019; Wynn 2008). Weiterführende Analysen wie der Bestimmung der Proteinmenge dieser den Gruppen zugehörigen Proteine erfolgte bisher noch nicht. Ebenso spannend erscheint die funktionelle Gruppe der Gefäßbildung rund um die Niere (kidney/renalsystem vasculature development) welche in V67G eine erhöhte Abundanz zeigen. Dies spricht gegen die in Patienten und Zebrafischen beobachteten Effekte der veränderten Nierenausbildung (Bolar et al. 2016). Möglicherweise findet hier eine zelluläre Kompensation der Effekte auf Transkriptionsebene statt.

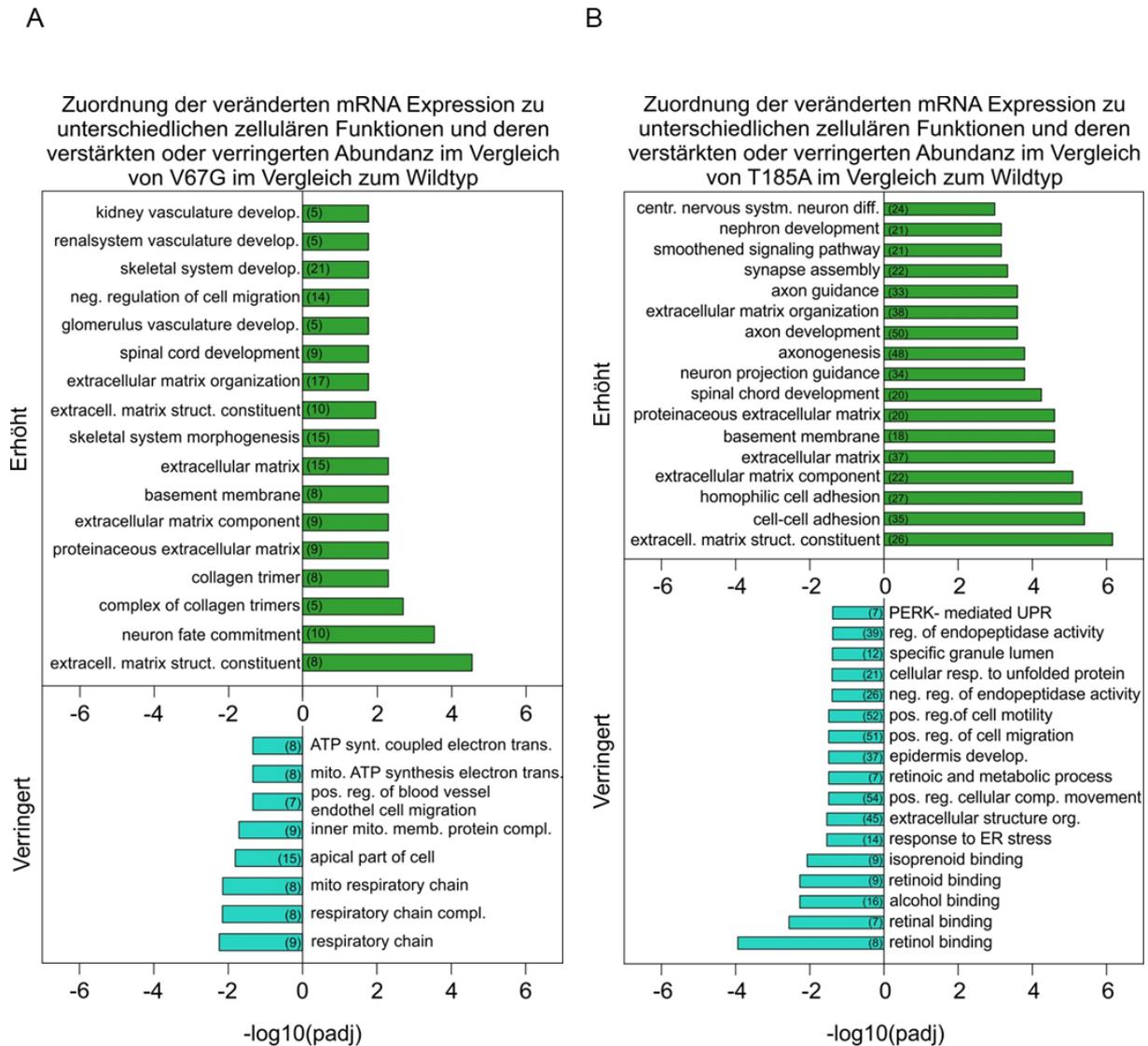


Abb. 62: Vergleich der Abundanz der mRNA verschiedener zellulärer Funktionen zwischen den Mutanten mit dem WT. Dargestellt sind die signifikant beeinflussten zellulären Funktionen. In Klammern dargestellt ist die Anzahl der Funktion zugehörigen Gene, die in ihrer Abundanz verändert sind. Gezeigt werden die maximal 17 am signifikantesten veränderten Funktionen, die entweder negativ oder positiv signifikant verändert sind. Die Proben wurden mit Hilfe von Dražena Hadžibegdanović vorbereitet und der Firma Novogene übergeben, die die experimentelle Durchführung und die Auswertung bereitstellten. Basierend auf dieser Auswertung wurden die hier gezeigten Grafiken angefertigt. **A:** Dargestellt ist die Veränderung im Vergleich zwischen V67G und WT Zelllinie. **B:** Dargestellt ist die Veränderung im Vergleich zwischen T185A und WT Zelllinie.

Ebenfalls sind die negativ beeinflussten Funktionsgruppen von Interesse. Hier zeigt sich für die V67G Mutation, dass mehrere Gruppen beeinflusst sind, die mit der Energiegewinnung mittels ATP-Synthese in Verbindung stehen (Abb. 62A, respiratory chain, respiratory chain complex, inner mitochondrial membrane complex, mito. ATP synthesis electron transfer und weitere). Basierend auf diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die Energiegewinnung der V67G Zellen in einer Art und Weise verringert ist, die den Schwerpunkt der Energiegewinnung weg von der Atmungskette und eher auf die Glykolyse legt. Dies ist unter anderem auch in unterschiedlichen Krebszelllinien beobachtet worden und wird als

Warbureffekt bezeichnet (Liberti & Locasale 2016; Yu et al. 2017). Ein Zusammenhang mit der hier betrachteten Mutation des Sec61 α ist nur unzulänglich zu erklären. Eine Verbindung mit nicht zur Verfügung stehendem Sauerstoff wie es teilweise bei Krebszellen der Fall ist, scheint unwahrscheinlich, da die WT oder T185A Zellen keine solche Hinweise liefern (Dunn 1997). Die Verbindung zum veränderten Calciumgehalt des ERs wäre eine weitere Möglichkeit, warum Mitochondrien ebenfalls betroffen sein könnten (Abb. 42). Hier könnte über die Kontakte zwischen Mitochondrien und ER, die MAMs, diese Fehlregulation ebenfalls einen Effekt auf die erstgenannten ausüben (Gao et al. 2020; Morciano et al. 2018; Patergnani et al. 2011). Gegen einen Zusammenhang dieser Faktoren spricht, dass T185A die identischen Veränderungen in der Menge des gelösten Calciums im ER zeigt (Abb. 42A und B), jedoch keine entsprechenden Änderungen in der mRNA Expression von Genen der Atmungskette. Gleichzeitig ist der Calciumgehalt in allen Organellen, mit Ausnahme des ERs ebenfalls identisch (Abb. 42C und D). Ein Transportdefekt wie er für Renin und Uromodulin zu beobachten ist, liegt hier ebenfalls nicht vor, da der Transport von mitochondrialen Proteinen unabhängig von Sec61 an der Membran des Mitochondriums erfolgt.

In der Zelllinie T185A ergibt sich ebenfalls eine für diese Zelllinie individuelles Phänomen. Hier wurde gezeigt, dass mehrere Funktionsgruppen des ER-Stresses in deren mRNA Expression verringert waren (PERK mediated UPR, cellular responsero unfolded proteins). Dies kann zumindest teilweise mit den Ergebnissen der Western Blot Analyse in Verbindung gebracht werden (Abb. 39), in denen gezeigt werden konnte, dass das zentrale Protein der ER-Stress-Antwort BiP nicht erhöht nachweisbar war (Bertolotti et al. 2000).

Die Betrachtung der insgesamt veränderten mRNA-Expression erfolgt in Abb. 63. Hier wird durch einen Volcano-Blot dargestellt, welche mRNA wie verändert wurde. Hier wurde der Fokus der bisherigen Analyse darauf gelegt, ob die in dieser Arbeit relevanten Proteine bereits auf mRNA-Ebene verändert sind. Hierzu zählen die mRNAs der Proteine Renin, Muc1 und HNF1- β (Uromodulin konnte nicht identifiziert werden). Mutationen in diesen Proteinen können ebenfalls Formen der ADTKD auslösen (4.5.1). Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression dieser Kandidaten in keiner der beiden Zelllinien signifikant verändert ist. Dadurch kann die bereits geäußerte Vermutung unterstützt werden, dass der Phänotyp der *SEC61A1*-Mutationen V67G und T185A aus einem Transportdefekt für die Substrate Renin und Uromodulin herrührt, da die unveränderte mRNA-Menge zeigt, dass auf genetischer Ebene keine Veränderung stattfindet. Hierbei wird beachtet, dass der *in vitro* Transport per se unabhängig zu sehen ist vom zelleigenen genetischen Material, da dieser mit Hilfe von künstlich eingebrachter Plasmid-DNA/mRNA erfolgt. Ebenfalls interessant zu sehen ist, dass die mRNA für *SEC61A1* ebenfalls nicht verändert ist, was bedeutet, dass keine Reaktion auf Transkriptionsebene auf die Anwesenheit der Mutation erfolgt. Ebenfalls sind die weiteren

Untereinheiten des Sec61-Komplexes, Sec61 β und Sec61 γ nicht verändert, genauso wie akzessorische Komponenten wie Sec62/63, TRAP oder der SRP Rezeptor (Daten nicht separat eingetragen (Conti et al. 2015; Pfeffer et al. 2017; Voorhees et al. 2014)). Die unveränderte Abundanz von ATP2A2 (SERCA2) unterstützt die in Abb. 40 gezeigten Daten, und untermauert die Vermutung, dass die reduzierte SERCA2 Proteinmenge in Verbindung steht mit einem Transportdefekt, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein vermehrter Abbau des Proteins der Fall sein könnte. Gleiches gilt für das ORAI1 Protein.

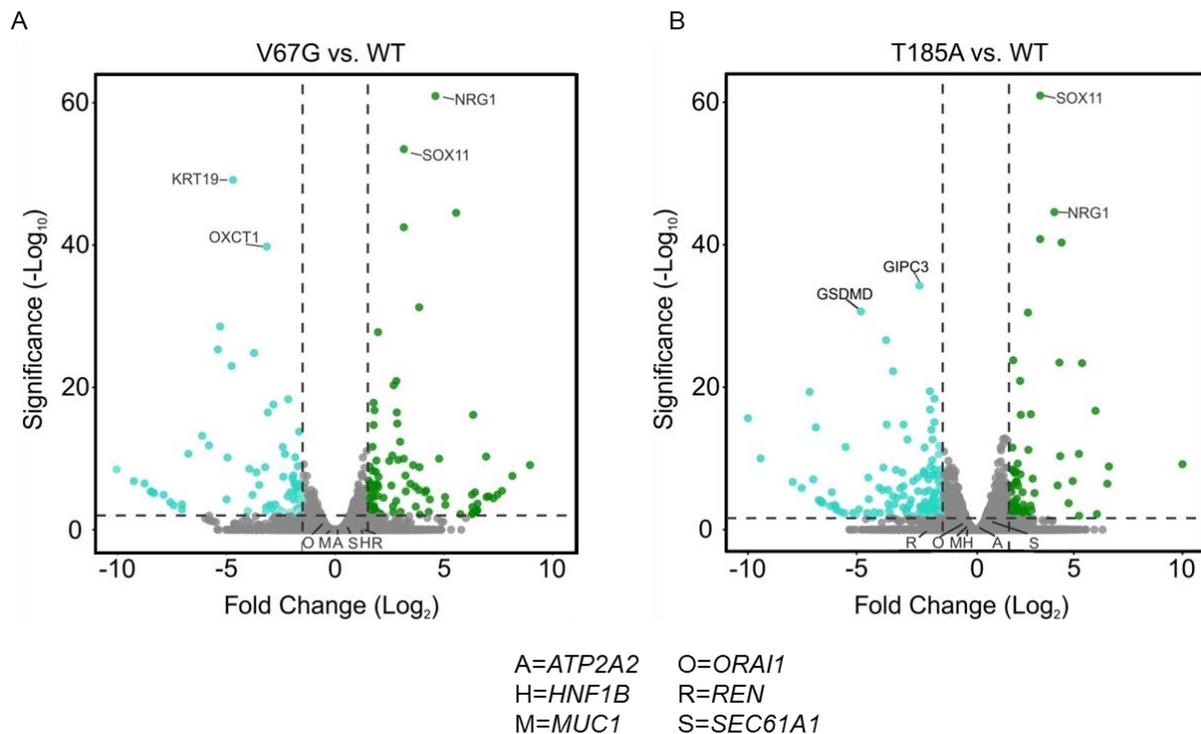


Abb. 63: Volcano-Blot zur Darstellung der gesamten Veränderung der gesamten mRNA-Mengen der Zellen. Abgeglichen wurden die veränderten Mengen der identifizierten mRNA zwischen **A:** V67G und WT (insgesamt 27825 mRNAs) und **B:** T185A und WT (28416 mRNAs). Die *fold change* ist gegen die Signifikanz der Veränderung aufgetragen. mRNAs mit erhöhter Abundanz sind in grün dargestellt, mit verringerter Abundanz in roter Farbe. In beiden Fällen sind die mRNAs für das Sec61 α (*SEC61A1*), das ORAI1 (*ORAI1*) und das SERCA2 (*ATP2A2*) Protein markiert, sowie die mRNAs für weiter ADTKD assoziierte Proteine Renin (*REN*), Mucin1 (*MUC1*) und den Transkriptionsfaktor HNF1- β (*HNF1B*) (Devuyst et al. 2019).

neben den für dieses Projekt interessante Proteine sind ebenfalls die Proteine mit der signifikantesten Änderung eingetragen worden. Die mRNAs mit einer geringeren Abundanz zeigten keine Verbindung zum Proteintransport, der Calciumhomöostase oder der Niere (Charizopoulou et al. 2011; Sborgi et al. 2016; Shafqat et al. 2013; Stone et al. 2005). Auffällig ist jedoch, dass sowohl für V67G als auch für T185A die mRNAs *SOX11* und *NRG1* jene mit der signifikantesten positiven Abundanzänderung sind. *NRG1* codiert für ein das gleichnamige Protein (*NRG1*, Neuregulin 1) welches zum Nrg1-ErbB Signalweg gehört und als Wachstumsfaktor hauptsächlich neuronale Zellen beeinflussen (Britsch 2007; Nave & Salzer 2006). Eine Fehlregulation kann in unterschiedlichen Neuropsychologische Erkrankungen,

aber auch in Krebs resultieren (Talmage 2008; Thomson et al. 2007). *SOX11* (Transcription factor SOX-11) ist ein ebenfalls hauptsächlich mit der Entwicklung von neuronalen Zellen in Verbindung gebrachtes Protein, in diesem Fall jedoch handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor (Tsang et al. 2020). In Verbindung mit dem *WNT4*-Gen konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass es die Entwicklung der Niere positiv beeinflusst (Murugan et al. 2012; Neirijnck et al. 2018). Dies ist möglicherweise der Grund, aus dem die funktionelle Gruppen, welche die Entwicklung der Niere steuern, gesteigert sind (Abb. 62). Der genaue Zusammenhang wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Analyse der mRNA die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigt werden konnten (Abb. 40) und die Theorie, dass für die Proteine, die in verringerter Menge detektiert wurden, die genetische Ausgangsmenge nicht reduziert war, wodurch ein Einflussfaktor ausgeschlossen werden konnte. Dies unterstützt die Theorie, dass der Transport der betroffenen Proteine, ORAI1, STIM und SERCA2, durch die *SEC61A1*-Mutationen fehlerhaft ist. Gleichzeitig sind Parallelen zwischen dem analysierten Zellkulturmodell und den Patientenproben bzw. Symptomen festgestellt worden, wodurch das genutzte System verifiziert wurde. Gleichzeitig bildet die Analyse eine Grundlage für weitere experimentelle Fragestellungen, in der der Fokus auf die Analyse der Energiehomöostase, der Nierenentwicklung oder regulatorischer Prozesse gelegt werden könnte.

7.9. 4-PBA als potenzielles Medikament gegen ADTKD

4-phenylbutyric acid (4-PBA) ist ein klinisch angewendetes Medikament mit unterschiedlicher Funktion. Beschrieben werden hauptsächlich drei verschiedene Anwendungsbereiche des Medikaments:

- (i) Zur Behandlung der Fehlregulation der Harnstoffsynthese. Hierbei ist die Verstoffwechslung von 4-PBA mittels β -Oxidation entscheidend, da das daraus resultierende Produkt, Phenylacetat, Glutamin bindet. Das gebildete Phenylacetylglutamin, wird über den Urin ausgeschieden und senkt somit die Menge des Harnstoffes, da das NH_2 , welches im Glutamin gebunden ist, dem Harnstoffzyklus nicht mehr zur Verfügung steht (Batshaw et al. 2001; Kolb et al. 2015; Lichter-Konecki et al. 2011; Palir et al. 2017).
- (ii) Als Histone deacetylase (HDAC) Inhibitor, wodurch es Anwendung in der Tumorthherapie findet. Durch die verringerte Genexpression von Proto-Onkogenen vermindert es unter anderem die Proliferation und induziert den Zelltod von Krebszellen (Bolden et al. 2006; Carducci et al. 2001; Xu et al. 2007).
- (iii) Als chemisches Chaperon, welches den ER-Stress reduziert und Proteine in einem faltungskompetenten Zustand hält. Durch die Interaktion mit exponierten hydrophoben

Sequenzen von nicht oder fehlgefalteten Proteinen, besteht für diese eine höhere Chance eines funktionellen Transportes. Die Gabe von 4-PBA bei verschiedenen Erkrankungen im Zusammenhang mit ER-Stress zeigte eine Vielzahl positiver Effekte (Cortez & Sim 2014; Kolb et al. 2015; Rubenstein et al. 1997; Yam et al. 2007).

4-PBA wurde in dieser Arbeit in der Zellkultur eingesetzt, um die beobachteten Fehlfunktionen des Proteintransportes und der Calciumhomöostase modulieren zu können. Ein erster Hinweis auf diese Funktion konnte durch das RTCA beobachtet werden, wo festgestellt wurde, dass die Behandlung mit 4-PBA einen positiven Effekt auf den Zellindex auslöste (Abb. 48). Im Verlauf des *live-cell calcium imaging*s konnte festgestellt werden, dass die kurzzeitige, aber auch die langzeitige Behandlung mit 4-PBA die untersuchten Parameter so beeinflusste, dass diese den Wert eines unbehandelten Wildtyps erreichten (Abb. 50 und Abb. 52). Ebenfalls konnte die Verbesserung des *in vitro* Transportes für Renin experimentell gezeigt werden (Abb. 57). Basierend auf Interaktionssimulationen von Sec61 α und 4-PBA ist ein direkter Einfluss der Substanz auf den Kanal wahrscheinlich (Abb. 58).

Die aufgeführten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass 4-PBA direkt den Transport von Proteinen durch den Sec61-Kanal positiv beeinflusst. Dass ein verstärkter *leak* nach drei bzw. fünf Minuten Behandlungszeit beobachtet werden kann, zeigt an, dass der Kanal vermehrt geöffnet wird, ausgelöst durch einen verbesserten Proteintransport, der in den *in vitro* Studien durch das Modellsubstrat Renin gezeigt werden konnte. Dass ebenfalls ein Langzeiteffekt durch die einmalige Behandlung entsteht, konnte durch die gesteigerte Calciummenge im ER gezeigt werden. Diese könnte potenziell ein sekundärer Effekt des verbesserten Proteintransportes darstellen, oder des verringerten Proteinabbaus. In der Literatur ist beschrieben, dass die Abundanz von SERCA2 nach der Behandlung von Ratten mit 4-PBA gesteigert ist, basierend auf einem gehemmten Abbau des Proteins, ausgelöst durch dessen verringerte Ubiquitinierung (Takada et al. 2012). Da SERCA2, welches für den Transport von Calcium in das ER entscheidend ist, in den hier betrachteten Zellen in geringerer Menge vorkommt, wäre die Steigerung des Calciumgehalts im ER eine Folge der erhöhten Menge und Aktivität von SERCA2 nach der Behandlung mit 4-PBA (Rahate et al. 2020). Ein solcher Effekt, der gesteigerten Proteinabundanz nach Gabe von 4-PBA, wurde ebenfalls für eine Mutation des CFTR-Proteins nachgewiesen, welches ebenfalls ein membranständiges Membranprotein darstellt (Li et al. 1993; Rubenstein & Zeitlin 1998; Rubenstein & Zeitlin 2000). Der gesteigerte Proteintransport könnte im Zusammenhang mit zwei Faktoren stehen. Durch die Interaktion mit den nicht transportierten Substraten, werden diese in einem transportkompetenten Zustand gehalten und stehen dem Transport daher länger zur Verfügung, oder durch die gezeigte Interaktion zwischen 4-PBA und Sec61 α wird der Kanal bei der Öffnung unterstützt und der Transport „schwieriger“ Transportsubstrate erfolgt

effizienter. Vermutlich spiegelt die Kombination beider diskutierter Mechanismen die Realität wider.

Die in der Zellkultur erhobenen Daten, geben Hinweise darauf, dass 4-PBA geeignet wäre, um Patienten mit ADTKD zu behandeln. Neben dem theoretisch verbesserten Transport der Proteine, die den Phänotypen auslösen, könnte der zweite Effekt von 4-PBA genutzt werden, der Senkung des Harnstoffspiegels, um die Gichtsymptome zu mildern, da das aktuelle Standardmedikament, Allopurinol, mit dem selben Ziel verabreicht wird (Burns & Wortmann 2012; Kolb et al. 2015; Pai et al. 2013). Trotz einer Inzidenz von ca. 0,1 %, ist eine schrittweise Dosierung hier jedoch notwendig, da ein Zusammenhang mit Nierenfehlfunktionen, die zu einer Hyperurikämie führen und der Gefahr einer Allopurinol Unverträglichkeit (Folgen wären Epidermale Nekrolyse und Erythrodermie) besteht (Dalbeth & Stamp 2007; Hande et al. 1984). Der beobachtete Effekt der Reduzierung des ER-Stresses, was ebenfalls aus der Funktion als chemisches Chaperon resultiert, könnte zusätzlich unterstützend wirkend sein. Auch wenn in den hier gezeigten Daten kein Hinweis auf einen akuten Stress der Zelle gegeben ist und Patientenproben noch nicht auf diesen Faktor untersucht wurden, sind die Formen der ADTKD-*UMOD* und -*REN* durchaus mit Stress assoziiert (Kemter et al. 2017; Schaeffer et al. 2019; Schaeffer et al. 2017; Živná et al. 2009).

Studien, die einen direkten Zusammenhang zwischen ADTKD-Formen und 4-PBA untersuchen, sind bisher rar. Zwar konnte durch die Anwendung von 4-PBA die verbesserte Reifung von Uromodulin *in vitro* in ADTKD-*UMOD* Modellzellen nachgewiesen werden, die Daten konnten jedoch nicht in Mausmodellen bestätigt werden (Choi et al. 2005; Kemter et al. 2014; Ma et al. 2012). Hier ist allerdings zu beachten, dass der Mangel an Uromodulin in ADTKD-*UMOD* Varianten anders entsteht als in den ADTKD-*SEC61A1* Varianten. Durch den verringerten Transport des Uromodulins in V67G Zellen stellt sich hier ein anderer limitierender Faktor dar, weswegen 4-PBA in seiner transportunterstützenden Funktion in ADTKD-*SEC61A1 in vivo* Modellen möglicherweise dennoch einen positiven Effekt ausüben könnte. Des Weiteren muss bedacht werden, dass 4-PBA in seiner Funktion als HDAC Inhibitor die Expression eines gap junction Kanals, Connexin43 fördert, welcher wiederum die Expression von Renin unterstützt (Haefliger et al. 2006; Kaufman et al. 2013). Somit könnte aus der Behandlung mit 4-PBA sowohl eine gesteigerte Expression, ein verbesserter Transport sowie eine gesteigerte Sekretion resultieren.

Resultierend aus den hier vorliegenden Daten und der Literaturrecherche wäre eine Übertragung ins Mausmodell interessant. Hier ist die Frage, ob sich die Verstoffwechslung des 4-PBAs auf die Funktion auswirken wird und so die in der Zellkultur beobachteten Effekte, zusammengefasst in der folgenden Grafik (Abb. 64), dennoch reproduziert werden können.

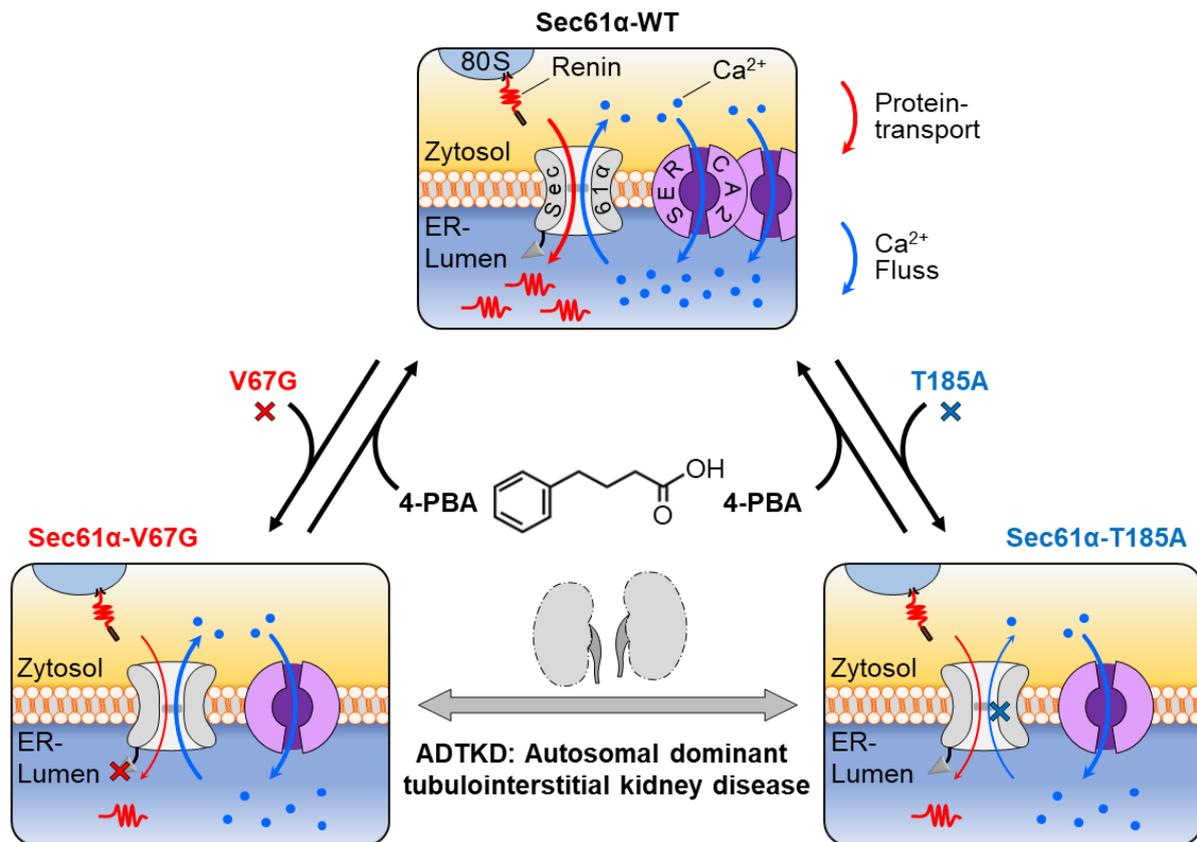


Abb. 64: Zusammenfassung der durch zur ADTKD führenden Effekte und deren Rettung durch den Einsatz von 4-PBA. Durch die Mutation V67G entsteht eine geringere Calciumkonzentration im ER, resultierend aus der verringerten SERCA2-Abundanz. Der Transport von Renin, aber auch Uromodulin ist eingeschränkt. Im Fall der T185A Mutante ist ebenfalls der Renin-Transport eingeschränkt und die Calciumkonzentration reduziert. Gleichzeitig ist der Sec61α vermittelte Calciumleak reduziert. Durch die Behandlung mit 4-PBA konnten sowohl Transport als auch Calciumhomöostase auf das Niveau des Wildtyps angepasst werden.

7.10. Vergleichbarkeit unterschiedlicher Sec61α-Mutationen.

In Säugerzellen sind nur wenige Mutanten für Sec61α bekannt, die in der Regel bereits einen Krankheitsphänotyp auslösen, wenn eines der beiden Allele mutiert ist. Die Y344H-Mutante bildet hier die Ausnahme, da diese im homozygoten Status einen diabetischen Phänotyp auslöst (Lloyd et al. 2010). Eine Gemeinsamkeit aller bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Mutanten ist, dass ein Defekt am deutlichsten in sekretorisch aktiven Zellen ausgeprägt ist, wie in der Niere (V67G und T185A), β -Zellen (Y344H) oder Plasmazellen (V85D), oder die Verringerung von Neutrophilen die Folge ist (V67G und Q92R) (Bolar et al. 2016; Lloyd et al. 2010; Schäuble et al. 2012; Schubert et al. 2018; Van Nieuwenhove et al. 2020). Wie bereits zuvor beschrieben, zeigen die Mutanten in den genannten Studien ähnliche Transportdefekte, die in Verbindung stehen könnten mit einer erhöhten Schwelle der Energie, die zum Öffnen des Kanals benötigt wird (Lang et al. 2017; Sicking et al. 2021). Ebenfalls ist in allen Mutanten eine Änderung der Calciumhomöostase festzustellen, die sich jedoch unterschiedlich ausprägen kann. Warum der Phänotyp trotz der globalen Expression des Sec61α in allen Zellen nur spezifische Defekte zeigt, ist nicht abschließend verstanden, aber steht vermutlich

mit der genannten starken Sekretionsaktivität der Zellen in Verbindung. Die Erkrankung/Symptome selbst sind daher vermutlich sekundäre Effekte, die aus dem Fehlen der jeweils spezifischen Transportsubstrate resultieren.

Daten aus den Modellorganismen Hefe und *E. coli* ermöglichen verschiedene Vergleiche zu den in der Arbeit behandelten Mutationen des Sec61-Komplexes. Aus der Hefe ist bekannt, dass der *plug*, die Struktur, in der die humane V67G Mutation lokalisiert ist, entscheidend ist für die Orientierung von Proteinen mit einer TMD (Junne et al. 2006). Gleiches gilt auch für eine Punktmutation in der *plug*-Region der Hefe, in der positive Ladungen entfernt wurden (Goder et al. 2004). Diese Ladungen im *plug* haben möglicherweise einen Einfluss auf die Anlagerung von Signalsequenzen oder TMD im Kanal und als Folge dessen auf die Orientierung der TMD in der Membran (Junne et al. 2006; Junne et al. 2007). Dieser Einfluss, im humanen System potenziell durch die Aminosäure R66 gegeben, könnte möglicherweise verstärkt sein, dadurch das sterisch gesehen mehr Platz entsteht, wenn das Valin in der V67G Mutation durch Glycin ersetzt wurde und so ein negativer Einfluss auf die Anlagerung der ebenfalls positiven N-Termini der Signalsequenzen resultiert. Erwähnung finden soll hier ebenfalls, dass die Behandlung mit 4-PBA auch hier einen sterischen Einfluss ausüben könnte, indem es in der Region des *plug* binden kann (Abb. 58B) speziell an die ebenfalls positiv geladene R73 und so diese Ladungen maskieren und den negativen Einfluss ausgleichen könnte. Von einem solchen direkten Ladungseffekt kann bei der humanen V67G Mutante nicht ausgegangen werden, da hier weder eine Ladung ersetzt noch eingebracht wird, adressiert wurde dies in der vorliegenden Studie jedoch nicht. Die benachbart zu V67 liegende R66K Mutante, welche im humanen System diese Ladung im *plug* widerspiegelt, wurde nicht auf potentielle Transportdefekte oder Änderungen der Calciumhomöostase untersucht, zeigte jedoch eine Insensitivität gegenüber Mycolacton (Ogbechi et al. 2018). Es kann jedoch vermutet werden, dass die Helix der *plug* Domäne eine geringere Stabilität bzw. höhere Flexibilität aufweist als Folge des Austausches von Valin zu Glycin. Dies lässt sich vermuten, zum einen da es sich bei Glycin um eine helixbrechende Aminosäure handelt und zum anderen, weil der Effekt einer gesteigerten Flexibilität nach einem Austausch von Alanin, einer ebenfalls unpolaren, nur durch eine CH₃ Gruppe zu Valin verschiedene Aminosäure, mit Glycin in anderen, Sec61 unabhängigen Studien, gezeigt wurde (López-Llano et al. 2006; Pace & Scholtz 1998; Scott et al. 2007). Diese Theorie der erhöhten Flexibilität des *plug* stimmt mit der Überlegung überein, dass Glycinreste an den Positionen 49 und 68 in der Sequenz des *M. jannaschii* Sec61 α die Bewegungspunkte sind, um den *plug* aus dem luminalen Teil herauszubewegen (Van den Berg et al. 2004). Als Folge daraus könnten die beschriebenen Effekte entstehen. Lokal am nächsten zu der T185A Mutante wäre die G184D Mutante zuzuordnen, die als *prlA* Mutante aus *E. coli* bekannt ist (Taura et al. 1994). Diese zeigt jedoch, untypischerweise für die *prlA* Mutanten, welche für eine gesteigerte Toleranz gegenüber

mutierten Signalpeptiden oder Substraten ohne Signalsequenz bekannt sind, keinerlei Effekt im Transport (Derman et al. 1993; Smith et al. 2005; Taura et al. 1994). Hier lässt sich dementsprechend ebenfalls kein Vergleich oder eine Verbindung zu der hier untersuchten Mutation erstellen.

Die bisher einzigen Daten im humanen System zu der V67G Mutante, wurden bei einer Studie zu angeborener Neutropenie erhoben. Der Vergleich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten ist nur bedingt möglich durch ein anderes experimentelles System. Transportsubstrate wie Sec61 β oder Cytb5 waren in beiden Studien nicht durch die Mutation beeinflusst. Allerdings wurde in der besagten Studie das Protein IVC deutlich schlechter transportiert, während in den hier gezeigten Experimenten kein Transportdefekt zu erkennen war. Ebenfalls stellt sich der Calciumphänotyp leicht verändert dar. Während in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass es keine Veränderung im Calciumleak der V67G-Zelllinie gibt, konnte dort ein leicht verringerter *leak* festgestellt werden (Van Nieuwenhove et al. 2020). Die Differenz zwischen den Ergebnissen kommt möglicherweise dadurch zustande, dass der *rescue* durch das Sec61A1-V67G nach der Depletion des endogenen Sec61 α nicht ausreichend war, wodurch die beobachteten Effekte, die mit den typischen Effekten einer Depletion von Sec61 α übereinstimmen, entstanden sein könnten (Lang et al. 2012). Die Autoren der Studie sind jedoch auch zu dem Schluss gekommen, dass der Phänotyp der SCN-Erkrankung durch den Transportdefekt bestimmter Substrate entsteht (Van Nieuwenhove et al. 2020). Das dieser Transportdefekt im Falle der Mutanten V67G und T185A die stärksten pathophysiologische Effekte in der Niere zur Folge hat, könnte gegebenenfalls durch die beiden beeinflussten Transportsubstrate Renin und Uromodulin erklärt werden. Diese sind, wie bereits beschrieben, entscheidend für die Entwicklung und Funktion der Niere und werden zudem nahezu ausschließlich von dieser exprimiert (Uromodulin aufsteigender Tubulus, Renin juxtaglomeruläre Zellen) (Bolar et al. 2016; Castrop et al. 2010; Lhotta 2010).

8. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen weitere Forschungsfragen, die in der Zukunft bearbeitet werden könnten, um ein tiefergehendes Verständnis für die hier beobachteten Effekte zu Erzeugen. Gleichzeitig bieten Sie den Anreiz zur technischen Optimierung und Erweiterung der genutzten Methoden.

Der humane SND Targetingweg zum Sec61-Komplex: Wen, wie, wann?

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Daten zeigen, dass TMEM109 ein Interaktionspartner von hSnd2 ist und dass beide Proteine zumindest transient dem Komplex des Translokons zugeordnet werden können. Hierbei stellt sich die Frage, unter welchen Bedingungen diese Interaktion zustande kommt, bzw. unter welchen Bedingungen der Transportweg in Anspruch genommen wird. Einen Hinweis darauf könnte in der Literatur zu finden sein, in der beschrieben wird, dass hSnd2 ein WH2F Motiv aufweist (Lei et al. 2020). Dieses interagiert mit dem unter Hypoxie aktivierten Transkriptionsfaktor HIF1 α und übt so eine Regulierung aus, deren Folgen bisher für hSnd2 nicht bestimmt ist (Lei et al. 2020; Semenza 2001). Möglicherweise wird der SND-Transportweg daher verstärkt in Anspruch genommen, wenn die Zelle unter Sauerstoffmangel leidet. Da bisher noch keine spezifischen Eigenschaften eines Substrates des SND-Transportweges ermittelt werden konnten, wäre der Einsatz einer Gesamtproteomanalyse vielversprechend. Hierbei wäre es möglich festzustellen, welche Proteine nach einer Depletion oder auch Deletion von hSnd2 in den Zellen reduziert sind, was auf eine Abhängigkeit hindeuten würde. Die Durchführung eines identischen Experimentes mit TMEM109 würde bei einer Überscheidung der Ergebnisse die funktionale Zusammengehörigkeit dieser beiden Proteine bestätigen.

Der Interaktionsnachweis könnte in der Zukunft ebenfalls spezifiziert werden, durch klassische Crosslink-, aber vor allem Pulldownexperimente mit Fragmenten von hSnd2 bzw. TMEM109. Die bisherigen Daten legen nahe, dass der N-Terminus von hSnd2 und der C Terminus von TMEM109 eine entscheidende Rolle hierfür spielen. Hierbei könnte auch gezeigt werden, genauso wie mit dem NanoBiT-System, ob eines der beiden Proteine mit dem Ribosom interagiert, wie es basierend auf dem Hefemodell vermutet werden könnte (Aviram et al. 2016). Sobald eine Substratspezifität ermittelt wurde, könnte diese ebenfalls mit Hilfe dieser Experimente bestätigt werden.

Des Weiteren abhängig von der Identifikation eines, im Idealfall, rein SND-abhängigen Transportsubstrates ist die Bestimmung der Einheit in der ER-Membran, die den Transport in bzw. über diese ermöglicht. Sollte diese absolute Abhängigkeit des Substrates gegeben sein, könnte man die unterschiedlichen Kandidaten, die als Insertase in Frage kommen silencen und so nachweisen, welche mit dem SND-Transportweg gemeinsam agiert. Aktuelle Studien,

sowie die in dieser Arbeit generierten Daten, weisen als den wahrscheinlichsten Kandidaten den Sec61-Komplex aus, jedoch sind sowohl in der Literatur, als auch in der Arbeit nicht alle potentiellen Kandidaten in den Studien adressiert worden (Aviram et al. 2016; Haßdenteufel et al. 2017; Yang et al. 2021).

Sec61 α -Verifizierung durch die Analyse von Patientenmaterial und Ausweitung der funktionellen Analyse

Ein entscheidender nächster Schritt wäre es, die bisher ermittelten Ergebnisse auf die nächste experimentelle Ebene zu übertragen. Das bedeutet zu evaluieren, ob in Mausmodellen ähnliche Effekte zu beobachten sind nach einer Gabe von 4-PBA. Dass das Medikament verträglich ist, konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden und auch dass es vermutlich wünschenswerte Effekte erzeugen könnte, wie die Erhöhung der SERCA-Proteinmenge (Iannitti & Palmieri 2011; Takada et al. 2012). Dies könnte möglicherweise den beobachteten reduzierten Calciumspiegel ausgleichen und so zu einem anderen Phänotyp der Krankheit führen. In Vorbereitung zu diesen Studien sollte überprüft werden, welche Effekte gesteigerte Konzentrationen von 4-PBA im Zellkulturmodell auslösen. Ein weiterer Folgeschritt, auch um möglicherweise die unterschiedlichen Phänotypen aller Sec61 α zu erklären, wäre zu überprüfen, ob der ATP-Haushalt durch die Veränderung am Sec61-Kanal beeinflusst ist. Dass ein Zusammenhang zwischen der ATP Homöostase und Sec61 α besteht, konnte bereits gezeigt werden, wie sich die Mutationen und der veränderte *leak* jedoch auswirken könnten, ist bis hierhin unbekannt (Klein et al. 2018). Interessant wäre es ebenfalls, ob in Schnitten der Nierenbiopsien der Patienten ähnliche Beobachtungen möglich wären wie im Zellkulturmodell, was bedeutet, dass diese mit verschiedenen Antikörpern angefärbt werden müssten. In Übereinstimmung mit den Patientendaten (Ausbildung von Fibrosen (Bolar et al. 2016)) konnte in den Analysen der RNA festgestellt werden, dass die mRNA verschiedener Proteine, die mit der Ausbildung von extrazellulärer Matrix in Verbindung stehen, in einem erhöhten Maße vorkommt. Ob diese veränderte mRNA-Menge auch eine veränderte Proteinabundanz zur Folge hat, könnte mit Hilfe von immunologischen Nachweisen erfolgen. Die *in vitro* Transporte könnten dadurch ausgebaut werden, dass praktisch überprüft wird, ob die Vorhersage der Abhängigkeit von der Ladung im N-Terminus in der Signalsequenz, bzw. der TMD zutrifft. Auch wäre es interessant zu ermitteln, ob die Behandlung mit Eeyarestatin1 ebenfalls einen Effekt auf den *in vitro* Transport ausübt. Theoretisch könnten Daten erwartet werden, die einen weniger inhibierten Transport in den mutierten Zelllinien zeigten, da Eeyarestatin1 eine geringere Effektivität gegenüber dem mutierten Sec61 α besitzt, da der Kanal weniger häufig geöffnet wird (Gamayun et al. 2019). Eeyarestatin kann daher als eine Art artifizielle Signalsequenz interpretiert werden. Dies würde eine direkte Verbindung zwischen den beiden Funktionen unter dem Einfluss der Mutationen schaffen. Zur Verifizierung der verschiedenen beobachteten Effekte, egal ob *live-cell calcium*

imaging oder *in vitro* Transport könnte ein silencing durchgeführt werden. Das Ziel wäre es, aus dem heterogenen Background der Zellen eine Proteinexpression zu generieren, in der der Anteil des mutierten Sec61 α überwiegt. Erreicht werden könnte dies durch die Verwendung einer siRNA gegen den nicht codierenden Bereich der mRNA von Sec61 α . Wenn sich hierdurch die Effekte wie ein verringerter Transport, oder ein reduzierter Calciumleak zusätzlich verschlechtern, kann dieser Effekt klar auf die Mutation zurückgeführt werden. Ob der Effekt potenziell durch den Verlust einer Interaktion mit einem der verschiedenen akzessorischen Proteine entsteht, könnte durch die Anwendung von Protein-Protein-Interaktionsassays, wie zum Beispiel dem NanoBiT, untersucht werden. Dies würde voraussetzen, dass durch die Mutation die Konformation des Sec61 α so verändert wäre, dass diese Interaktionen beeinflusst wären.

Optimierung der verwendeten Techniken

Limitierend für die wissenschaftliche Aussage ist in jedem Fall das experimentelle Vorgehen, weswegen die Optimierung und Validierung von Systemen immer gewünscht ist. Hierbei können die Experimente rund um hSnd2 betrachtet werden. In den Experimenten wurde der Nachweis erbracht, dass der C-Terminus des Proteins nicht luminal lokalisiert ist (Abb. 24; Abb. 25.). Hier empfiehlt sich diese Experimente zu ergänzen mit einem Nachweis, dass der Terminus auch cytosolisch lokalisiert ist, wie zum Beispiel durch den Nachweis der Phosphorylierung einer künstlich eingebrachten Phosphorylierungsstelle (Ubersax & Ferrell Jr 2007). Ebenfalls kann das NanoBiT-System technisch verbessert werden. Das System beruht auf einer Expression von Proteinen auf Plasmidbasis. Hierbei besteht immer das Risiko, dass einzelne Zellen nicht mit beiden Plasmiden transfiziert wurden bzw. diese Plasmide nicht die identische Expressionsstärke zeigen. Durch die Anwendung von sogenannten bicistronischen oder P2A-Vektoren, kann diese Problematik umgangen werden. Die P2A Linkersequenz zwischen zwei Fusionsproteinen beispielsweise ermöglicht während der ribosomalen Synthese des Proteins dessen intrinsische Spaltung, wodurch aus einem Genprodukt zwei unabhängige Proteine mit jedoch identischer Menge generiert werden (Liu et al. 2017; Nguyen et al. 2020).

Die im NanoBiT-System durchgeführte Kontrolle, ob die mit den *tags* erweiterten Proteine korrekt lokalisiert sind, gibt nur eine Aussage darüber, dass die jeweiligen Termini in das Zytosol ragen. Theoretisch ist es jedoch möglich, dass beide Proteine mislokalisiert in anderen Membranen vorliegen. Hier würde eine Ergänzung durch immunhistologische Färbung die Lokalisation in der Zelle verifizieren. Die nächste experimentelle Ebene wäre es, das System so zu manipulieren, dass Zustände geschaffen werden, unter denen bestimmte Interaktionen entstehen. Hier wäre eine „Programmierung“ des Assays durch die Verwendung von spezifischen Transportsubstraten in *in vitro* Transportversuchen denkbar, die zum Beispiel die

Interaktion mit dem SRP Rezeptor, dem Ribosom oder alternativ Sec62 fördern (Dudek et al. 2015; Lang et al. 2019). Auch der Transport der Substrate selbst könnte dadurch kontrolliert werden, dass die Substrate, die transportiert werden sollen durch den SmBiT markiert werden, während ein LgBiT Konstrukt, welches nur mit einer Signalsequenz und einer KDEL Sequenz versehen ist, im ER exprimiert wird und den erfolgreichen Transport anzeigt. Hier wäre die Verwendung des hochaffinen HaBiTs (Abb. 14C) für die Transportsubstrate eine Voraussetzung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des Translokons durch die Applikation von Puromycin beeinflussbar ist (Snapp et al. 2004). Hier bietet das NanoBiT System ebenfalls eine Möglichkeit, diese strukturelle Sensitivität in lebenden Zellen nachzuweisen. Dass der Einfluss von Mutationen der verschiedenen Trägerproteine auch zur Beeinflussung der Interaktionen führen können, wurde bereits in vorherigen Abschnitten diskutiert und angedacht.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die in dieser Arbeit präsentierten Daten es möglich war einen Interaktionspartner des hSnd2-Proteins zu identifizieren, das TMEM109-Protein. Beide zusammen bilden einen Teil des humanen SND-Proteintargetingweg aus. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transport über das Translokon stattfindet, da beide Proteine entweder mit einem oder mehreren Untereinheiten des Translokons interagieren. Dass es sich bei dessen Hauptkomponente, Sec61 α , um ein empfindlicher und entscheidender Akteur für das Gesamtsystem der Zelle handelt, konnte ebenfalls in dieser Arbeit anhand von zwei pathologischen Mutationen dieses Proteins gezeigt werden. Diese beeinflussen sowohl den Transport von Proteinen mittels Sec61 α als auch die Calciumhomöostase der Zelle, was weitreichende funktionelle Folgen hervorruft, die sich in einem pathologischen Phänotyp in Patienten äußert, der ADTKD Erkrankung.

9. Literaturverzeichnis

- Abeele, F. V., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2002). "Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells." *Cancer Cell* 1(2): 169-179.
- Abell, B. M., Pool, M. R., Schlenker, O., Sinning, I. and High, S. (2004). "Signal recognition particle mediates post-translational targeting in eukaryotes." *Embo J* 23(14): 2755-2764.
- Adam, J., Bollée, G., Fougeray, S., Noël, L.-H., Antignac, C., Knebelman, B. and Pallet, N. (2012). "Endoplasmic Reticulum Stress in *UMOD*-Related Kidney Disease: A Human Pathologic Study." *American Journal of Kidney Diseases* 59(1): 117-121.
- Ainavarapu, S. R. K., Brujic, J., Huang, H. H., Wiita, A. P., Lu, H., Li, L., Walther, K. A., Carrion-Vazquez, M., Li, H. and Fernandez, J. M. (2007). "Contour length and refolding rate of a small protein controlled by engineered disulfide bonds." *Biophys J* 92(1): 225-233.
- Ali, R., Ramadurai, S., Barry, F. and Nasheuer, H. P. (2018) "Optimizing fluorescent protein expression for quantitative fluorescence microscopy and spectroscopy using herpes simplex thymidine kinase promoter sequences." *FEBS open bio* 8, 1043-1060 DOI: 10.1002/2211-5463.12432.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.
- Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A. A. and Yu, Y. K. (2005). "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices." *Febs J* 272(20): 5101-5109.
- Ambudkar, I. S., de Souza, L. B. and Ong, H. L. (2017). "TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces." *Cell Calcium* 63: 33-39.
- Anghel, S. A., McGilvray, P. T., Hegde, R. S. and Keenan, R. J. (2017). "Identification of Oxa1 Homologs Operating in the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum." *Cell Rep* 21(13): 3708-3716.
- Asahi, M., Sugita, Y., Kurzydowski, K., De Leon, S., Tada, M., Toyoshima, C. and MacLennan, D. H. (2003). "Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9): 5040-5045.
- Asseck, L. Y., Mehlhorn, D. G., Monroy, J. R., Ricardi, M. M., Breuninger, H., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W., Nowrousian, M., Xing, S., Schwappach, B., Bayer, M. and Grefen, C. (2021). "Endoplasmic reticulum membrane receptors of the GET pathway are conserved throughout eukaryotes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(1): e2017636118.
- Ast, T., Cohen, G. and Schuldiner, M. (2013). "A network of cytosolic factors targets SRP-independent proteins to the endoplasmic reticulum." *Cell* 152(5): 1134-1145.
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E. and Brito-Melo, G. E. A. (2014). "Trypan blue exclusion assay by flow cytometry." *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 47(4): 307-315.
- Aviram, N., Ast, T., Costa, E. A., Arakel, E. C., Chuartzman, S. G., Jan, C. H., Haßdenteufel, S., Dudek, J., Jung, M., Schorr, S., Zimmermann, R., Schwappach, B., Weissman, J. S. and Schuldiner, M. (2016). "The SND proteins constitute an alternative targeting route to the endoplasmic reticulum." *Nature* 540(7631): 134-138.
- Aviram, N. and Schuldiner, M. (2017). "Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance." *J Cell Sci* 130(24): 4079-4085.
- Axelrod, V. D. and Kramer, F. R. (1985). "Transcription from bacteriophage T7 and SP6 RNA polymerase promoters in the presence of 3'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate chain terminators." *Biochemistry* 24(21): 5716-5723.
- Ayasreh, N., Miquel, R., Matamala, a., Ars, E. and Torra, R. (2017). "A review on autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease." *Nefrologia (english Edition)* 37(3): 235-243.

- Bachmann, S., Koeppen-Hagemann, I. and Kriz, W. (1985). "Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry." *Histochemistry* 83(6): 531-538.
- Bachmann, S., Metzger, R. and Bunnemann, B. (1990). "Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney." *Histochemistry* 94(5): 517-523.
- Bagur, R. and Hajnóczky, G. (2017). "Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling." *Molecular Cell* 66(6): 780-788.
- Bai, L., You, Q., Feng, X., Kovach, A. and Li, H. (2020). "Structure of the ER membrane complex, a transmembrane-domain insertase." *Nature* 584(7821): 475-478.
- Baker, H. L., Errington, R. J., Davies, S. C. and Campbell, A. K. (2002). "A Mathematical Model Predicts that Calreticulin Interacts with the Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase." *Biophys J* 82(2): 582-590.
- Bañó-Polo, M., Martínez-Garay, C. A., Grau, B., Martínez-Gil, L. and Mingarro, I. (2017). "Membrane insertion and topology of the translocon-associated protein (TRAP) gamma subunit." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859(5): 903-909.
- Barrero, M. J., Montero, M. and Alvarez, J. (1997). "Dynamics of [Ca²⁺] in the Endoplasmic Reticulum and Cytoplasm of Intact HeLa Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272(44): 27694-27699.
- Batshaw, M. L., MacArthur, R. B. and Tuchman, M. (2001). "Alternative pathway therapy for urea cycle disorders: twenty years later." *J Pediatr* 138(1 Suppl): 111836.
- Baues, M., Klinkhammer, B. M., Ehling, J., Gremse, F., van Zandvoort, M. A. M. J., Reutelingsperger, C. P. M., Daniel, C., Amann, K., Bábíčková, J., Kiessling, F., Floege, J., Lammers, T. and Boor, P. (2020). "A collagen-binding protein enables molecular imaging of kidney fibrosis in vivo." *Kidney Int* 97(3): 609-614.
- Baum, D. A. and Baum, B. (2014). "An inside-out origin for the eukaryotic cell." *BMC Biology* 12(1): 76.
- Bause, E. and Legler, G. (1981). "The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis." *Biochem J* 195(3): 639-644.
- Beck, B. B., Trachtman, H., Gitman, M., Miller, I., Sayer, J. A., Pannes, A., Baasner, A., Hildebrandt, F. and Wolf, M. T. F. (2011). "Autosomal dominant mutation in the signal peptide of renin in a kindred with anemia, hyperuricemia, and CKD." *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 58(5): 821-825.
- Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J.-P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., Westhof, E., Gilmore, R., Mandon, E. C. and Beckmann, R. (2009). "Structure of Monomeric Yeast and Mammalian Sec61 Complexes Interacting with the Translating Ribosome." *Science* 326(5958): 1369-1373.
- Beecroft, M. D. and Taylor, C. W. (1998). "Luminal Ca²⁺ regulates passive Ca²⁺ efflux from the intracellular stores of hepatocytes." *Biochem J* 334(Pt 2): 431-435.
- Beierwaltes, W. H. (2010). "The role of calcium in the regulation of renin secretion." *American journal of physiology. Renal physiology* 298(1): F1-F11.
- Benarroch, R., Austin, J. M., Ahmed, F. and Isaacson, R. L. (2019). "The roles of cytosolic quality control proteins, SGTA and the BAG6 complex, in disease." *Advances in protein chemistry and structural biology* 114: 265-313.
- Bernofsky, C. and Wanda, S. Y. (1982). "Formation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide peroxide." *Journal of Biological Chemistry* 257(12): 6809-6817.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Bers, D. M. (1997). "Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle." *Basic Res Cardiol* 1: 1-10.

- Bers, D. M. (2014). "Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction." *Annu Rev Physiol* 76: 107-127.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. and Ron, D. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* 2(6): 326-332.
- Besse, W., Dong, K., Choi, J., Punia, S., Fedeles, S. V., Choi, M., Gallagher, A.-R., Huang, E. B., Gulati, A., Knight, J., Mane, S., Tahvanainen, E., Tahvanainen, P., Sanna-Cherchi, S., Lifton, R. P., Watnick, T., Pei, Y. P., Torres, V. E. and Somlo, S. (2017). "Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function." *J Clin Invest* 127(5): 1772-1785.
- Besserer, G. M., Ottolia, M., Nicoll, D. A., Chaptal, V., Cascio, D., Philipson, K. D. and Abramson, J. (2007). "The second Ca²⁺-binding domain of the Na⁺ Ca²⁺ exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(47): 18467-18472.
- Bhadra, P., Yadhanapudi, L., Römisch, K. and Helms, V. (2021). "How does Sec63 affect the conformation of Sec61 in yeast?" *PLOS Computational Biology* 17(3): e1008855.
- Bleyer, A. J., Hart, P. S. and Knoch, S. (2007, 30.06.2020). "Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease, UMOD-Related." *GeneReviews* Retrieved 05.05.2020, 2020.
- Bleyer, A. J., Kidd, K., Živná, M. and Knoch, S. (2017). "Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease." *Adv Chronic Kidney Dis* 24(2): 86-93.
- Bleyer, A. J. and Knoch, S. (2013, 30.06.2016). "Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease, MUC1-Related." *GeneReviews* Retrieved 05.05.2020, 2020.
- Bleyer, A. J. and Knoch, S. (2014). "Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: of names and genes." *Kidney Int* 86(3): 459-461.
- Bleyer, A. J., Knoch, S., Antignac, C., Robins, V., Kidd, K., Kelsoe, J. R., Hladik, G., Klemmer, P., Knohl, S. J., Scheinman, S. J., Vo, N., Santi, A., Harris, A., Canaday, O., Weller, N., Hulick, P. J., Vogel, K., Rahbari-Oskoui, F. F., Tuazon, J., Deltas, C., Somers, D., Megarbane, A., Kimmel, P. L., Sperati, C. J., Orr-Urtreger, A., Ben-Shachar, S., Waugh, D. A., McGinn, S., Bleyer, A. J., Jr., Hodanová, K., Vylet'al, P., Živná, M., Hart, T. C. and Hart, P. S. (2014). "Variable clinical presentation of an MUC1 mutation causing medullary cystic kidney disease type 1." *Clin J Am Soc Nephrol* 9(3): 527-535.
- Bol, R., de Wit, J. G. and Driessen, A. J. (2007). "The active protein-conducting channel of *Escherichia coli* contains an apolar patch." *J Biol Chem* 282(41): 29785-29793.
- Bolar, N. A., Golzio, C., Živná, M., Hayot, G., Van Hemelrijk, C., Schepers, D., Vandeweyer, G., Hoischen, A., Huyghe, J. R., Raes, A., Matthys, E., Sys, E., Azou, M., Gubler, M. C., Praet, M., Van Camp, G., McFadden, K., Padiaditakis, I., Pristoupilova, A., Hodanova, K., Vyletal, P., Hartmannova, H., Stranecky, V., Hulkova, H., Baresova, V., Jedlickova, I., Sovova, J., Hnizda, A., Kidd, K., Bleyer, A. J., Spong, R. S., Vande Walle, J., Mortier, G., Brunner, H., Van Laer, L., Knoch, S., Katsanis, N. and Loeys, B. L. (2016). "Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia." *Am J Hum Genet* 99(1): 174-187.
- Bolden, J. E., Peart, M. J. and Johnstone, R. W. (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(9): 769-784.
- Bond, S. R. and Naus, C. C. (2014). "The pannexins: past and present." *Front Physiol* 5: 58-58.
- Bootman, M. D. (2012). "Calcium signaling." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(7): a011171-a011171.
- Borgese, N. (2020). "Searching for remote homologs of CAML among eukaryotes." *Traffic* 21(10): 647-658.
- Borgese, N., Colombo, S. and Pedrazzini, E. (2003). "The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane." *The Journal of Cell biology* 161(6): 1013-1019.
- Borgese, N., Coy-Vergara, J., Colombo, S. F. and Schwappach, B. (2019). "The Ways of Tails: the GET Pathway and more." *The Protein Journal* 38(3): 289-305.
- Bradford, M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 2(1-2): 248-254.

- Britsch, S. (2007). "The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease." *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190: 1-65.
- Brodsky, J. L., Goeckeler, J. and Schekman, R. (1995). "BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the endoplasmic reticulum." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9643-9646.
- Brodsky, J. L. and Schekman, R. (1993). "A Sec63-BiP complex is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome." *J. Cell Biol.* 123: 1355-1263.
- Bruce, J. I. E. (2018). "Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival." *Cell Calcium* 69: 28-36.
- Buchner, J. (2019). "Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series." *J Biol Chem* 294(6): 2074-2075.
- Burns, C. M. and Wortmann, R. L. (2012). "Latest evidence on gout management: what the clinician needs to know." *Therapeutic advances in chronic disease* 3(6): 271-286.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V. (2002). "Calcium leak from intracellular stores - the enigma of calcium signalling." *Cell Calcium* 32(5-6): 355-361.
- Cannon, K. S., Or, E., Clemons, W. M., Jr., Shibata, Y. and Rapoport, T. A. (2005). "Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY." *J Cell Biol* 169(2): 219-225.
- Cantenero, C., Sanchez-Collado, J., Gonzalez-Nuñez, M. A., Salido, G. M., Lopez, J. J., Jardin, I. and Rosado, J. A. (2019). "Store-independent Orai1-mediated Ca(2+) entry and cancer." *Cell Calcium* 80: 1-7.
- Capozzi, F., Casadei, F. and Luchinat, C. (2006). "EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view." *J Biol Inorg Chem* 11(8): 949-962.
- Carducci, M. A., Gilbert, J., Bowling, M. K., Noe, D., Eisenberger, M. A., Sinibaldi, V., Zabelina, Y., Chen, T. L., Grochow, L. B. and Donehower, R. C. (2001). "A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule." *Clin Cancer Res* 7(10): 3047-3055.
- Casson, J., McKenna, M., Haßdenteufel, S., Aviram, N., Zimmerman, R. and High, S. (2017). "Multiple pathways facilitate the biogenesis of mammalian tail-anchored proteins." *J Cell Sci* 130(22): 3851-3861.
- Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. and Wagner, C. (2010). "Physiology of Kidney Renin." *Physiological Reviews* 90(2): 607-673.
- Chamerlin, M. and Ring, J. (1973). "Characterization of T7-specific Ribonucleic Acid polymerase." *The Journal of Biological Chemistry* 248(6): 2235-2244.
- Chami, M., Gozuacik, D., Lagorce, D., Brini, M., Falson, P., Peaucellier, G., Pinton, P., Lecoq, H., Gougeon, M.-L., le Maire, M., Rizzuto, R., Bréchet, C. and Paterlini-Bréchet, P. (2001). "Serca1 Truncated Proteins Unable to Pump Calcium Reduce the Endoplasmic Reticulum Calcium Concentration and Induce Apoptosis." *The Journal of Cell biology* 153(6): 1301-1314.
- Chang, C. and Yoshida, A. (1997). "Human fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH10): organization and tissue-dependent expression." *Genomics* 40(1): 80-85.
- Chang, J., Lee, S. and Blackstone, C. (2013). "Protrudin binds atlastins and endoplasmic reticulum-shaping proteins and regulates network formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(37): 14954-14959.
- Charizopoulou, N., Lelli, A., Schradars, M., Ray, K., Hildebrand, M. S., Ramesh, A., Srisailapathy, C. R. S., Oostrik, J., Admiraal, R. J. C., Neely, H. R., Latoche, J. R., Smith, R. J. H., Northup, J. K., Kremer, H., Holt, J. R. and Noben-Trauth, K. (2011). "Gipc3 mutations associated with audiogenic seizures and sensorineural hearing loss in mouse and human." *Nat Commun* 2(1): 201.
- Chen, L., Koh, D.-S. and Hille, B. (2003). "Dynamics of Calcium Clearance in Mouse Pancreatic β -Cells." *Diabetes* 52(7): 1723-1731.
- Chen, T.-W., Wardill T. J., Pulver S. R., Renninger S. L., Baohan A., Schreiter W. R., Kerr R. A., Orger M. B., Jayaraman V., Looger L. L., Svoboda K. and S., K. D. (2013). "Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity." *Nature* 499(7458): 295-300.

- Chen, Y., Shanmugam, S. K. and Dalbey, R. E. (2019). "The Principles of Protein Targeting and Transport Across Cell Membranes." *The Protein Journal* 38(3): 236-248.
- Cheng, Z., Jiang, Y., Mandon, E. C. and Gilmore, R. (2005). "Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation." *J. Cell Biol.* 168(1): 67-77.
- Cherepanova, N., Shrimal, S. and Gilmore, R. (2016). "N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum." *Curr Opin Cell Biol* 41: 57-65.
- Chitwood, P. J., Juszkiewicz, S., Guna, A., Shao, S. and Hegde, R. S. (2018). "EMC Is Required to Initiate Accurate Membrane Protein Topogenesis." *Cell* 175(6): 1507-1519.
- Choi, S., Maleth, J., Jha, A., Lee, K. P., Kim, M. S., So, I., Ahuja, M. and Muallem, S. (2014). "The TRPCs-STIM1-Orai interaction." *Handb Exp Pharmacol* 223: 1035-1054.
- Choi, S. W., Ryu, O. H., Choi, S. J., Song, I. S., Bleyer, A. J. and Hart, T. C. (2005). "Mutant tamm-horsfall glycoprotein accumulation in endoplasmic reticulum induces apoptosis reversed by colchicine and sodium 4-phenylbutyrate." *J Am Soc Nephrol* 16(10): 3006-3014.
- Chun, J., Wang, M., Wilkins, M. S., Knob, A. U., Benjamin, A., Bu, L. and Pollak, M. R. (2020). "Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease-Uromodulin Misclassified as Focal Segmental Glomerulosclerosis or Hereditary Glomerular Disease." *Kidney Int Rep* 5(4): 519-529.
- Churchill, P. C. (1985). "Second messengers in renin secretion." *Am J Physiol* 249(2 Pt 2).
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." *Cell* 131(6): 1047-1058.
- Clarke, A. P. (1898). "Development of the vital Force: A Physiologic consideration of some of the features." *Journal of the American Medical Association* XXXI(26): 1525-1527.
- Clissold, R. L., Hamilton, A. J., Hattersley, A. T., Ellard, S. and Bingham, C. (2015). "HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum." *Nat Rev Nephrol* 11(2): 102-112.
- Coe, H. and Michalak, M. (2009). "Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." *General physiology and biophysics* 28(Focus Issue): F96-F103.
- Colombo, S. F., Cardani, S., Maroli, A., Vitiello, A., Soffientini, P., Crespi, A., Bram, R. F., Benfante, R. and Borgese, N. (2016). "Tail-anchored Protein Insertion in Mammals: FUNCTION AND RECIPROCAL INTERACTIONS OF THE TWO SUBUNITS OF THE TRC40 RECEPTOR." *The Journal of Biological Chemistry* 291(29): 15292-15306.
- Consortium, T. U. (2020). "UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021." *Nucleic Acids Research* 49(D1): D480-D489.
- Conti, B. J., Devaraneni, P. K., Yang, Z., David, L. L. and Skach, W. R. (2015). "Cotranslational stabilization of Sec62/63 within the ER Sec61 translocon is controlled by distinct substrate-driven translocation events." *Mol Cell* 58(2): 269-283.
- Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M. and Piacentini, M. (2017). "Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate." *Frontiers in oncology* 7: 78-78.
- Cortez, L. and Sim, V. (2014). "The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases." *Prion* 8(2): 197-202.
- Crick, F. (1970). "Central dogma of Molecular Biology." *Nature* 227(5258): 561-563.
- Crisafuli, F. A. P. R., E. B.; Rocha, M. S. (2015). "Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain." *Eur Biophys J* 44(1-2): 1-7.
- Cullis, P. R. and Hope, M. J. (2017). "Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies." *Mol Ther* 25(7): 1467-1475.
- Cymer, F., von Heijne, G. and White, S. H. (2015). "Mechanisms of integral membrane protein insertion and folding." *Journal of molecular biology* 427(5): 999-1022.
- D'Angelo, M. A. and Hetzer, M. W. (2006). "The role of the nuclear envelope in cellular organization." *Cellular and Molecular Life Science* 63(3): 316-332.
- Dahan, K., Devuyt, O., Smaers, M., Vertommen, D., Loute, G., Poux, J. M., Viron, B., Jacquot, C., Gagnadoux, M. F., Chauveau, D., Büchler, M., Cochat, P., Cosyns, J. P., Mougenot, B., Rider, M. H., Antignac, C., Verellen-Dumoulin, C. and Pirson, Y. (2003). "A cluster of mutations in the

- UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin." *J Am Soc Nephrol* 14(11): 2883-2893.
- Dalbeth, N. and Stamp, L. (2007). "Allopurinol Dosing in Renal Impairment: Walking the Tightrope Between Adequate Urate Lowering and Adverse Events." *Seminars in Dialysis* 20(5): 391-395.
- Dally, S., Corvazier, E., Bredoux, R., Bobe, R. and Enouf, J. (2010). "Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 48(4): 633-644.
- Davies, J. and Jimenez, A. (1980). "A New Selective Agent for Eukaryotic Cloning Vectors." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29(5_Part_2): 1089-1092.
- Davis, Eric M., Kim, J., Menasche, Bridget L., Sheppard, J., Liu, X., Tan, A.-C. and Shen, J. (2015). "Comparative Haploid Genetic Screens Reveal Divergent Pathways in the Biogenesis and Trafficking of Glycophosphatidylinositol-Anchored Proteins." *Cell Rep* 11(11): 1727-1736.
- de Juan-Sanz, J., Holt, G. T., Schreiter, E. R., de Juan, F., Kim, D. S. and Ryan, T. A. (2017). "Axonal Endoplasmic Reticulum Ca(2+) Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals." *Neuron* 93(4): 867-881 e866.
- DeLano, W. L. (2002). "Pymol an open-source molecular graphics tool." *CCP4 Newsletter Pro. Crystallogr.* 40(1): 82-92.
- Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N.-A., Kudva, R. and Koch, H.-G. (2014). "The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes." *Molecular Membrane Biology* 31(2-3): 58-84.
- Derman, A. I., Puziss, J. W., Bassford, P. J., Jr. and Beckwith, J. (1993). "A signal sequence is not required for protein export in *prlA* mutants of *Escherichia coli*." *The EMBO Journal* 12(3): 879-888.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A. and Schekman, R. (1991). "Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex." *Nature* 349: 806-808.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. (1987). "A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum." *J. Cell Biol.* 105: 633-645.
- Devaraneni, P. K., Conti, B., Matsumura, Y., Yang, Z., Johnson, A. E. and Skach, W. R. (2011). "Stepwise Insertion and Inversion of a Type II Signal Anchor Sequence in the Ribosome-Sec61 Translocon Complex." *Cell* 146(1): 134-147.
- Devuyst, O., Olinger, E., Weber, S., Eckardt, K. U., Knoch, S., Rampoldi, L. and Bleyer, A. J. (2019). "Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease." *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 60.
- Dietrich, A., Fahlbusch, M. and Gudermann, T. (2014). "Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator?" *Cells* 3(4): 939-962.
- Dittner-Moormann, S., Lourenco, C. M., Reunert, J., Nishinakamura, R., Tanaka, S. S., Werner, C., Debus, V., Zimmer, K.-P., Wetzels, G., Naim, H. Y., Wada, Y., Rust, S. and Marquardt, T. (2021). "TRAPγ-CDG shows asymmetric glycosylation and an effect on processing of proteins required in higher organisms." *Journal of Medical Genetics* 58(3): 213.
- Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G., Eggers, C. T., Encell, L. P. and Wood, K. V. (2016). "NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells." *ACS Chemical Biology* 11(2): 400-408.
- Djudjaj, S. and Boor, P. (2019). "Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis." *Mol Aspects Med* 65: 16-36.
- Døskeland, S. O., Maronde, E. and Gjertsen, B. T. (1993). "The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase-Functionally different of redundant." *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) - Moleculare Cell Research* 1178(3): 249-258.
- Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., Müller, L. and Zimmermann, R. (2009). "Functions and pathologies of BiP and its interaction partners." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66(9): 1556-1569.

- Dudek, J., Pfeffer, S., Lee, P.-H., Jung, M., Cavalié, A., Helms, V., Förster, F. and Zimmermann, R. (2015). "Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum." *Journal of molecular biology* 27(427 (6 Pt A)): 1159-1175.
- Duksin, D. and Mahoney, W. C. (1982). "Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin." *J Biol Chem* 257(6): 3105-3109.
- Dunn, T. (1997). "Oxygen and cancer." *N C Med J* 58(2): 140-143.
- Eckardt, K. U., Alper, S. L., Antignac, C., Bleyer, A. J., Chauveau, D., Dahan, K., Deltas, C., Hosking, A., Knoch, S., Rampoldi, L., Wiesener, M., Wolf, M. T. and Devuyt, O. (2015). "Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management--A KDIGO consensus report." *Kidney Int* 88(4): 676-683.
- Egea, P. F. and Stroud, R. M. (2010). "Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(40): 17182-17187.
- Ekici, O. D., Karla, A., Paetzl, M., Lively, M. O., Pei, D. and Dalbey, R. E. (2007). "Altered -3 substrate specificity of Escherichia coli signal peptidase 1 mutants as revealed by screening a combinatorial peptide library." *J Biol Chem* 282(1): 417-425.
- Emkey, R. D. and Emkey, G. R. (2012). "Calcium metabolism and correcting calcium deficiencies." *Endocrinol Metab Clin North Am* 41(3): 527-556.
- England, C. G., Ehlerding, E. B. and Cai, W. (2016). "NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence." *Bioconjugate chemistry* 27(5): 1175-1187.
- English, A. R., Zurek, N. and Voeltz, G. K. (2009). "Peripheral ER structure and function." *Curr Opin Cell Biol* 21(4): 596-602.
- Erdmann, F., Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Honigmann, A., Ahmad, M., Dudek, J., Benedix, J., Harsman, A., Kopp, A., Helms, V., Cavalié, A., Wagner, R. and Zimmermann, R. (2011). "Interaction of calmodulin with Sec61alpha limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum." *EMBO Journal* 30(1): 17-31.
- Espino-Hernández, M., Palma Milla, C., Vara-Martín, J. and González-Granado, L. I. (2020). De novo SEC61A1 mutation in autosomal dominant tubulo-interstitial kidney disease: Phenotype expansion and review of literature, *J Paediatr Child Health*. 2020 Nov 13. doi: 10.1111/jpc.15148.
- Fagone, P. and Jackowski, S. (2009). "Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function." *J Lipid Res* 50 Suppl: S311-316.
- Falcone, D., Henderson, M. P., Nieuwland, H., Coughlan, C. M., Brodsky, J. L. and Andrews, D. W. (2011). "Stability and function of the Sec61 translocation complex depends on the Sss1p tail-anchor sequence." *Biochemical Journal* 436(2): 291-303.
- Fecher-Trost, C., Wissenbach, U., Beck, A., Schalkowsky, P., Stoerger, C., Doerr, J., Dembek, A., Simon-Thomas, M., Weber, A., Wollenberg, P., Ruppert, T., Middendorff, R., Maurer, H. H. and Flockerzi, V. (2013). "The in vivo TRPV6 protein starts at a non-AUG triplet, decoded as methionine, upstream of canonical initiation at AUG." *J Biol Chem* 288(23): 16629-16644.
- Fedeles, S. V., Gallagher, A. R. and Somlo, S. (2014). "Polycystin-1: a master regulator of intersecting cystic pathways." *Trends Mol Med* 20(5): 251-260.
- Feinmann, R., Clarke, K. and Harrison, L. (2002). "Phenylbutyrate-induced apoptosis is associated with inactivation of NF-κB in HT-29 colon cancer cells." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 49(1): 27-34.
- Fleischer, T. C., Weaver, C. M., McAfee, K. J., Jennings, J. L. and Link, A. J. (2006). "Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes." *Genes & Development* 20(10): 1294-1307.
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. and Rothman, J. E. (1991). "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP." *Nature* 353: 726-730.
- Frenkel, N., Makky, A., Sudji, I. R., Wink, M. and Tanaka, M. (2014). "Mechanistic investigation of interactions between steroidal saponin digitonin and cell membrane models." *J Phys Chem B* 118(50): 14632-14639.

- Friedman, J. R. and Voeltz, G. K. (2011). "The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network." *Trends in Cell Biology*(0).
- Fulga, T. A., Sinning, I., Dobberstein, B. and Pool, M. R. (2001). "SRbeta coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the translocon." *Embo J* 20(9): 2338-2347.
- Gamayun, I., O'Keefe, S., Pick, T., Klein, M.-C., Nguyen, D., McKibbin, C., Piacenti, M., Williams, h. M., Flitsch, S. L., Whitehead, R. C., Swanton, W., Helms, V., High, S., Zimmermann, R. and Cavalié, A. (2019). "Eeyarestatin Compounds Selectively Enhance Sec61-Mediated Ca²⁺ Leakage from the Endoplasmic Reticulum." *Cell Chemical Biology* 26(4): 571-583.
- Gao, P., Yan, Z. and Zhu, Z. (2020). "Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases." *Frontiers in cell and developmental biology* 8: 604240-604240.
- Gemmer, M. and Förster, F. (2020). "A clearer picture of the ER translocon complex." *J Cell Sci* 133(3).
- George, C. H. (2007). "Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure: mere observation or functional relevance?" *Cardiovascular Research* 77(2): 302-314.
- Ghosh, A., Khandelwal, N., Kumar, A. and Bera, A. K. (2017). "Leucine-rich repeat-containing 8B protein is associated with the endoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in HEK293 cells." *J Cell Sci* 130(22): 3818-3828.
- Gierasch, L. M. (1989). "Signal sequences." *Biochemistry* 28(3): 923-930.
- Gilmore, R., Walter, P. and Blobel, G. (1982b). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor." *J. Cell Biol.* 95: 470-477.
- Ginger, R. S., Askew, S. E., Ogborne, R. M., Wilson, S., Ferdinando, D., Dadd, T., Smith, A. M., Kazi, S., Szerencsei, R. T., Winkfein, R. J., Schnetkamp, P. P. M. and Green, M. R. (2008). "SLC24A5 Encodes a trans-Golgi Network Protein with Potassium-dependent Sodium-Calcium Exchange Activity That Regulates Human Epidermal Melanogenesis*." *Journal of Biological Chemistry* 283(9): 5486-5495.
- Goder, V., Junne, T. and M., S. (2004). "Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule." *Mol Biol Cell* 15(3): 1470-1478.
- Goder, V. and Spiess, M. (2001). "Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics." *FEBS Letters* 504(3): 87-93.
- Gogala, M., Becker, T., Beatrix, B., Armache, J.-P., C. Barrio-Garcia, Berninghausen, O. and Beckmann, R. (2014). "Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion." *Nature* 506(7486): 107-110.
- Gomez, R. A. and Sequeira-Lopez, M. L. S. (2016). "Novel Functions of Renin Precursors in Homeostasis and Disease." *Physiology (Bethesda, Md.)* 31(1): 25-33.
- Gonzalez, A., Nieves, J., Leon, D. A., Bringas Vega, M. L. and Sosa, P. V. (2021). "Gene expression rearrangements denoting changes in the biological state." *Scientific Reports* 11(1): 8470.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U. and Rapoport, T. A. (1992a). "A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation." *Cell* 71: 489-503.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977). "Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5." *Journal of General Virology* 36(1): 59-72.
- Greer III, L. F. and Szalay, A. A. (2002). "Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review." *Luminescence* 17(1): 43-74.
- Grupe, A., Li, Y., Rowland, C., Nowotny, P., Hinrichs, A. L., Smemo, S., Kauwe, J. S. K., Maxwell, T. J., Cherny, S., Doil, L., Tacey, K., Luchene, R. v., Myers, A., Vrie`ze, F. W.-D., Kaleem, M., Hollingworth, P., Jehu, L., Foy, C., Archer, N., Hamilton, G., Holmans, P., Morris, C. M., Catanese, J., Sninsky, J., White, T. J., Powell, J., Hardy, J., O'Donovan, M., Lovestone, S., Jones, L., Morris, J. C., Thal, L., Owen, M., Williams, J. and Goate, A. (2006). "A scan of Chromosome 10 identifies a Novel Locus showing Strong association with Late-onset Alzheimer Disease." *Am J Hum Genet* 78(1): 78-88.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *Journal of Biological Chemistry* 260(6): 3440-3450.

- Gubler, M. C. and Antignac, C. (2010). "Renin-angiotensin system in kidney development: renal tubular dysgenesis." *Kidney Int* 77(5): 400-406.
- Gültekin, H. and Heermann, K. H. (1988). "The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix." *Analytical Biochemistry* 172(2): 320-329.
- Gumbart, J. and Schulten, K. (2006). "Molecular Dynamics Studies of the Archaeal Translocon." *Biophys J* 90(7): 2356-2367.
- Gumbart, J., Trabuco, L. G., Schreiner, E., Villa, E. and Schulten, K. (2009). "Regulation of the Protein-Conducting Channel by a Bound Ribosome." *Structure (London, England : 1993)* 17(11): 1453-1464.
- Guna, A. and Hegde, R. S. (2018). "Transmembrane Domain Recognition during Membrane Protein Biogenesis and Quality Control." *Curr Biol* 28(8): R498-R511.
- Guna, A., Volkmar, N., Christianson, J. C. and Hegde, R. S. (2018). "The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase." *Science* 359(6374): 470-473.
- Guo, H., Sun, J., Li, X., Xiong, Y., Wang, H., Shu, H., Zhu, R., Liu, Q., Huang, Y., Madley, R., Wang, Y., Cui, J., Arvan, P. and Liu, M. (2018a). "Positive charge in the n-region of the signal peptide contributes to efficient post-translational translocation of small secretory preproteins." *The Journal of Biological Chemistry* 293(6): 1899-1907.
- Guo, Y., Li, D., Zhang, S., Yang, Y., Liu, J.-J., Wang, X., Liu, C., Milkie, D. E., Moore, R. P., Tulu, U. S., Kiehart, D. P., Hu, J., Lippincott-Schwartz, J., Betzig, E. and Li, D. (2018b). "Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales." *Cell* 175(5): 1430-1442.e1417.
- Guseman, A. J., Speer, S. L., Perez Goncalves, G. M. and Pielak, G. J. (2018). "Surface Charge Modulates Protein-Protein Interactions in Physiologically Relevant Environments." *Biochemistry* 57(11): 1681-1684.
- Haas, I. G. (1994). "BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum." *Experientia* 50(11-12): 1012-1020.
- Haefliger, J.-A., Krattinger, N., Martin, D., Pedrazzini, T., Capponi, A., Döring, B., Plum, A., Charollais, A., Willecke, K. and Meda, P. (2006). "Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension." *The Journal of Clinical Investigation* 116(2): 405-413.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Frank, J. and Beckmann, R. (2004). "Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome." *Nature* 427(6977): 808-814.
- Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., Robers, M. B., Benink, H. A., Eggers, C. T., Slater, M. R., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Fan, F., Encell, L. P. and Wood, K. V. (2012). "Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate." *ACS Chem Biol* 7(11): 1848-1857.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hande, K. R., Noone, R. M. and Stone, W. J. (1984). "Severe allopurinol toxicity. Description and guidelines for prevention in patients with renal insufficiency." *Am J Med* 76(1): 47-56.
- Harsman, A., Kopp, A., Wagner, R., Zimmermann, R. and Jung, M. (2011c). "Calmodulin regulation of the calcium-leak channel Sec61 is unique to vertebrates." *Channels* 5(4): 293-298.
- Hart, T. C., Gorry, M. C., Hart, P. S., Woodard, A. S., Shihabi, Z., Sandhu, J., Shirts, B., Xu, L., Zhu, H., Barmada, M. M. and Bleyer, A. J. (2002). "Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy." *J Med Genet* 39(12): 882-892.
- Hartmann, E., Görlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knespel, S., Bürger, E., Rapoport, T. A. and Prehn, S. (1993). "A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum." *Eur. J. Biochem.* 214: 375-381.
- Hassan, M. T. and Lytton, J. (2020). "Potassium-dependent sodium-calcium exchanger (NCKX) isoforms and neuronal function." *Cell Calcium* 86: 102135.

- Haßdenteufel, S., Johnson, N., Paton, A. W., Paton, J. C., High, S. and Zimmermann, R. (2018). "Chaperone-Mediated Sec61 Channel Gating during ER Import of Small Precursor Proteins Overcomes Sec61 Inhibitor-Reinforced Energy Barrier." *Cell Rep* 23(5): 1373-1386.
- Haßdenteufel, S., Nguyen, D., Helms, V., Lang, S. and Zimmermann, R. (2019). "ER import of small human presecretory proteins: components and mechanisms." *FEBS Letters* 593(18): 2506-2524.
- Haßdenteufel, S., Sicking, M., Schorr, S., Aviram, N., Fecher-Trost, C., Schuldiner, M., Jung, M., Zimmermann, R. and Lang, S. (2017). "hSnd2 protein represents an alternative targeting factor to the endoplasmic reticulum in human cells." *FEBS Letters* 591(20): 3211-3224.
- Hauk, A. (2013). "Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung." *Biologie in unserer Zeit* 43(5): 278-278.
- Hebert, D. N. and Molinari, M. (2007). "In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases." *Physiological Reviews* 87(4): 1377-1408.
- Hegde, R. S. and Kang, S.-W. (2008). "The concept of translocational regulation." *The Journal of Cell Biology* 182(2): 225-232.
- Hein, M. Y., Hubner, N. C., Poser, I., Cox, J., Nagaraj, N., Toyoda, Y., Gak, I. A., Weisswange, I., Mansfeld, J., Buchholz, F., Hyman, A. A. and Mann, M. (2015). "A human interactome in three quantitative dimensions organized by stoichiometries and abundances." *Cell* 163(3): 712-723.
- Heinicke, S., Livstone, M. S., Lu, C., Oughtred, R., Kang, F., Angiuoli, S. V., White, O., Botstein, D. and Dolinski, K. (2007). "The Princeton Protein Orthology Database (P-POD): A Comparative Genomics Analysis Tool for Biologists." *PLoS ONE* 2(8): e766.
- Helenius, A., Marquardt, T. and Braakman, I. (1992). "The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment." *Trends in Cell Biology* 2(8): 227-231.
- Herrera, J., Henke, C. A. and Bitterman, P. B. (2018). "Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis." *The Journal of Clinical Investigation* 128(1): 45-53.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H. and von Heijne, G. (2005). "Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon." *Nature* 443(7024): 377-381.
- Hessa, T., Meindl-Beinker, N. M., Bernsel, A., Kim, H., Sato, Y., Lerch-Bader, M., Nilsson, I., White, S. H. and von Heijne, G. (2007). "Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon." *Nature* 450(7172): 1026-1030.
- Hetzer, M. W., Walther, T. C. and Mattaj, J. W. (2005). "Pushing the Envelope: Structure, Function, and Dynamics of the Nuclear Periphery." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 347-380.
- Hogan, P. G. (2015). "The STIM1-ORAI1 microdomain." *Cell Calcium* 58(4): 357-367.
- Horecker, B. L. and Kornberg, A. (1948). "The Extinction Coefficients of the Reduced Band of Pyridine Nucleotides." *Journal of Biological Chemistry* 175(1): 385-390.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M. and Long, S. B. (2012). "Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai." *Science* 338(6112): 1308-1313.
- Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S. and Worley, P. F. (2006). "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels." *Nat Cell Biol* 8(9): 1003-1010.
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K. (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast." *Nature* 425(6959): 686-691.
- Iannitti, T. and Palmieri, B. (2011). "Clinical and Experimental Applications fo Sodium Phenylbutyrate." *Drugs in R&D* 11(3): 227-249.
- Ikura, M., Clore, G., Gronenborn, A., Zhu, G., Klee, C. and Bax, A. (1992). "Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR." *Science* 256(5057): 632-638.
- Imagawa, T., Smith, J. S., Coronado, R. and Campbell, K. P. (1987). "Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca²⁺-permeable pore of the calcium release channel." *J Biol Chem* 262(34): 16636-16643.
- Imperiali, B. and Hendrickson, T. L. (1995). "Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase." *Bioorg Med Chem* 3(12): 1565-1578.

- Inglis, A. J., Page, K. R., Guna, A. and Voorhees, R. M. (2019). "Differential modes of orphan subunit recognition for the WRB/CAML complex." *bioRxiv*: 828228.
- Itskanov, S., Kuo, K. M., Gumbart, J. C. and Park, E. (2021). "Stepwise gating of the Sec61 protein-conducting channel by Sec63 and Sec62." *Nature structural & molecular biology* 28(2): 162-172.
- Itskanov, S. and Park, E. (2019). "Structure of the posttranslational Sec protein-translocation channel complex from yeast." *Science* 363(6422): 84-87.
- Jacquemyn, J., Cascalho, A. and Goodchild, R. E. (2017). "The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis." *EMBO Rep* 18(11): 1905-1921.
- Jadhav, B., McKenna, M., Johnson, N., High, S., Sinning, I. and Pool, M. R. (2015). "Mammalian SRP receptor switches the Sec61 translocase from Sec62 to SRP-dependent translocation." *Nat Commun* 4(6): 10133.
- Jarjanazi, H., Savas, S., Pabalan, N., Dennis, J. W. and Ozcelik, H. (2008). "Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins." *Proteins* 70(2): 394-403.
- John, L. M., Lechleiter, J. D. and Camacho, P. (1998). "Differential Modulation of SERCA2 Isoforms by Calreticulin." *The Journal of Cell biology* 142(4): 963-973.
- Johnström, P., Bird, J. L. and Davenport, A. P. (2012). "Quantitative phosphor imaging autoradiography of radioligands for positron emission tomography." *Methods Mol Biol* 897: 205-220.
- Jomaa, A., Fu, Y.-H. H., Boehringer, D., Leibundgut, M., Shan, S.-o. and Ban, N. (2017). "Structure of the quaternary complex between SRP, SR, and translocon bound to the translating ribosome." *Nat Commun* 8(1): 15470.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. and Hassabis, D. (2021). "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." *Nature*.
- Jung, G., Ueno, H. and Hayashi, R. (1999). "Carboxypeptidase Y: Structural Basis for Protein Sorting and Catalytic Triad." *J. Biochem* 126(1): 1-6.
- Jung, S.-j., Kim, J. E. H., Reithinger, J. H. and Kim, H. (2014). "The Sec62–Sec63 translocon facilitates translocation of the C-terminus of membrane proteins." *J Cell Sci* 127(19): 4270-4278.
- Junne, T., Kocik, L. and Spiess, M. (2010). "The hydrophobic core of the Sec61 translocon defines the hydrophobicity threshold for membrane integration." *Mol Biol Cell* 21(10): 1662-1670.
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V. and Spiess, M. (2006). "The Plug Domain of Yeast Sec61p Is Important for Efficient Protein Translocation, but Is Not Essential for Cell Viability." *Mol Biol Cell* 17(9): 4063-4068.
- Junne, T., Schwede, T., Goder, V. and Spiess, M. (2007). "Mutations in the Sec61p Channel Affecting Signal Sequence Recognition and Membrane Protein Topology." *Journal of Biological Chemistry* 282(45): 33201-33209.
- Kaiser, C. A., Preuss, D., Grisafi, P. and Botstein, D. (1987). "Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase." *Science* 235(4786): 312-317.
- Kalies, K.-U., Rapoport, T. A. and Hartmann, E. (1998). "The beta-Subunit of the Sec61 Complex Facilitates Cotranslational Protein Transport and Interacts with the Signal Peptidase during Translocation." *The Journal of Cell biology* 141(4): 887-894.
- Kalies, K. U., Görlich, D. and Rapoport, T. A. (1994). "Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex." *J. Cell Biol.* 126: 925-934.
- Käll, L., Krogh, A. and Sonnhammer, E. L. (2004). "A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method." *J Mol Biol* 338(5): 1027-1036.
- Kalmbach, R., Chizhov, I., Schumacher, M. C., Friedrich, T., Bamberg, E. and Engelhard, M. (2007). "Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: in situ insertion of bacteriorhodopsin into liposomes." *J Mol Biol* 371(3): 639-648.

- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M. and Kang, C. (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Bulletin- Korean Chemical Society* 23(11): 1511-1512.
- Karla, A., Lively, M. O., Paetzel, M. and Dalbey, R. (2005). "The identification of residues that control signal peptidase cleavage fidelity and substrate specificity." *J Biol Chem* 280(8): 6731-6741.
- Karsdal, M. A., Nielsen, S. H., Leeming, D. J., Langholm, L. L., Nielsen, M. J., Manon-Jensen, T., Siebuhr, A., Gudmann, N. S., Rønnow, S., Sand, J. M., Daniels, S. J., Mortensen, J. H. and Schuppan, D. (2017). "The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function." *Advanced Drug Delivery Reviews* 121: 43-56.
- Kater, L., Frieg, B., Berninghausen, O., Gohlke, H., Beckmann, R. and Kedrov, A. (2019). "Partially inserted nascent chain unzips the lateral gate of the Sec translocon." *EMBO Rep* 20(10): e48191.
- Kaufman, J., Gordon, C., Bergamaschi, R., Wang, H. Z., Cohen, I. S., Valiunas, V. and Brink, P. R. (2013). "The effects of the histone deacetylase inhibitor 4-phenylbutyrate on gap junction conductance and permeability." *Front Pharmacol* 4(111).
- Kavsan, V. M., Iershov, A. V. and Balynska, O. V. (2011). "Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation." *BMC Cell Biol* 12: 23.
- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M. and Walter, P. (2001). "The Signal Recognition Particle." *Annu Rev Biochem* 70(1): 755-775.
- Keil, B. (1992). *Specificity fo Proteolysis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Keil, M. F., Briassoulis, G., Stratakis, C. A. and Wu, T. J. (2016). "Protein Kinase A and Anxiety-Related Behaviors: A Mini-Review." *Front Endocrinol (Lausanne)* 7: 83.
- Kemter, E., Frohlich, T., Arnold, G. J., Wolf, E. and Wanke, R. (2017). "Mitochondrial Dysregulation Secondary to Endoplasmic Reticulum Stress in Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease - UMOD (ADTKD-UMOD)." *Sci Rep* 7: 42970.
- Kemter, E., Sklenak, S., Rathkolb, B., Hrabě de Angelis, M., Wolf, E., Aigner, B. and Wanke, R. (2014). "No amelioration of uromodulin maturation and trafficking defect by sodium 4-phenylbutyrate in vivo: studies in mouse models of uromodulin-associated kidney disease." *J Biol Chem* 289(15): 10715-10726.
- Kidd, K., Vylet'al, P., Schaeffer, C., Olinger, E., Živná, M., Hodaňová, K., Robins, V., Johnson, E., Taylor, A., Martin, L., Izzì, C., Jorge, S. C., Calado, J., Torres, R. J., Lhotta, K., Steubl, D., Gale, D. P., Gast, C., Gombos, E., Ainsworth, H. C., Chen, Y. M., Almeida, J. R., de Souza, C. F., Silveira, C., Raposeiro, R., Weller, N., Conlon, P. J., Murray, S. L., Benson, K. A., Cavalleri, G. L., Votruba, M., Vrbacká, A., Amoroso, A., Gianchino, D., Caridi, G., Ghiggeri, G. M., Divers, J., Scolari, F., Devuyst, O., Rampoldi, L., Knoch, S. and Bleyer, A. J. (2020). "Genetic and Clinical Predictors of Age of ESKD in Individuals With Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease Due to UMOD Mutations." *Kidney Int Rep* 5(9): 1472-1485.
- Kinch, L. N., Saier, J. M. H. and Grishin, N. V. (2002). "Sec61beta - a component of the archaeal protein secretory system." *Trends in biochemical sciences* 27(4): 170-171.
- Klein, M.-C. (2019). *Charakterisierung der physiologischen Funktionen des Sec61-assoziierten Ca²⁺ Leckstroms*. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Klein, M. C., Lerner, M., Nguyen, D., Pfeffer, S., Dudek, J., Förster, F., Helms, V., Lang, S. and Zimmermann, R. (2020). "TRAM1 protein may support ER protein import by modulating the phospholipid bilayer near the lateral gate of the Sec61-channel." *Channels* 14(1): 28-44.
- Klein, M. C., Zimmermann, K., Schorr, S., Landini, M., Klemens, P. A. W., Altensell, J., Jung, M., Krause, E., Nguyen, D., Helms, V., Rettig, J., Fecher-Trost, C., Cavalie, A., Hoth, M., Bogeski, I., Neuhaus, H. E., Zimmermann, R., Lang, S. and Haferkamp, I. (2018). "AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum." *Nat Commun* 9(1): 3489.
- Knoch, S., Živná, M. and Bleyer, A. J. (2011, 29.12.2015). "Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease, *REN*-Related." *GeneReviews* Retrieved 05.05.2020, 2020.
- Kobayashi, K., Jomaa, A., Lee, J. H., Chandrasekar, S., Boehringer, D., Shan, S. O. and Ban, N. (2018). "Structure of a prehandover mammalian ribosomal SRP-SRP receptor targeting complex." *Science* 360(6386): 323-327.

- Koepke, J. F. and Koepke, J. A. (1986). "Reticulocytes." *clinica & Laboratory haematology* 8(3): 169-179.
- Kolb, P. S., Ayaub, E. A., Zhou, W., Yum, V., Dickhout, J. G. and Ask, K. (2015). "The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis." *Int J Biochem Cell Biol* 61: 45-52.
- Kostic, M. and Sekler, I. (2019). "Functional properties and mode of regulation of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCLX." *Semin Cell Dev Biol* 94: 59-65.
- Krieg, U. C., Walter, P. and Johnson, A. E. (1986). "Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8604-8608.
- Kriegler, T., Lang, S., Notari, L. and Hessa, T. (2020). "Prion Protein Translocation Mechanism Revealed by Pulling Force Studies." *Journal of molecular biology* 432(16): 4447-4465.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." *J Mol Biol* 305(3): 567-580.
- Kumar, D. P., Vorvis, C., Sarbeng, E. B., Cabra Ledesma, V. C., Willis, J. E. and Liu, Q. (2011). "The Four Hydrophobic Residues on the Hsp70 Inter-Domain Linker Have Two Distinct Roles." *Journal of molecular biology* 411(5): 1099-1113.
- Kunitomi, H., Kobayashi, Y., Wu, R. C., Takeda, T., Tominaga, E., Banno, K. and Aoki, D. (2020). "LAMC1 is a prognostic factor and a potential therapeutic target in endometrial cancer." *J Gynecol Oncol* 31(2): 21.
- Kunze, M. and Berger, J. (2015). "The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance." *Front Physiol* 6(259).
- Kuo, I. Y. and Ehrlich, B. E. (2015). "Signaling in muscle contraction." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7(2): a006023-a006023.
- Kutay, U., Hartmann, E. and Rapoport, T. A. (1993). "A class of membrane proteins with a C-terminal anchor." *Trends in Cell Biology* 3(3): 72-75.
- Lacruz, R. S. and Feske, S. (2015). "Diseases caused by mutations in ORA1 and STIM1." *Ann N Y Acad Sci* 1: 45-79.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Lakkaraju, A. K., Abrami, L., Lemmin, T., Blaskovic, S., Kunz, B., Kihara, A., Dal Peraro, M. and van der Goot, F. G. (2012a). "Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex." *Embo J* 31(7): 1823-1835.
- Lakkaraju, A. K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A. E. and Strub, K. (2008). "SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites." *Cell* 133(3): 440-451.
- Lakkaraju, A. K., Thankappan, R., Mary, C., Garrison, J. L., Taunton, J. and Strub, K. (2012b). "Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation." *Mol Biol Cell* 23(14): 2712-2722.
- Landry, J. J., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stutz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbil, J. O., Huber, W. and Steinmetz, L. M. (2013). "The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line." *G3* 3(8): 1213-1224.
- Lang, S., Benedix, J., Fedeles, S. V., Schorr, S., Schirra, C., Schäuble, N., Jalal, C., Greiner, M., Haßdenteufel, S., Tatzelt, J., Kreutzer, B., Edelmann, L., Krause, E., Rettig, J., Somlo, S., Zimmermann, R. and Dudek, J. (2012). "Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells." *J Cell Sci* 125(8): 1958-1969.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A. and Zimmermann, R. (2011). "Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels." *Channels* 5(4): 228-235.
- Lang, S., Nguyen, D., Pfeffer, S., Förster, F., Helms, V. and Zimmermann, R., Eds. (2019). *Functions and Mechanisms of the Human Ribosome-Translocon Complex. Subcellular Biochemistry Series; Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function.* Cham, Springer Nature Switzerland AG.

- Lang, S., Pfeffer, S., Lee, P. H., Cavalié, A., Helms, V., Forster, F. and Zimmermann, R. (2017). "An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases." *Front Physiol* 8: 887.
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D. and Hamilton, S. L. (2010). "Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(11): a003996-a003996.
- Larkin, A. and Imperiali, B. (2011). "The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation." *Biochemistry* 50(21): 4411-4426.
- Lee, A. S. (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." *Methods* 35(4): 373-381.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. and Kim, Y. H. (2012). "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments." *J Vis Exp*(62).
- Lee, S.-H., Hadipour-Lakmehsari, S., Murthy, H. R., Gibb, N., Miyake, T., Teng, A. C. T., Cosme, J., Yu, J. C., Moon, M., Lim, S., Wong, V., Liu, P., Billia, F., Fernandez-Gonzalez, R., Stagljar, I., Sharma, P., Kislinger, T., Scott, I. C. and Gramolini, A. O. (2020). "REEP5 depletion causes sarco-endoplasmic reticulum vacuolization and cardiac functional defects." *Nat Commun* 11(1): 965.
- Lei, P., Xiao, Y., Li, P., Xie, P., Wang, H., Huang, S., Song, P. and Zhao, Y. (2020). "hSnd2/TMEM208 is an HIF-1 α -targeted gene and contains a WH2 motif." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 52(3): 328-331.
- Lemos, F. O., Bultynck, G. and Parys, J. B. (2021). "A comprehensive overview of the complex world of the endo- and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-leak channels." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868(7): 119020.
- Lewy, T. G., Grabowski, J. M. and Bloom, M. E. (2017). "BiP: Master Regulator of the unfolded Protein Response and Crucial Factor in Flavivirus Biology." *Yale Journal of Biology and Medicine* 90(2): 291-300.
- Lhotta, K. (2010). "Uromodulin and Chronic Kidney Disease." *Kidney and Blood Pressure Research* 33(5): 393-398.
- Li, C., Ramjeesingh, M., Reyes, E., Jensen, T., Chang, X., Rommens, J. M. and Bear, C. E. (1993). "The cystic fibrosis mutation (Δ F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR." *Nat Genet* 3(4): 311-316.
- Li, W., Schulman, S., Boyd, D., Erlandson, K., Beckwith, J. and Rapoport, T. A. (2007). "The Plug Domain of the SecY Protein Stabilizes the Closed State of the Translocation Channel and Maintains a Membrane Seal." *Molecular Cell* 26(4): 511-521.
- Liaci, A., Steigenberger, B., Tamara, S., Telles de Souza, P. C., Gröllers-Mulderij, M., Ogrissek, P., Marrink, S., Scheltema, R. and Förster, F. (2021). "Structure of the Human Signal Peptidase Complex Reveals the Determinants for Signal Peptide Cleavage." *SSRN Electronic Journal*.
- Liao, Y., Plummer, N. W., George, M. D., Abramowitz, J., Zhu, M. X. and Birnbaumer, L. (2009). "A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(9): 3202-3206.
- Liberti, M. V. and Locasale, J. W. (2016). "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?" *Trends in biochemical sciences* 41(3): 211-218.
- Lichter-Konecki, U., Diaz, G. A., Merritt, J. L., Feigenbaum, A., Jomphe, C., Marier, J. F., Beliveau, M., Mauney, J., Dickinson, K., Martinez, A., Mokhtarani, M., Scharschmidt, B. and Rhead, W. (2011). "Ammonia control in children with urea cycle disorders (UCDs); Phase 2 comparison of sodium phenylbutyrate and glycerol phenylbutyrate." *Mol Genet Metab* 103(4): 323-329.
- Liebermeister, W., Rapoport, T. A. and Heinrich, R. (2001). "Ratcheting in Post-translational Protein Translocation: A Mathematical Model." *Journal of molecular biology* 305(3): 643-656.
- Lievremont, J. P., Rizzuto, R., Hendershot, L. and Meldolesi, J. (1997). "BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺." *J Biol Chem* 272(49): 30873-30879.

- Lin, J. H., Walter, P. and Yen, T. S. B. (2008). "Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis." *Annual review of pathology* 3: 399-425.
- Linxweiler, M., Schick, B. and Zimmermann, R. (2017). "Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine." *Signal Transduct Target Ther* 2: 17002.
- Linxweiler, M., Schorr, S., Schäuble, N., Jung, M., Linxweiler, J., Langer, F., Schäfers, H.-J., Cavalié, A., Zimmermann, R. and Greiner, M. (2013). "Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells." *BMC Cancer* 13(574).
- Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E. and Meyer, T. (2005). "STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx." *Current Biology* 15(13): 1235-1241.
- Litvinov, D. Y., Savushkin, E. V. and Dergunov, A. D. (2018). "Intracellular and Plasma Membrane Events in Cholesterol Transport and Homeostasis." *J Lipids* 2018: 3965054.
- Liu, B., Liu, J., Liao, X., Jin, C., Zhang, Z., Zhao, J., Liu, K., Huang, H., Cao, H. and Cheng, Q. (2019a). "Identification of SEC61G as a Novel Prognostic Marker for Predicting Survival and Response to Therapies in Patients with Glioblastoma." *Medical Science Monitor* 25: 3624-3635.
- Liu, C. and Hermann, T. E. (1978). "Characterization of ionomycin as a calcium ionophore." *J Biol Chem* 253(17): 5892-5894.
- Liu, Y., Mi, Y., Mueller, T., Kreibich, S., Williams, E. G., Van Drogen, A., Borel, C., Frank, M., Germain, P.-L., Bludau, I., Mehnert, M., Seifert, M., Emmenlauer, M., Sorg, I., Bezrukov, F., Bena, F. S., Zhou, H., Dehio, C., Testa, G., Saez-Rodriguez, J., Antonarakis, S. E., Hardt, W.-D. and Aebersold, R. (2019b). "Multi-omic measurements of heterogeneity in HeLa cells across laboratories." *Nature Biotechnology* 37(3): 314-322.
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Vaseghi, H. R., Qian, L. and Liu, J. (2017). "Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector." *Scientific Reports* 7(1): 2193-2193.
- Lloyd, D. J., Wheeler, M. C. and Gekakis, N. (2010). "A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice." *Diabetes* 59(2): 460-470.
- Lodish, H., Berk, A. and Zipursky, S. (2000). *Post-Translational Modifications and Quality Control in the Rough ER. Molecular Cell biology*. New York, W. H. Freeman. 4th edition.
- López-Llano, J., Campos, L. A. and Sancho, J. (2006). "Alpha-helix stabilization by alanine relative to glycine: roles of polar and apolar solvent exposures and of backbone entropy." *Proteins* 64(3): 769-778.
- Lopez-Sambrooks, C., Shrimal, S., Khodier, C., Flaherty, D. P., Rinis, N., Charest, J. C., Gao, N., Zhao, P., Wells, L., Lewis, T. A., Lehrman, M. A., Gilmore, R., Golden, J. E. and Contessa, J. N. (2016). "Oligosaccharyltransferase inhibition induces senescence in RTK-driven tumor cells." *Nature chemical biology* 12(12): 1023-1030.
- Lu, Z., Zhou, L., Killela, P., Rasheed, A. B., Di, C., Poe, W. E., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Nicchitta, C. and Yan, H. (2009a). "Glioblastoma Proto-oncogene SEC61 γ Is Required for Tumor Cell Survival and Response to Endoplasmic Reticulum Stress." *Cancer Res* 69(23): 9105-9111.
- Lu, Z., Zhou, L., Killela, P., Rasheed, A. B., Di, C., Poe, W. E., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Nicchitta, C. and Yan, H. (2009b). "Glioblastoma proto-oncogene SEC61 γ is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress." *Cancer Res* 69(23): 9105-9111.
- Luirink, J. and Sinning, I. (2004). "SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694(1): 17-35.
- Lunz, V., Romanin, C. and Frischauf, I. (2019). "STIM1 activation of Orai1." *Cell Calcium* 77: 29-38.
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M. R. (1991). "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." *J Biol Chem* 266(26): 17067-17071.
- Ma, L., Liu, Y., El-Achkar, T. M. and Wu, X. R. (2012). "Molecular and cellular effects of Tamm-Horsfall protein mutations and their rescue by chemical chaperones." *J Biol Chem* 287(2): 1290-1305.

- MacKinnon, A. L., Paavilainen, V. O., Sharma, A., Hegde, R. S. and Taunton, J. (2014). "An allosteric SecE1 inhibitor traps nascent transmembrane helices at the lateral gate." *eLife* 3: e01483.
- Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N. and Ried, T. (1999). "Comprehensive and Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of HeLa Cells by Spectral Karyotyping." *Cancer Research* 59(1): 141-150.
- Manalo, R. V. M. and Medina, P. M. B. (2018). "The endoplasmic reticulum stress response in disease pathogenesis and pathophysiology." *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 19(2): 59-68.
- Marchi, S. and Pinton, P. (2014). "The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications." *The Journal of physiology* 592(5): 829-839.
- Margreth, A. (2002). "Our debt toward emilio veratti." *Rendiconti Lincei* 13(4): 249-255.
- Mariappan, M., Li, X., Stefanovic, S., Sharma, A., Mateja, A., Keenan, R. J. and Hegde, R. S. (2010). "A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins." *Nature* 466(7310): 1120-1124.
- Martin, W. F., Garg, S. and Zimorski, V. (2015). "Endosymbiotic theories for eukaryote origin." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1678): 20140330.
- Martoglio, B. and Dobberstein, B. (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." *Trends in Cell Biology* 8(10): 410-415.
- Masters, S. C. (2004). *Co-Immunoprecipitation from Transfected Cells. Protein-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology.* H., Humana Press. 261: 337-350.
- Matlack, K. E. S., Misselwitz, B., Plath, K. and Rapoport, T. A. (1999). "BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-a factor across the ER membrane." *Cell* 97: 553-564.
- Mayer, M. P. (2018). "Intra-molecular pathways of allosteric control in Hsp70s." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373(1749).
- Mayer, M. P. and Kityk, R. (2015). "Insights into the molecular mechanism of allostery in Hsp70s." *Front Mol Biosci* 2(58).
- McDowell, M. A., Heimes, M., Fiorentino, F., Mehmood, S., Farkas, Á., Coy-Vergara, J., Wu, D., Bolla, J. R., Schmid, V., Heinze, R., Wild, K., Flemming, D., Pfeffer, S., Schwappach, B., Robinson, C. V. and Sinning, I. (2020). "Structural Basis of Tail-Anchored Membrane Protein Biogenesis by the GET Insertase Complex." *Molecular Cell* 80(1): 72-86.e77.
- McGilvray, P. T., Anghel, S. A., Sundaram, A., Zhong, F., Trnka, M. J., Fuller, J. R., Hu, H., Burlingame, A. L. and Keenan, R. J. (2020). "An ER translocon for multi-pass membrane protein biogenesis." *eLife* 9: e56889.
- McGrew, S. G., Wolleben, C., Siegl, P., Inui, M. and Fleischer, S. (1989). "Positive cooperativity of ryanodine binding to the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from heart and skeletal muscle." *Biochemistry* 28(4): 1686-1691.
- McKeehan, W. and Heardesty, B. (1969). "The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 36(4): 625-630.
- Mekahli, D., Bultynck, G., Parys, J. B., De Smedt, H. and Missiaen, L. (2011). "Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(6): a004317.
- Melnyk, A., Rieger, H. and Zimmermann, R. (2015). "Co-chaperones of the mammalian endoplasmic reticulum." *Subcell Biochem* 78: 179-200.
- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M. R. (1984). "Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter." *Nucleic Acids Research* 12(18): 7035-7056.
- Ménétre, J. F., Schaletzky, J., Clemons, W. M., Jr., Osborne, A. R., Skanland, S. S., Denison, C., Gygi, S. P., Kirkpatrick, D. S., Park, E., Ludtke, S. J., Rapoport, T. A. and Akey, C. W. (2007). "Ribosome binding of a single copy of the SecY complex: implications for protein translocation." *Mol Cell* 28(6): 1083-1092.

- Messmore, J. M., Fuchs, D. N. and Raines, R. T. (1995). "Ribonuclease a: revealing structure-function relationships with semisynthesis." *J Am Chem Soc* 117(31): 8057-8060.
- Meyer, H.-A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.-U. and Hartmann, E. (2000a). "Mammalian Sec61 Is Associated with Sec62 and Sec63." *Journal of Biological Chemistry* 275(19): 14550-14557.
- Meyer, H.-A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.-U. and Hartmann, E. (2000b). "Mammalian Sec61 Is Associated with Sec62 and Sec63 *." *Journal of Biological Chemistry* 275(19): 14550-14557.
- Meyer, T. S. and Lamberts, B. L. (1965). "Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid salvia proteins on acrylamide-gel strips." *Biochemica et Biophysica Acta (BBA)* 107(1): 144-145.
- Michalak, M., Robert Parker, J. M. and Opas, M. (2002). "Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." *Cell Calcium* 32(5-6): 269-278.
- Michelucci, A., García-Castañeda, M., Boncompagni, S. and Dirksen, R. T. (2018). "Role of STIM1/ORAI1-mediated store-operated Ca(2+) entry in skeletal muscle physiology and disease." *Cell Calcium* 76: 101-115.
- Milner, R. E., Famulski, K. S. and Michalak, M. (1992). "Calcium binding proteins in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum of muscle and nonmuscle cells." *Molecular and Cellular Biochemistry* 112(1): 1-13.
- Minke, B. (2006). "TRP channels and Ca²⁺ signaling." *Cell Calcium* 40(3): 261-275.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M. and Tsien, R. Y. (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺-based on green fluorescent proteins and calmodulin." *Nature* 388(6645): 882-887.
- Mock, J.-Y., Chartron, J. W., Zaslaver, M., Xu, Y., Ye, Y. and Clemons, W. M., Jr. (2015). "Bag6 complex contains a minimal tail-anchor-targeting module and a mock BAG domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(1): 106-111.
- Möller, S., Croning, M. D. and Apweiler, R. (2001). "Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions." *Bioinformatics* 17(7): 646-653.
- Morciano, G., Marchi, S., Morganti, C., Sbano, L., Bittremieux, M., Kerkhofs, M., Corricelli, M., Danese, A., Karkucinska-Wieckowska, A., Wieckowski, M. R., Bultynck, G., Giorgi, C. and Pinton, P. (2018). "Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 20(5): 510-523.
- Morita, T., Hussain, D., Asahi, M., Tsuda, T., Kurzydowski, K., Toyoshima, C. and MacLennan, D. H. (2008). "Interaction sites among phospholamban, sarcolipin, and the sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase." *Biochem Biophys Res Commun* 369(1): 188-194.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009). "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." *J Comput Chem* 30(16): 2785-2791.
- Müller, L., Diaz de Escauriaza, M., Lajoie, P., Theis, M., Jung, M., Müller, A., Burgard, C., Greiner, M., Snapp, E. L., Dudek, J. and Zimmermann, R. (2010). "Evolutionary Gain of Function for the ER Membrane Protein Sec62 from Yeast to Humans." *Mol Biol Cell* 21: 691-703.
- Murugan, S., Shan, J., Kühl, S. J., Tata, A., Pietilä, I., Kühl, M. and Vainio, S. J. (2012). "WT1 and Sox11 regulate synergistically the promoter of the Wnt4 gene that encodes a critical signal for nephrogenesis." *Experimental Cell Research* 318(10): 1134-1145.
- Nakano, K., Mizuno, T., Sowa, Y., Orita, T., Yoshino, T., Okuyama, Y., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y., Tokino, T., Yamagishi, H., Oka, T., Nomura, H. and Sakai, T. (1997). "Butyrate Activates the WAF1/Cip1 Gene promoter through Sp1 Sites in a p53-negative Human Colon Cancer Cell Line." *The Journal of Biological Chemistry* 272(35): 22199-22206.
- Nave, K.-A. and Salzer, J. L. (2006). "Axonal regulation of myelination by neuregulin 1." *Current Opinion in Neurobiology* 16(5): 492-500.
- Neirijnck, Y., Reginensi, A., Renkema, K. Y., Massa, F., Kozlov, V. M., Dhib, H., Bongers, E. M. H. F., Feitz, W. F., van Eerde, A. M., Lefebvre, V., Knoers, N. V. A. M., Tabatabaei, M., Schulz, H., McNeill, H., Schaefer, F., Wegner, M., Sock, E. and Schedl, A. (2018). "Sox11 gene disruption

- causes congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)." *Kidney Int* 93(5): 1142-1153.
- Nelson, M. R., Thulin, E., Fagan, P. A., Forsén, S. and Chazin, W. J. (2002). "The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit." *Protein science : a publication of the Protein Society* 11(2): 198-205.
- Neuhof, A., Rolls, M. M., Jungnickel, B., Kalies, K.-U. and Rapoport, T. A. (1998). "Bindung of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction." *Mol. Biol. Cell* 9: 103-115.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* 9(6): 262-267.
- Ng, B. G., Lourenço, C. M., Losfeld, M. E., Buckingham, K. J., Kircher, M., Nickerson, D. A., Shendure, J., Bamshad, M. J. and Freeze, H. H. (2019). "Mutations in the translocon-associated protein complex subunit SSR3 cause a novel congenital disorder of glycosylation." *J Inherit Metab Dis* 42(5): 993-997.
- Nguyen, D., Stutz, R., Schorr, S., Lang, S., Pfeffer, S., Freeze, H. H., Forster, F., Helms, V., Dudek, J. and Zimmermann, R. (2018). "Proteomics reveals signal peptide features determining the client specificity in human TRAP-dependent ER protein import." *Nat Commun* 9(1): 3765.
- Nguyen, L. P., Nguyen, H. T., Yong, H. J., Reyes-Alcaraz, A., Lee, Y.-N., Park, H.-K., Na, Y. H., Lee, C. S., Ham, B.-J., Seong, J. Y. and Hwang, J.-I. (2020). "Establishment of a NanoBIT-Based Cytosolic Ca(2+) Sensor by Optimizing Calmodulin-Binding Motif and Protein Expression Levels." *Molecules and cells* 43(11): 909-920.
- Nguyen, T. A. and Debnath, J. (2020). "Unconventional secretion: cargo channeling by TMED10." *Cell Research* 30(9): 713-714.
- Nishi, M., Komazaki, S., Iino, M., Kangawa, K. and Takeshima, H. (1998). "Mitsugumin23, a novel transmembrane protein on endoplasmic reticulum and nuclear membranes." *FEBS Lett* 432(3): 191-196.
- O'Neill, S. and Knaus, U. G. (2019). "Protein-Protein Interaction Assay to Analyze NOX4/p22(phox) Heterodimerization." *Methods Mol Biol*: 9424-9423_9426.
- Oakes, S. A. and Papa, F. R. (2015). "The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology." *Annu Rev Pathol* 10: 173-194.
- Ogbechi, J., Hall, B. S., Sbarrato, T., Taunton, J., Willis, A. E., Wek, R. C. and Simmonds, R. E. (2018). "Inhibition of Sec61-dependent translocation by mycolactone uncouples the integrated stress response from ER stress, driving cytotoxicity via translational activation of ATF4." *Cell death & disease* 9(3): 397-397.
- Oh-hashii, K., Hirata, Y. and Kiuchi, K. (2016). "SOD1 dimerization monitoring using a novel split NanoLuc, NanoBit." *Cell Biochemistry and Function* 34(7): 497-504.
- Ohishi, K., Inoue, N. and Kinoshita, T. (2001). "PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8." *Embo J* 20(15): 4088-4098.
- Orci, L., Ravazzola, M., Le Coadic, M., Shen, W.-w., Demaurex, N. and Cosson, P. (2009). "STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(46): 19358.
- Osborne, A. R., Rapoport, T. A. and van den Berg, B. (2005). "Protein translocation by the Sec61/SecY channel." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 529-550.
- Ostwald, T. J. and MacLennan, D. H. (1974). "Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 249(3): 974-979.
- Otero, J. H., Lizak, B. and Hendershot, L. M. (2010). "Life and death of a BiP substrate." *Semin Cell Dev Biol* 21(5): 472-478.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Gorgun, C. Z. and Hotamisligil, G. S. (2006). "Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes." *Science* 313(5790): 1137-1140.
- Pace, C. N. and Scholtz, J. M. (1998). "A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins." *Biophys J* 75(1): 422-427.

- Pai, B. H. S., Swarnalatha, G., Ram, R. and Dakshinamurthy, K. V. (2013). "Allopurinol for prevention of progression of kidney disease with hyperuricemia." *Indian journal of nephrology* 23(4): 280-286.
- Palade, G. E. and Porter, K. R. (1954). "Studies on the endoplasmic reticulum." *Journal of Experimental Medicine* 100(6): 641-656.
- Palir, N., Ruiter, J. P. N., Wanders, R. J. A. and Houtkooper, R. H. (2017). "Identification of enzymes involved in oxidation of phenylbutyrate." *J Lipid Res* 58(5): 955-961.
- Park, B. J., Lee, D. G., Yu, J. R., Jung, S. K., Choi, K., Lee, J., Kim, Y. S., Lee, J. I., Kwon, J. Y., Singson, A., Song, W. K., Eom, S. H., Park, C. S., Kim, D. H., Bandyopadhyay, J. and Ahnn, J. (2001). "Calreticulin, a calcium-binding molecular chaperone, is required for stress response and fertility in *Caenorhabditis elegans*." *Mol Biol Cell* 12(9): 2835-2845.
- Park, E. and Rapoport, T. A. (2012). "Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes." *Annual Review of Biophysics* 41(1): 21-40.
- Park, J., Easton, D. P., Chen, X., MacDonald, I. J., Wang, X. Y. and Subject, J. R. (2003). "The chaperoning properties of mouse grp170, a member of the third family of hsp70 related proteins." *Biochemistry* 42(50): 14893-14902.
- Patergnani, S., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Rimessi, A., Duszynski, J., Wieckowski, M. R. and Pinton, P. (2011). "Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs)." *Cell communication and signaling : CCS* 9: 19-19.
- Paulick, M. G. and Bertozzi, C. R. (2008). "The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins." *Biochemistry* 47(27): 6991-7000.
- Pavelka, M. and Roth, J. (2010). *Nuclear Envelope and Rough Endoplasmic Reticulum. Functional Ultrastructure*. Vienna, Springer.
- Pearse, B. R. and Hebert, D. N. (2010). "Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum." *Biochim Biophys Acta* 1803(6): 684-693.
- Pelham, H. R. B. and Jackson, R. J. (1976). "An efficient mRNA-Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates." *European journal of Biochemistry* 67(1): 247-256.
- Pfeffer, S., Burbaum, L., Unverdorben, P., Pech, M., Chen, Y., Zimmermann, R., Beckmann, R. and Forster, F. (2015). "Structure of the native Sec61 protein-conducting channel." *Nat Commun* 6: 8403.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Gogala, M., Schorr, S., Linxweiler, J., Lang, S., Becker, T., Beckmann, R., Zimmermann, R. and Förster, F. (2014). "Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon." *Nat Commun* 5(1): 3072.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Schaffer, M., Ng, B. G., Albert, S., Plitzko, J. M., Baumeister, W., Zimmermann, R., Freeze, H. H., Engel, B. D. and Forster, F. (2017). "Dissecting the molecular organization of the translocon-associated protein complex." *Nat Commun* 8: 14516.
- Pfeffer, S., Dudek, J., Zimmermann, R. and Forster, F. (2016). "Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane." *Biochim Biophys Acta* 1860(10): 2122-2129.
- Phoomak, C., Cui, W., Hayman, T. J., Yu, S.-H., Zhao, P., Wells, L., Steet, R. and Contessa, J. N. (2021). "The translocon-associated protein (TRAP) complex regulates quality control of N-linked glycosylation during ER stress." *Science Advances* 7(3): eabc6364.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E. and Rizzuto, R. (2008). "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis." *Oncogene* 27(50): 6407-6418.
- Pobre, K. F. R., Poet, G. J. and Hendershot, L. M. (2019). "The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends." *J Biol Chem* 294(6): 2098-2108.
- Pool, M. R. (2005). "Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review)." *Mol Membr Biol* 22(1-2): 3-15.
- Pool, M. R. (2016). "Sort of unexpected." *Nature* 540(7631): 45-46.
- Porter, K. R. (1953). "Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm." *Journal of Experimental Medicine* 97(5): 727-750.

- Porter, K. R., Claude, A. and Fullam, E. F. (1945). "A study of Tissue Culture Cells by electron Microscopy." *Journal of Experimental Medicine* 81(233).
- Potter, M. D., Seiser, R. M. and Nicchitta, C. V. (2001). "Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane." *Trends Cell Biol* 11(3): 112-115.
- Prakriya, M. and Lewis, R. S. (2015). "Store-Operated Calcium Channels." *Physiol Rev* 95(4): 1383-1436.
- Primeau, J. O., Armanious, G. P., Fisher, M. E. and Young, H. S. (2018). "The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase." *Subcell Biochem* 87: 229-258.
- Prole, D. L. and Taylor, C. W. (2019). "Structure and Function of IP(3) Receptors." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 11(4).
- Putney, J. W. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." *Cell Calcium* 7(1): 1-12.
- Putney, J. W. (1999). *Ca²⁺ Stores and Ca²⁺ Pool*. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Raden, D., Song, W. and Gilmore, R. (2000). "Role of the cytoplasmic segments of Sec61a in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex." *Journal of Cell Biology* 150(1): 53-64.
- Rahate, K., Bhatt, L. K. and Prabhavalkar, K. S. (2020). "SERCA stimulation: A potential approach in therapeutics." *Chemical Biology & Drug Design* 95(1): 5-15.
- Rahimi, Z., Moradi, M. and Nasri, H. (2014). "A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy." *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 19(11): 1090-1098.
- Rampoldi, L., Caridi, G., Santon, D., Boaretto, F., Bernascone, I., Lamorte, G., Tardanico, R., Dagnino, M., Colussi, G., Scolari, F., Ghiggeri, G. M., Amoroso, A. and Casari, G. (2003). "Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics." *Hum Mol Genet* 12(24): 3369-3384.
- Rampoldi, L., Scolari, F., Amoroso, A., Ghiggeri, G. and Devuyt, O. (2011). "The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease." *Kidney Int* 80(4): 338-347.
- Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." *Nature* 450(7170): 663-669.
- Rapoport, T. A., Rolls, M. M. and Jungnickel, B. (1996). "Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane." *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 499-504.
- Reilly-O'Donnell, B., Robertson, G. B., Karumbi, A., McIntyre, C., Bal, W., Nishi, M., Takeshima, H., Stewart, A. J. and Pitt, S. J. (2017). "Dysregulated Zn(2+) homeostasis impairs cardiac type-2 ryanodine receptor and mitsugumin 23 functions, leading to sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leakage." *The Journal of Biological Chemistry* 292(32): 13361-13373.
- Reithinger, J. H., Kim, J. E. H. and Kim, H. (2013). "Sec62 Protein Mediates Membrane Insertion and Orientation of Moderately Hydrophobic Signal Anchor Proteins in the Endoplasmic Reticulum (ER) *." *Journal of Biological Chemistry* 288(25): 18058-18067.
- Ricarte, F., Menjivar, R., Chhun, S., Soreta, T., Oliveira, L., Hsueh, T., Serranilla, M. and Gharakhanian, E. (2011). "A genome-wide immunodetection screen in *S. cerevisiae* uncovers novel genes involved in lysosomal vacuole function and morphology." *PLoS ONE* 6(8): e23696.
- Rick, W. (1974). *Trypsin Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, Academic Press Inc. 2: 682.
- Ritz, U. and Seliger, B. (2001). "The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance." *Mol Med* 7(3): 149-158.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. and Mammucari, C. (2012). "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(9): 566-578.
- Rizzuto, R., Duchen, M. R. and Pozzan, T. (2004). "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison." *Sci STKE* 13(215).
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E. and Pinton, P. (2009). "Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria:

- When, how and why." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787(11): 1342-1351.
- Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2006). "Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences." *Physiological Reviews* 86(1): 369-408.
- Rogers, T. B., Inesi, G., Wade, R. and Lederer, W. J. (1995). "Use of thapsigargin to study Ca²⁺ homeostasis in cardiac cells." *Biosci Rep* 15(5): 341-349.
- Roy, D., Kumar, V., James, J., Shihabudeen, M. S., Kulshrestha, S., Goel, V. and Thirumurugan, K. (2015). "Evidence that Chemical Chaperone 4-Phenylbutyric Acid Binds to Human Serum Albumin at Fatty Acid Binding Sites." *PLoS ONE* 10(7): e0133012.
- Rubenstein, R. C., Egan, M. E. and Zeitlin, P. L. (1997). "In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR." *The Journal of Clinical Investigation* 100(10): 2457-2465.
- Rubenstein, R. C. and Zeitlin, P. L. (1998). "A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function." *Am J Respir Crit Care Med* 157(2): 484-490.
- Rubenstein, R. C. and Zeitlin, P. L. (2000). "Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2).
- Ruiz-Canada, C., Kelleher, D. J. and Gilmore, R. (2009). "Cotranslational and Posttranslational N-glycosylation of Polypeptides by distinct Mammalian OST Isoforms." *Cell* 136(2): 272-283.
- Ruknudin, A. M. and Lakatta, E. G. (2007). "The Regulation of the Na/Ca Exchanger and Plasmalemmal Ca²⁺ ATPase by Other Proteins." *Ann N Y Acad Sci* 1099(1): 86-102.
- Rychkova, A. and Warshel, A. (2013). "Exploring the nature of the translocon-assisted protein insertion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(2): 495-500.
- Samanta, A., Hughes, T. E. T. and Moiseenkova-Bell, V. Y. (2018). "Transient Receptor Potential (TRP) Channels." *Sub-cellular biochemistry* 87: 141-165.
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C. J., Müller, D. J., Broz, P. and Hiller, S. (2016). "GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death." *The EMBO Journal* 35(16): 1766-1778.
- Scaglia, F., Carter, S., O'Brien, W. E. and Lee, B. (2004). "Effect of alternative pathway therapy on branched chain amino acid metabolism in urea cycle disorder patients." *Mol Genet Metab* 81 Suppl 1: S79-85.
- Schaeffer, C., Izzi, C., Vettori, A., Pasqualetto, E., Cittaro, D., Lazarevic, D., Caridi, G., Gnutti, B., Mazza, C., Jovine, L., Scolari, F. and Rampoldi, L. (2019). "Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease with Adult Onset due to a Novel Renin Mutation Mapping in the Mature Protein." *Scientific Reports* 9(1): 11601.
- Schaeffer, C., Merella, S., Pasqualetto, E., Lazarevic, D. and Rampoldi, L. (2017). "Mutant uromodulin expression leads to altered homeostasis of the endoplasmic reticulum and activates the unfolded protein response." *PLoS ONE* 12(4).
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., Paton, J. C., Paton, A. W., Cavalié, A. and Zimmermann, R. (2012). "BiP-mediated closing of the Sec61 channel via loop 7 interaction limits Ca²⁺ leakage from the ER." *EMBO Journal* 31(15): 3282-3296.
- Schorr, S., Klein, M. C., Gamayun, I., Melnyk, A., Jung, M., Schauble, N., Wang, Q., Hemmis, B., Bochen, F., Greiner, M., Lampel, P., Urban, S. K., Haßdenteufel, S., Dudek, J., Chen, X. Z., Wagner, R., Cavalié, A. and Zimmermann, R. (2015). "Co-chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum." *J Biol Chem* 290(30): 18621-18635.
- Schorr, S., Nguyen, D., Haßdenteufel, S., Nagaraj, N., Cavalié, A., Greiner, M., Weissgerber, P., Loi, M., Paton, A. W., Paton, J. C., Molinari, M., Förster, F., Dudek, J., Lang, S., Helms, V. and Zimmermann, R. (2020). "Identification of signal peptide features for substrate specificity in human Sec62/Sec63-dependent ER protein import." *Febs J* 287(21): 4612-4640.

- Schrag, J. D., Bergeron, J. J. M., Li, Y., Borisova, S., hahn, M., Thomas, D. Y. and Cygler, M. (2001). "The Structure of Clanexin, an ER Chaperone Involved in Quality control of Protein Folding." *Molecular Cell* 8(3): 633-644.
- Schubert, D., Klein, M. C., Haßdenteufel, S., Caballero-Oteyza, A., Yang, L., Proietti, M., Bulashevskaya, A., Kemming, J., Kühn, J., Winzer, S., Rusch, S., Fliegau, M., Schäffer, A. A., Pfeffer, S., Geiger, R., Cavalié, A., Cao, H., Yang, F., Li, Y., Rizzi, M., Eibel, H., Kobbe, R., Marks, A. L., Peppers, B. P., Hostoffer, R. W., Puck, J. M., Zimmermann, R. and Grimbacher, B. (2018). "Plasma cell deficiency in humans with heterozygous mutations in SEC61A1." *J Allergy Clin Immunol.* 141(4): 1427-1438.
- Schuren, A. B. C., Boer, I. G. J., Bouma, E., Lebbink, R. J. and Wiertz, E. J. H. J. (2019). "Genetic editing of SEC61, SEC62, and SEC63 abrogates human cytomegalovirus US2 expression in a signal peptide-dependent manner." under peer review.
- Schwarz, D. S. and Blower, M. D. (2016). "The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73(1): 79-94.
- Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O. and Kurtz, A. (2007). "Renin Release." *Physiology* 22(5): 310-319.
- Schweda, F., Riegger, G. A., Kurtz, A. and Krämer, B. K. (2000). "Store-operated calcium influx inhibits renin secretion." *American journal of physiology. Renal physiology* 279(1).
- Scott, K. A., Alonso, D. O., Sato, S., Fersht, A. R. and Daggett, V. (2007). "Conformational entropy of alanine versus glycine in protein denatured states." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(8): 2661-2666.
- Sehgal, P., Szalai, P., Olesen, C., Praetorius, H. A., Nissen, P., Christensen, S. B., Engedal, N. and Møller, J. V. (2017). "Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca(2+)-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca(2+) depletion and the unfolded protein response." *J Biol Chem* 292(48): 19656-19673.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 167-171.
- Shafqat, N., Kavanagh, K. L., Sass, J. O., Christensen, E., Fukao, T., Lee, W. H., Oppermann, U. and Yue, W. W. (2013). "A structural mapping of mutations causing succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency." *Journal of inherited metabolic disease* 36(6): 983-987.
- Shan, S.-O. (2019). "Guiding tail-anchored membrane proteins to the endoplasmic reticulum in a chaperone cascade." *The Journal of Biological Chemistry* 294(45): 16577-16586.
- Shao, S. and Hegde, R. S. (2011b). "A Flip Turn for Membrane Protein Insertion." *Cell* 146(1): 13-15.
- Shao, S. and Hegde, R. S. (2011c). "A Calmodulin-Dependent Translocation Pathway for Small Secretory Proteins." *Cell* 147(7): 1576-1588.
- Shaw, A. S., Rottier, P. J. M. and Rose, J. K. (1988). "Evidence for the loop model of signal-sequence insertion into the endoplasmic reticulum." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7592-7596.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W. A., Palazzo, A. F., Kozlov, M. M. and Rapoport, T. A. (2010). "Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER." *Cell* 143(5): 774-788.
- Shibata, Y., Voeltz, G. K. and Rapoport, T. A. (2006). "Rough Sheets and Smooth Tubules." *Cell* 126(3): 435-439.
- Shimomura, O., Masugi, T., Johnson, F. H. and Haneda, Y. (1978). "Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*." *Biochemistry* 17(6): 994-998.
- Shirane, M. and Nakayama, K. I. (2003). "Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis." *Nat Cell Biol* 5(1): 28-37.
- Sicking, M. (2017). Identifizierung und Charakterisierung der humanen Orthologe von Snd1 und Snd3 Masterarbeit, Universität des Saarlandes.
- Sicking, M., Lang, S., Bochen, F., Roos, A., Drenth, J. P. H., Zakaria, M., Zimmermann, R. and Linxweiler, M. (2021). "Complexity and Specificity of Sec61-Channelopathies: Human Diseases Affecting Gating of the Sec61 Complex." *Cells* 10(5): 1036.
- Skloot, R. (2010). *The Immortal life of Henrietta Lacks*. New York, Crown Publishing Group.
- Smith, B. J. (1984). "SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins." *Methods Mol Biol* 1: 41-55.

- Smith, M. A., Clemons, W. M., Jr., DeMars, C. J. and Flower, A. M. (2005). "Modeling the effects of prl mutations on the Escherichia coli SecY complex." *J Bacteriol* 187(18): 6454-6465.
- Snapp, E., Reinhart, G., Bogert, B., Lippincott-Schwartz, J. and Hegde, R. (2004). "The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells." *J Cell Biol* 164(7): 997-1007.
- Sommer, N., Junne, T., Kalies, K.-U., Spiess, M. and Hartmann, E. (2013). "TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane." *1833* 12(3104-3111).
- Stammers, A. N., Susser, S. E., Hamm, N. C., Hlynsky, M. W., Kimber, D. E., Kehler, D. S. and Duhamel, T. A. (2015). "The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA)." *Can J Physiol Pharmacol* 93(10): 843-854.
- Stefanovic, S. and Hegde, R. S. (2007). "Identification of a Targeting Factor for Posttranslational Membrane Protein Insertion into the ER." *Cell* 128(6): 1147-1159.
- Stepanenko, A. A. and Dmitrenko, V. V. (2015). "HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution." *Gene* 569(2): 182-190.
- Stone, M. R., O'Neill, A., Catino, D. and Bloch, R. J. (2005). "Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19." *Mol Biol Cell* 16(9): 4280-4293.
- Stradalova, V., Blazikova, M., Grossmann, G., Opekarová, M., Tanner, W. and Malinsky, J. (2012). "Distribution of Cortical Endoplasmic Reticulum Determines Positioning of Endocytic Events in Yeast Plasma Membrane." *PLoS ONE* 7(4): e35132.
- Strehler, E. E. and Treiman, M. (2004). "Calcium pumps of plasma membrane and cell interior." *Curr Mol Med* 4(3): 323-335.
- Sun, S., Li, X. and Mariappan, M. (2020). "Signal Sequences Encode Information for Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum." *bioRxiv*: 2020.2006.2004.133884.
- Takada, A., Miki, T., Kuno, A., Kouzu, H., Sunaga, D., Itoh, T., Tanno, M., Yano, T., Sato, T., Ishikawa, S. and Miura, T. (2012). "Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes." *PLoS ONE* 7(6): e39893-e39893.
- Takenami, T., Maeda, S., Karasawa, H., Suzuki, T., Furukawa, T., Morikawa, T., Takadate, T., Hayashi, H., Nakagawa, K., Motoi, F., Naitoh, T. and Unno, M. (2019). "Novel biomarkers distinguishing pancreatic head Cancer from distal cholangiocarcinoma based on proteomic analysis." *BMC Cancer* 19(1): 318-318.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M. and Kangawa, K. (2000). "Junctophilins: A Novel Family of Junctional Membrane Complex Proteins." *Molecular Cell* 6(1): 11-22.
- Takeshima, H., Venturi, E. and Sitsapesan, R. (2015). "New and notable ion-channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: do they support the process of intracellular Ca²⁺ release?" *The Journal of physiology* 593(15): 3241-3251.
- Talbot, B. E., Vandorpe, D. H., Stotter, B. R., Alper, S. L. and Schlondorff, J. S. (2019). "Transmembrane insertases and N-glycosylation critically determine synthesis, trafficking, and activity of the nonselective cation channel TRPC6." *The Journal of Biological Chemistry* 294(34): 12655-12669.
- Talmage, D. A. (2008). "Mechanisms of neuregulin action." *Novartis Foundation symposium* 289: 74-93.
- Tam, P. C. K., Maillard, A. P., Chan, K. K. Y. and Duong, F. (2005). "Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel." *The EMBO Journal* 24: 3380-3388.
- Targos, R., Baranska, J. and Pomorski, P. (2005). "Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells." *Acta Biochimica Polonica* 52(2): 397-409.
- Taura, T., Akiyama, Y. and Ito, K. (1994). "Genetic analysis of SecY: additional export-defective mutations and factors affecting their phenotypes." *Molecular and General Genetics MGG* 243(3): 261-269.
- Taylor, C. W. and Tovey, S. C. (2010). "IP(3) receptors: toward understanding their activation." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(12): a004010-a004010.

- Tennant, J. R. (1964). "Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability." *Transplantation* 2: 685-694.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. and Dawson, A. P. (1990). "Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase." *PNAS* 87(7): 2466-2470.
- Thomson, P. A., Christoforou, A., Morris, S. W., Adie, E., Pickard, B. S., Porteous, D. J., Muir, W. J., Blackwood, D. H. and Evans, K. L. (2007). "Association of Neuregulin 1 with schizophrenia and bipolar disorder in a second cohort from the Scottish population." *Mol Psychiatry* 12(1): 94-104.
- Thul, P. J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Björk, L., Breckels, L. M., Bäckström, A., Danielsson, F., Fagerberg, L., Fall, J., Gatto, L., Gnann, C., Hober, S., Hjelmare, M., Johansson, F., Lee, S., Lindskog, C., Mulder, J., Mulvey, C. M., Nilsson, P., Oksvold, P., Rockberg, J., Schutten, R., Schwenk, J. M., Sivertsson, Å., Sjöstedt, E., Skogs, M., Stadler, C., Sullivan, D. P., Tegel, H., Winsnes, C., Zhang, C., Zwahlen, M., Mardinoglu, A., Pontén, F., von Feilitzen, K., Lilley, K. S., Uhlén, M. and Lundberg, E. (2017). "A subcellular map of the human proteome." *Science* 356(6340): eaal3321.
- Tosal-Castano, S., Peselj, C., Kohler, V., Habernig, L., Berglund, L. L., Ebrahimi, M., Vögtle, F. N., Höög, J., Andréasson, C. and Büttner, S. (2021). "Snd3 controls nucleus-vacuole junctions in response to glucose signaling." *Cell Rep* 34(3): 108637.
- Tretter, T., Pereira, F. P., Ulucan, O., Helms, V., Allan, S., Kalies, K.-U. and Römisch, K. (2013). "ERAD and protein import defects in a sec61 mutant lacking ER-lumenal loop 7." *BMC Cell Biol* 14(1): 56.
- Trueman, S. F., Mandon, E. C. and Gilmore, R. (2012). "A gating motif in the translocation channel sets the hydrophobicity threshold for signal sequence function." *The Journal of Cell biology* 199(6): 907-918.
- Tsang, S. M., Oliemuller, E. and Howard, B. A. (2020). "Regulatory roles for SOX11 in development, stem cells and cancer." *Seminars in Cancer Biology* 67: 3-11.
- Tsien, R. Y. (1980). "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures." *Biochemistry* 19(11): 2396-2404.
- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Käll, L. and Elofsson, A. (2015). "The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides." *Nucleic Acids Res* 43(W1): 12.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G. and Bezprozvanny, I. (2006). "Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations." *Cell* 126(5): 981-993.
- Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J. and Zimmermann, R. (2003). "Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum." *EMBO Rep* 4(5): 505-510.
- Ubersax, J. A. and Ferrell Jr, J. E. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(7): 530-541.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. and Pontén, F. (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." *Science* 347(6220): 1260419.
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhor, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., Feilitzen, K. v., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Hans Brunnström, Glimelius, B., Sjöblom, T., Edqvist, P.-H., Djureinovic, D., Micke, P., Lindskog, C., Mardinoglu, A. and Pontén, F. (2017). "A pathology atlas of the human cancer transcriptome." *Science* 357(6352): eaan2507.

- Urade, T., Yamamoto, Y., Zhang, X., Ku, Y. and Sakisaka, T. (2014). "Identification and characterization of TMEM33 as a reticulon-binding protein." *Kobe J Med Sci* 60(3): E57-65.
- Valm, A. M., Cohen, S., Legant, W. R., Melunis, J., Hershberg, U., Wait, E., Cohen, A. R., Davidson, M. W., Betzig, E. and Lippincott-Schwartz, J. (2017). "Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome." *Nature* 546(7656): 162-167.
- van Anken, E. and Braakman, I. (2005). "Versatility of the Endoplasmic Reticulum Protein Folding Factory." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 40(4): 191-228.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C. and Rapoport, T. A. (2004). "X-ray structure of a protein-conducting channel." *Nature* 427(6969): 36-44.
- Van Nieuwenhove, E., Barber, J. S., Neumann, J., Smeets, E., Willemsen, M., Pasciuto, E., Prezzemolo, T., Lagou, V., Seldeslachts, L., Malengier-Devlies, B., Metzemaekers, M., Haßdenteufel, S., Kerstens, A., van der Kant, R., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Di Marino, D., Lang, S., Zimmermann, R., Schlenner, S., Munck, S., Proost, P., Matthys, P., Devalck, C., Boeckx, N., Claessens, F., Wouters, C., Humblet-Baron, S., Meyts, I. and Liston, A. (2020). "Defective SEC61alpha1 underlies a novel cause of autosomal dominant severe congenital neutropenia." *J Allergy Clin Immunol*.
- Van Puyenbroeck, V. and Vermeire, K. (2018). "Inhibitors of protein translocation across membranes of the secretory pathway: novel antimicrobial and anticancer agents." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75(9): 1541-1558.
- Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Vangheluwe, P. (2009). "Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(44): 18533-18538.
- Venturi, E., Mio, K., Nishi, M., Ogura, T., Moriya, T., Pitt, S. J., Okuda, K., Kakizawa, S., Sitsapesan, R., Sato, C. and Takeshima, H. (2011). "Mitsugumin 23 forms a massive bowl-shaped assembly and cation-conducting channel." *Biochemistry* 50(13): 2623-2632.
- Veratti, E. (1961). "Investigations on the fine structure of striated muscle fiber read before the Reale Istituto Lombardo, 13 March 1902." *J Biophys Biochem Cytol* 10(4): 1-59.
- Vilardi, F., Lorenz, H. and Dobberstein, B. (2011). "WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane." *J Cell Sci* 124(8): 1301-1307.
- Vilardi, F., Stephan, M., Clancy, A., Janshoff, A. and Schwappach, B. (2014). "WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane." *PLoS ONE* 9(1): e85033-e85033.
- Virkki, M., Boekel, C., Illergård, K., Peters, C., Shu, N., Tsigirgos, K. D., Elofsson, A., von Heijne, G. and Nilsson, I. (2014). "Large tilts in transmembrane helices can be induced during tertiary structure formation." *J Mol Biol* 426(13): 2529-2538.
- Vishnu, N., Jadoon Khan, M., Karsten, F., Groschner, L. N., Waldeck-Weiermair, M., Rost, R., Hallström, S., Imamura, H., Graier, W. F. and Malli, R. (2014). "ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca²⁺ release." *Mol Biol Cell* 25(3): 368-379.
- Vitale, M., Bakunts, A., Orsi, A., Lari, F., Tadè, L., Danieli, A., Rato, C., Valetti, C., Sitia, R., Raimondi, A., Christianson, J. C. and van Anken, E. (2019). "Inadequate BiP availability defines endoplasmic reticulum stress." *eLife* 8: e41168.
- Voeltz, G., Rolls, M. and Rapoport, T., (2002). "Structural organization of the endoplasmic reticulum " *EMBO Rep* 3(10): 944-950.
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M. and Rapoport, T. A. (2006). "A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum." *Cell* 124(3): 573-586.
- von Heijne, G. (1986). "A new method for predicting signal sequence cleavage sites." *Nucleic. Acids. Res.* 14: 4683-4690.
- von Heijne, G. (1990). "The signal peptide." *J Membr Biol* 115(3): 195-201.
- von Heijne, G. (1992). "Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule." *J Mol Biol* 225(2): 487-494.

- von Heijne, G. and Gavel, Y. (1988). "Topogenic signals in integral membrane proteins." *European journal of Biochemistry* 174(4): 671-678.
- Voorhees, R. M., Fernández, I. S., Scheres, S. H. W. and Hegde, R. S. (2014). "Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4Å resolution." *Cell* 157(7): 1632-1643.
- Voorhees, R. M. and Hegde, R. S. (2016a). "Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence." *Science* 351(6268): 88-91.
- Voorhees, R. M. and Hegde, R. S. (2016b). "Toward a structural understanding of co-translational protein translocation." *Curr Opin Cell Biol* 41: 91-99.
- Wallin, E. and Heijne, G. V. (1998). "Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms." *Protein Science* 7(4): 1029-1038.
- Walter, P. and Blobel, G. (1981b). "Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes." *J. Cell Biol.* 91: 557-561.
- Walter, P. and Blobel, G. (1983). "Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation." *Methods Enzymol.* 96: 84-93.
- Walter, P. and Johnson, A. E. (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10: 87-119.
- Wang, F., Chan, C., Weir, N. R. and Denic, V. (2014). "The Get1/2 transmembrane complex is an endoplasmic-reticulum membrane protein insertase." *Nature* 512(7515): 441-444.
- Wang, H., Pezeshki, A. M., Yu, X., Guo, C., Subjeck, J. R. and Wang, X.-Y. (2015). "The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP170: From Immunobiology to Cancer Therapeutics." *Frontiers in oncology* 4: 377-377.
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R. and Lee, A. S. (2009). "Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders." *Antioxidants & redox signaling* 11(9): 2307-2316.
- Wang, P. and Heitman, J. (2005). "The cyclophilins." *Genome biology* 6(7): 226-226.
- Wang, Q.-C., Zheng, Q., Tan, H., Zhang, B., Li, X., Yang, Y., Yu, J., Liu, Y., Chai, H., Wang, X., Sun, Z., Wang, J.-Q., Zhu, S., Wang, F., Yang, M., Guo, C., Wang, H., Zheng, Q., Li, Y., Chen, Q., Zhou, A. and Tang, T.-S. (2016). "TMCO1 Is an ER Ca²⁺ Load-Activated Ca²⁺ Channel." *Cell* 165(6): 1454-1466.
- Watts, C., Wickner, W. and Zimmermann, R. (1983). "M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2809-2813.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J Biol Chem* 244(16): 4406-4412.
- Welch, W. J. and Brown, C. R. (1996). "Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding." *Cell Stress & Chaperones* 1(2): 109-115.
- Westermeier, R. and Marouga, R. (2005). "Protein detection methods in proteomics research." *Biosci Rep* 25(1-2): 19-32.
- Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A. and Voeltz, G. K. (2015). "Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape." *Annu Rev Biochem* 84: 791-811.
- White, S. H. and Wimley, W. C. (1999). "Membrane protein folding and stability: physical principles." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28: 319-365.
- Wiertelak, W., Sosicka, P., Olczak, M. and Maszczak-Seneczko, D. (2020). "Analysis of homologous and heterologous interactions between UDP-galactose transporter and beta-1,4-galactosyltransferase 1 using NanoBiT." *Anal Biochem* 593(113599): 28.
- Wiggins, R. C. (1987). "Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions." *Clin Chim Acta* 162(3): 329-340.
- Wight, T. N. and Potter-Perigo, S. (2011). "The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?" *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 301(6): G950-G955.

- Wilkinson, B. M., Brownsword, J. K., Mousley, C. J. and Stirling, C. J. (2010). "Sss1p is required to complete protein translocon activation." *J Biol Chem* 285(42): 32671-32677.
- Williams, S. E., Reed, A. A., Galvanovskis, J., Antignac, C., Goodship, T., Karet, F. E., Kotanko, P., Lhotta, K., Morinière, V., Williams, P., Wong, W., Rorsman, P. and Thakker, R. V. (2009). "Uromodulin mutations causing familial juvenile hyperuricaemic nephropathy lead to protein maturation defects and retention in the endoplasmic reticulum." *Hum Mol Genet* 18(16): 2963-2974.
- Williams, T. A. and Embley, T. M. (2015). "Changing ideas about eukaryotic origins." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1678): 20140318.
- Winnefeld, M., Grewenig, A., Schnölzer, M., Spring, H., Knoch, T. A., Gan, E. C., Rommelaere, J. and Cziepluch, C. (2006). "Human SGT interacts with Bag-6/Bat-3/Scythe and cells with reduced levels of either protein display persistence of few misaligned chromosomes and mitotic arrest." *Experimental Cell Research* 312(13): 2500-2514.
- Wirth, A., Jung, M., Bies, C., Frien, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R. and Wagner, R. (2003). "The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel." *Mol Cell* 12(1): 261-268.
- Witham, C. M., Dassanayake, H. G., Paxman, A. L., Stevens, K. L. P., Baklous, L., White, P. F., Black, A. L., Steuart, R. F. L., Stirling, C. J., Schulz, B. L. and Mousley, C. J. (2020). "The conserved C-terminus of Sss1p is required to maintain the endoplasmic reticulum permeability barrier." *J Biol Chem* 295(7): 2125-2134.
- Woolhead, C. A., McCormick, P. J. and Johnson, A. E. (2004). "Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins." *Cell* 116(5): 725-736.
- Wu, X., Cabanos, C. and Rapoport, T. A. (2019). "Structure of the post-translational protein translocation machinery of the ER membrane." *Nature* 566(7742): 136-139.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L. and Missiaen, L. (2002). "Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps." *Cell Calcium* 32(5-6): 279-305.
- Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *The Journal of pathology* 214(2): 199-210.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B. and Marks, P. A. (2007). "Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action." *Oncogene* 26(37): 5541-5552.
- Yam, G. H.-F., Gaplovska-Kysela, K., Zuber, C. and Roth, J. r. (2007). "Sodium 4-Phenylbutyrate Acts as a Chemical Chaperone on Misfolded Myocilin to Rescue Cells from Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48(4): 1683-1690.
- Yamamoto, Y. and Sakisaka, T. (2012). "Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells." *Mol Cell* 48(3): 387-397.
- Yamashita, A., Taniwaki, T., Kaikoi, Y. and Yamazaki, T. (2013). "Protective role of the endoplasmic reticulum protein mitsugumin23 against ultraviolet C-induced cell death." *FEBS Lett* 587(9): 1299-1303.
- Yamazaki, T., Sasaki, N., Nishi, M. and Takeshima, H. (2010). "Facilitation of DNA damage-induced apoptosis by endoplasmic reticulum protein mitsugumin23." *Biochem Biophys Res Commun* 392(2): 196-200.
- Yang, J., Hirata, T., Liu, Y. S., Guo, X. Y., Gao, X. D., Kinoshita, T. and Fujita, M. (2021). "Human SND2 mediates ER targeting of GPI-anchored proteins with low hydrophobic GPI attachment signals." *FEBS Lett* 10(10): 1873-3468.
- Ying, W. Z. and Sanders, P. W. (1998). "Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats." *Kidney Int* 54(4): 1150-1156.
- Yompakdee, C., Ogawa, N., Harashima, S. and Oshima, Y. (1996). "A putative membrane protein, Pho88p, involved in inorganic phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* 251(5): 580-590.
- Yoshida, Y., Suzuki, K., Yamamoto, A., Sakai, N., Bando, M., Tanimoto, K., Yamaguchi, Y., Sakaguchi, T., Akhter, H., Fujii, G., Yoshimura, S., Ogata, S., Sohda, M., Misumi, Y. and Nakamura, N.

- (2008). "YIPF5 and YIF1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure." *Exp Cell Res* 314(19): 3427-3443.
- Yu, F., Sun, L., Hubrack, S., Selvaraj, S. and Machaca, K. (2013). "Intramolecular shielding maintains the ER Ca²⁺ sensor STIM1 in an inactive conformation." *J Cell Sci* 126(Pt 11): 2401-2410.
- Yu, L., Chen, X., Sun, X., Wang, L. and Chen, S. (2017). "The Glycolytic Switch in Tumors: How Many Players Are Involved?" *Journal of Cancer* 8(17): 3430-3440.
- Zhang, B. and Miller, T. F., 3rd (2012). "Long-timescale dynamics and regulation of Sec-facilitated protein translocation." *Cell Rep* 2(4): 927-937.
- Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., De Strooper, B. and Bezprozvanny, I. (2010). "Role of Presenilins in Neuronal Calcium Homeostasis." *The Journal of Neuroscience* 30(25): 8566-8580.
- Zhao, Y., Hu, J., Miao, G., Qu, L., Wang, Z., Li, G., Lv, P., Ma, D. and Chen, Y. (2013). "Transmembrane protein 208: a novel ER-localized protein that regulates autophagy and ER stress." *PLoS ONE* 8(5): e64228-e64228.
- Zimmerhackl, L. B., Rostasy, K., Wiegele, G., Rasenack, A., Wilhelm, C., Lohner, M., Brandis, M. and Kinne, R. K. (1996). "Tamm-Horsfall protein as a marker of tubular maturation." *Pediatr Nephrol* 10(4): 448-452.
- Zimmermann, R., Eyrisch, S., Ahmad, M. and Helms, V. (2011). "Protein translocation across the ER membrane." *Biochim Biophys Acta* 1808(3): 912-924.
- Zimmermann, R. and Lang, S. (2020). "A Little AXER ABC: ATP, BiP, and Calcium Form a Triumvirate Orchestrating Energy Homeostasis of the Endoplasmic Reticulum." *Contact* 3: 2515256420926795.
- Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M. J. and Pelham, H. R. B. (1988). "Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes." *EMBO J.* 7: 2875-2880.
- Ziska, A., Tatzelt, J., Dudek, J., Paton, A. W., Paton, J. C., Zimmermann, R. and Haßdenteufel, S. (2019). "The signal peptide plus a cluster of positive charges in prion protein dictate chaperone-mediated Sec61 channel gating." *Biol Open* 8(3): 040691.
- Živná, M., Hulková, H., Matignon, M., Hodanová, K., Vyleťal, P., Kalbacová, M., Baresová, V., Sikora, J., Blazková, H., Zivny, J., Ivanek, R., Stranecky, V., Sovová, J., Claes, K., Lerut, E., Fryns, J. P., Hart, P. S., Hart, T. C., Adams, J. N., Pawtowski, A., Clemessy, M., Gasc, J. M., Gubler, M. C., Antignac, C., Elleder, M., Kapp, K., Grimbert, P., Bleyer, A. J. and Knoch, S. (2009). "Dominant renin gene mutations associated with early-onset hyperuricemia, anemia, and chronic kidney failure." *Am J Hum Genet* 85(2): 204-213.
- Živná, M., Kidd, K., Zaidan, M., Vyleťal, P., Barešová, V., Hodaňová, K., Sovová, J., Hartmannová, H., Votruba, M., Trešlová, H., Jedličková, I., Sikora, J., Hůlková, H., Robins, V., Hnízda, A., Živný, J., Papagregoriou, G., Mesnard, L., Beck, B. B., Wenzel, A., Tory, K., Häeffner, K., Wolf, M. T. F., Bleyer, M. E., Sayer, J. A., Ong, A. C. M., Balogh, L., Jakubowska, A., Łaszkiwicz, A., Clissold, R., Shaw-Smith, C., Munshi, R., Haws, R. M., Izzi, C., Capelli, I., Santostefano, M., Graziano, C., Scolari, F., Sussman, A., Trachtman, H., Decramer, S., Matignon, M., Grimbert, P., Shoemaker, L. R., Stavrou, C., Abdelwahed, M., Belghith, N., Sinclair, M., Claes, K., Kopel, T., Moe, S., Deltas, C., Knebelmann, B., Rampoldi, L., Knoch, S. and Bleyer, A. J. (2020). "An international cohort study of autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease due to *REN* mutations identifies distinct clinical subtypes." *Kidney Int* 98(6): 1589-1604.
- Zurzolo, C. and Simons, K. (2016). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: Membrane organization and transport." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858(4): 632-639.

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: GRAFISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER EXPERIMENTELLEN ARBEITEN:.....	XI
Abb. 2: DARSTELLUNG VON SEC61A IN DER MEMBRAN UND POSITIONIERUNG DER SPEZIELLEN FUNKTIONSBEREICHE.....	5
Abb. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TOPOLOGIE VON PROTEINKLASSEN IN DER ER MEMBRAN.....	9
Abb. 4: MÖGLICHKEITEN DES COTRANSLATIONALEN PROTEINTRANSPORTES.	11
Abb. 5: MÖGLICHKEITEN DES POSTTRANSLATIONALEN TRANSPORTES.....	13
Abb. 6: STRUKTURELLE DARSTELLUNG DES SEC61A-KOMPLEX IM GEÖFFNETEN UND GESCHLOSSENEN ZUSTAND.	18
Abb. 7: VERTEILUNG VON Ca^{2+} IN DER ZELLE UND SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CALCIUMREGULATOREN.	23
Abb. 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SEC61A-KANALS UND POSITIONEN DER PATHOLOGISCHEN MUTATIONEN.	31
Abb. 9: GRAFISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ZIELSETZUNG DER ARBEIT.	33
Abb. 10: KONTROLLE DER SPEZIFITÄT DER CO-IP, DURCHFÜHRT MIT ANTIKÖRPERN GEGEN ENDOGENES hSND2 PROTEIN.	59
Abb. 11: ENZYMATISCH GEKOPPELTE REAKTION UND AUSWERTUNGSSHEMA DES SERCA-AKTIVITÄTSASSAYS.....	61
Abb. 12: GRUNDLAGE DES NANOBIT-SYSTEMS.	65
Abb. 13: ETABLIERUNG DER SYNTHETISCHEN PEPTIDKOMPLEMENTATION ZUM NACHWEIS DER LGBIT MARKIERTEN PROTEINE.....	67
Abb. 14: ETABLIERUNG DER SYNTHETISCHEN KOMPLEMENTATION DURCH DIE VERWENDUNG UNTERSCHIEDLICHER PEPTIDE.....	69
Abb. 15: GRAFISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER SEQUESTRIERUNG ZUR ÜBERPRÜFUNG DER PROTEINTOPOLOGIE.	71
Abb. 16: ETABLIERUNG DER SEQUESTRIERUNG AM BEISPIEL DES TRAPf MEMBRANPROTEINS.	73
Abb. 17: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EFFEKTOREN, DIE EINFLUSS AUF DIE CALCIUMHOMÖOSTASE NEHMEN.....	99
Abb. 18: SPEZIFIZIERUNG DER hSND2-INTERAKTIONSPARTNER DURCH EINE OPTIMIERTE CO-IP MIT hSND2-FLAG ALS BAITPROTEIN.	106
Abb. 19: IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DER ENDOGENEN CO-IP.....	109
Abb. 20: ETABLIERUNG DER CO-IP MIT TMEM109-FLAG ALS BAITPROTEIN.	111
Abb. 21: CO-IP MIT UNBEHANDELTEN ZELLEN DIE MIT TMEM109 ALS BAITPROTEIN DURCHFÜHRT WURDEN.....	113
Abb. 22: CO-IP MIT POTENZIELLEN hSND2 INTERAKTIONSPARTNERN, UM DIE BISHER IDENTIFIZIERTE INTERAKTION REZIPROK ZU BESTÄTIGEN.....	114
Abb. 23: TOPOLOGISCHE VORHERSAGE DER STRUKTUR VON hSND2 MITTELS VERSCHIEDENER SOFTWARE.	115
Abb. 24: SEQUESTRIERUNG VON VERSCHIEDENEN PROTEINEN ZUR AUFLÄRUNG DER LOKALISIERUNG DER TERMINI.	118
Abb. 25: NACHWEIS DER LOKALISIERUNG DES C-TERMINUS VON hSND2 DURCH <i>IN VITRO</i> UND <i>IN CELLULA</i> GLYKOSYLIERUNG.....	120
Abb. 26: INTERAKTIONSNACHWEIS ZWISCHEN TRAPa UND TRAPb.	123
Abb. 27: INTERAKTIONSNACHWEIS ZWISCHEN SEC61A-NL UND SEC61B-Ns.	124
Abb. 28: DARSTELLUNG VON INTERAKTIONEN ZWISCHEN PROTEINEN UNTERSCHIEDLICHER KOMPLEXE.....	125
Abb. 29: TMEM109 UND hSND2 NANOBIT KONSTRUKTE, DEREN INTERAKTIONSMÖGLICHKEITEN UND DER ERMITTLUNG DER EFFEKTIVSTEN KOMBINATION AUS hSND2 UND TMEM109.	127
Abb. 30: HOMOMULTIMERISIERUNG DES TMEM109-PROTEINS.	129
Abb. 31: ZUSAMMENFASSUNG DER NANOBIT-STUDIEN UND DARSTELLUNG DES INTERAKTIONSNETZWERKES RUND UM DIE PROTEINE hSND2 UND TMEM109.....	131
Abb. 32: VERIFIZIERUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN TMEM109 UND TRAPa.....	132
Abb. 33: IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS SMBIT MARKIERTER PROTEINE MIT HILFE DES GENERIERTEN SMBIT ANTIKÖRPERS.....	135
Abb. 34: IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN, DIE MIT DEN SMBIT- ODER LGBIT-REPORTERSTRUKTUREN VERSEHEN WURDEN.....	137
Abb. 35: NACHWEIS DER NANOBIT-KONSTRUKTE DURCH SYNTHETISCHE KOMPLEMENTATION.	139
Abb. 36: GENETISCHE ANALYSE DER STABIL TRANSFIZIERTEN HEK-ZELLEN.....	141
Abb. 37: ERMITTLUNG PHÄNOTYPISCHER PARAMETER PER COUNTESS® AUTOMATED CELL COUNTER.....	142
Abb. 38: BESTIMMUNG DER MINIMALEN UND MAXIMALEN CALCIUMKAPAZITÄT DES ZYTOSOLS.	143
Abb. 39: IMMUNOLOGISCHE DETEKTION RELEVANTER PROTEINE IM KONTEXT DER SEC61A1-MUTATIONEN.....	145
Abb. 40: NACHWEIS DER mRNA MENGE MITTELS QRT-PCR.....	146
Abb. 41: BESTIMMUNG DES CALCIUMLEAKS UND DES SOCE DER DREI ZELLINIEN.....	148
Abb. 42: BESTIMMUNG DER MENGE DES AN LÖSLICHEM CALCIUM IM ER DER GESAMTEN ZELLE.....	149
Abb. 43: KINETIK DER SPEICHERKAPAZITÄT DES ERS.....	151
Abb. 44: KINETIK DES CALCIUMLECKKANALS, VISUALISIERT DURCH THAPSIGARGIN.....	152

ABB. 45: BESTIMMUNG DER CALCIUMDEPLETION AUS DEM ER, ERMITTELT DURCH DEN GENETISCH CODIERTEN CALCIUMSENSOR GCAMP ₆₋₁₅₀	153
ABB. 46: BESTIMMUNG DER SERCA AKTIVITÄT.....	155
ABB. 47: MESSUNG DES STRESSINDUZIERTEN CALCIUMLEAKS AUSGELÖST DURCH DIE BEHANDLUNG MIT TUNICAMYCIN.	157
ABB. 48: EFFEKT DER GETESTETEN SUBSTANZEN AUF DEN ZELLINDEX DER VERSCHIEDENEN ZELLINIEN IM VERGLEICH ZU DEN JEWEILIGEN LÖSEMITTELKONTROLLEN.	159
ABB. 49: WIRKUNG VON 4-PBA AUF DIE DREI UNTERSCHIEDLICHEN HEK-ZELLINIEN.	161
ABB. 50: KURZZEITIGER EFFEKT VON 4-PBA AUF DEN CALCIUMLEAK AUS DEM ER-LUMEN.	165
ABB. 51: EINFLUSS DER KURZZEITIGEN BEHANDLUNG MIT 4-PBA AUF DIE GESAMTCALCIUMKAPAZITÄT DER HEK-ZELLINIEN.....	166
ABB. 52: VERÄNDERUNG DER GESAMTCALCIUMKAPAZITÄT DURCH DIE BEHANDLUNG MIT 4-PBA FÜR 36 STUNDEN.	167
ABB. 53: REAKTION DER HEK-ZELLEN AUF DIE BEHANDLUNG MIT EYARESTATIN 1 (ES1) IM <i>LIVE-CELL CALCIUM IMAGING</i>	169
ABB. 54: PROTEINTRANSPORT VERSCHIEDENER SUBSTRATE IN V67G- UND T185A-ZELLEN, DIE ENTWEDER IN CO- ODER POSTTRANSLATIONALEN BEDINGUNGEN TRANSPORTIERT WURDEN.	171
ABB. 55: MESSUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT VON RENIN ALS MAßEINHEIT DER RENINSEKRETION	172
ABB. 56: EFFEKT DES SIGNALSEQUENZAUSTAUSCHES AUF DEN TRANSPORT IN <i>SEC61A1</i> -MUTIERTEN ADTKD-HEK-ZELLEN.....	174
ABB. 57: PROTEINTRANSPORT DES RENIN-PROTEINS BEEINFLUSST DURCH 4-PBA IN V67G UND T185A ZELLEN.....	175
ABB. 58: DOCKING SIMULATION ZWISCHEN DEM OFFENEN <i>SEC61A</i> -PROTEIN UND 4-PBA.	177
ABB. 59: ÜBERTRAGUNG DER NANOBIT-ERGEBNISSE AUF STRUKTURDATEN UND VERGLEICHBARKEIT DES SYSTEMS IN ALTERNATIVEN HELA-ZELLEN.	183
ABB. 60: SCHEMATISCHER AUFBAU DES hSND2 TRANSPORTWEGES IN KOOPERATION MIT DEM TRANSLOKON.....	188
ABB. 61: <i>SEC61A</i> -STRUKTUR MIT DER EINGEZEICHNETEN POSITION DER JEWEILIGEN MUTATIONEN V67G ODER T185A.	194
ABB. 62: VERGLEICH DER ABUNDANZ DER mRNA VERSCHIEDENER ZELLULÄRER FUNKTIONEN ZWISCHEN DEN MUTANTEN MIT DEM WT.	205
ABB. 63: VOLCANO-BLOT ZUR DARSTELLUNG DER GESAMTEN VERÄNDERUNG DER GESAMTEN mRNA-MENGEN DER ZELLEN.....	207
ABB. 64: ZUSAMMENFASSUNG DER DURCH ZUR ADTKD FÜHRENDEN EFFEKTE UND DEREN RETTUNG DURCH DEN EINSATZ VON 4- PBA.	211
ABB. 65: GLOBALE mRNA ANALYSE DER DREI ADTKD ASSOZIIERTEN HEK ZELLINIEN.....	257

11. Tabellenverzeichnis

TAB. 1 ÜBERSICHT ÜBER DIE FORMEN DER ADTKD.	28
TAB. 2: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN, GERÄTE UND SOFTWARE.....	34
TAB. 3: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN, ENZYME UND KITS MIT ZUORDNUNG ZUM HERSTELLER.	36
TAB. 4: AUFLISTUNG DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER.	38
TAB. 5: AUFLISTUNG DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER.....	41
TAB. 6: AUFLISTUNG DER DIREKT IN DER ARBEIT VERWENDETEN PEPTIDE.	42
TAB. 7: LISTE DER FÜR DIE QRT-PCR-VERSUCHE VERWENDETEN DNA OLIGONUKLEOTIDE.....	42
TAB. 8: LISTE DER FÜR DIE SEQUENZIERUNG UND ZUR MUTAGENESE EINGESETZTEN PRIMER.	42
TAB. 9: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE PLASMIDE FÜR <i>IN VITRO</i> UND <i>IN CELLULA</i> VERSUCHE.....	45
TAB. 10: SCHEMA ZUR HERSTELLUNG EINES SDS-POLYACRYLAMIDGELS.	52
TAB. 11: PIPETTIERSCHEMA EINER <i>IN VITRO</i> TRANSPORTREAKTION JE UNTER CO- ODER POSTTRANSLATIONALEN BEDINGUNGEN.	76
TAB. 12: PIPETTIERSCHEMA DER VERWENDETEN PLASMIDE ZUR EXPRESSION IN HE ^{LA} -ZELLEN.	90
TAB. 13: ZUSAMMENFASSUNG DER EFFEKTE, DIE VON DEN MUTATIONEN <i>SEC61A1-V67G</i> ODER <i>SEC61A1-T185A</i> AUSGELÖST WERDEN.	189
TAB. 14: AUFLISTUNG VON PROTEINEN, DIE DURCH DIE <i>SEC61A1</i> -MUTATIONEN <i>V67G</i> UND <i>T185A</i> IN DEREN TRANSPORTEIGENSCHAFT ODER ABUNDANZ NEGATIV BEEINFLUSST SIND.....	200
TAB. 15: ANHANG ZU ABB. 18 AUS KAPITEL 6.1.1.	252
TAB. 16: ANHANG ZU DEN ERGEBNISSEN IN KAPITEL 6.1.2.	253
TAB. 17: AUSWERTUNG DER RTCA ERGEBNISSE, CODIERT IN DER HEATMAP IN ABB. 48.	255

12. Publikationen

Haßdenteufel S., **Sicking M.**, Schorr S., Aviram N., Fecher-Trost C., Schuldinger M., Jung M., Zimmermann R., Lang S. (2017) hSnd2 protein represents an alternative targeting factor to the endoplasmic reticulum in human cells. **FEBS Letters**, Oct; 591 (20):3211-3224. Doi: 10.1002/1873-3468.12831.

Ausgewählt für: Editor's choice Articles

Sicking M., Lang S., Bochen F., Roos A., Drenth J.P.H., Zakaria M., Zimmermann R., Linxweiler M. (2021) Complexity and Specificity of Sec61-Channelopathies: Human Diseases Affecting Gating of the Sec61 Complex. **Cells**. Apr 27;10(5):1036. doi: 10.3390/cells10051036. PMID: 33925740.

Im Druck

Melnyk A., Lang S., **Sicking M.**, Zimmermann R., Jung M. (2021) Co-Chaperones of the human endoplasmic reticulum: an update, Buchkapitel

In Revision

Sicking M., Živná M., Bhadra P., Tirincci A., Hadžibegdanović D., Barešová V., Hodaňová K., Vyleťal P., Sovová J., Jedličková I., Jung M., Bell T., Helms V., Kmoch S., Cavalié A., Lang S. (2021) Phenylbutyrate rescues transport defects of the disease-associated Sec61 α mutations V67G and T185A. **Life Science Alliance**

Sicking M. Jung M., Lang S.; Lights, Camera, Interaction: Studying Protein-Protein-Interactions of the ER Protein Translocase in Living Cells. **International Journal of Molecular Science**

In Vorbereitung:

Tirincci A., **Sicking M.**, Hadžibegdanović D., Haßdenteufel S., Lang S.; SNDing and Receiving - The Promiscuity of Protein Targeting to the Endoplasmic Reticulum; Review article

Tirincci A., **Sicking M.**, Fecher-Trost C., Cavalié A., Lang S.; Comparative proteomic analyses of ER protein targeting pathways identifies TMEM109 as component of the mammalian SND pathway.

13. Danksagung

Die Erstellung der vorliegenden Dissertation wäre ohne die Unterstützung unterschiedlichster Personen in diesem Maße nicht realisierbar gewesen, denen ich auf diesem Weg danken möchte.

Danken möchte ganz besonders meinem Doktorvater und Betreuer Dr. Sven Lang. Für Deine Bestärkung nach dem Master eine Promotion anzuschließen und für das Vertrauen mit mir eine neue Arbeitsgruppe aufzubauen bin ich Dir unendlich dankbar und beides bedeutet mir viel. Die mit der Zeit übertragenen Verantwortungen und Freiheiten ließen mich nicht nur wissenschaftlich wachsen. Das äußerst fördernde, präzise und neugierige Umfeld, das Du geschaffen hast, sind für mich von einem unschätzbaren Wert.

Des Weiteren möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. Richard Zimmermann danken. Seit dem ersten Praktikum in Deiner Arbeitsgruppe bis in den Ruhestand hinein warst Du ein Förderer, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Hinweise und facettenreichen Möglichkeiten, die Du mir geboten hast, waren sehr wertvoll für mich.

Monika Lerner, Du weißt Bescheid, ein riesiges Dankeschön! Ohne Dich wäre vieles nicht möglich gewesen. Deine Expertise und immerwährende Hilfsbereitschaft weiß ich sehr zu schätzen und sind unbezahlbar. Zusätzlich hast du mich mit deinen Ausflugstipps mit den schönsten Gegenden des Saarlandes bekannt gemacht: Danke dafür. Den anderen Doktoranden und Studenten der Arbeitsgruppe Andrea TirinCSI, Drazena Hadžibegdanović und Gamar Musayeva, möchte ich ebenfalls für das Teamwork und die schöne gemeinsame Zeit danken. Dank euch allen war es nicht nur ein Arbeitsplatz in der Biochemie.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe von Apl. Prof. Dr. Martin Jung: Martin Jung, Sabine Pelvay, Karsten Mayr, Aline Herges. Vielen Dank für jede Diskussion mit Euch. Sie haben mich im positiven Sinne an den Rand des Wahnsinns getrieben. Ganz besonders möchte ich Lisa Ludes hier danken. Schade, dass die Pandemie dich zum Auszug aus unserem Büro gezwungen hat. Jede künstlerische Pause in deinem neuen Büro hat sich gelohnt.

Den alten Kolleginnen und ehemaligen Büromädels, Regine Stutz, Marie-Christine Klein, Hanne Folz und Sarah Haßdenteufel möchte ich dafür danken, dass Ihr mich unfassbar humorvoll in die Arbeitsgruppe und im Saarland aufgenommen habt. Ich habe Euch wirklich vermisst.

Petra Endlein, Iris Dlugosch und Holger Unruh, vielen Dank dass ihr um uns herum alles am Laufen haltet und uns so unterstützt. Auch Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt und seiner

Arbeitsgruppe möchte ich in diesem Zuge ebenfalls für jede Expertise, die ihr von außen in die Arbeit hineingebracht habt, danken.

Des Weiteren möchte ich dem Verbund des IRTG1830 danken für spannende und hochinteressante Meetings und die Möglichkeit meine Arbeit einem breiten Publikum vorzustellen und mit internationalen Wissenschaftlern diskutieren zu können. Ein besonderer Dank gilt meinen Co-Betreuern Prof. Dr. Barbara Niemeyer und Dr. Howard Young, die mich helfend und beratend unterstützt haben. Besonders ist hier Dr. Gabriele Amoroso zu nennen, die unermüdlich alles für die Promotionsstudierenden möglich macht!

Ein weiteres Dankeschön möchte ich an die Kollaborationspartner richten, die sowohl mit Wissen als auch Material diese Arbeit unterstützten und ermöglichten. Zu diesen gehören vor allem Prof. Dr. Adolfo Cavalié, dessen Geräte ich nutzen durfte, beraten durch Dr. Tillman Pick. Ebenso möchte ich Dr. Martina Živná und Prof. Stanislav Kmoch danken, die die HeK-Zelllinie und auch Ergebnisse zur Verfügung gestellt haben. Dr. Pratiti Bhadra und Prof. Dr. Volkhard Helms möchte ich für die Modellierung des Sec61 α Proteins danken. Dr. Claudia Fecher-Trost machte die MS-Analysen möglich: Vielen Dank dafür. Der Zugang zu Plasmiden, Antikörpern, Peptiden und Protokollen wurden freundlicherweise von den Apl. Prof. Dr. Martin Jung, Prof. Dr. Barbara Niemeyer, Junprof. Dr. Bianca Schrul, und Prof. Thomas Simmen ermöglicht - zusammen mit der entsprechend wertvollen Expertise. Auch wenn nicht alles Bestandteil der Arbeit geworden ist, freute ich mich über jeden Einblick, den ich dadurch gewinnen konnte.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern Reinhard und Mechthild und meiner Schwester Lisa danken. Ohne Euren bedingungslosen Rückhalt und Unterstützung seit Beginn des Studiums aus der Heimat wäre das nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die förderlichen und aufmunternden Worte und jeden kleinen Urlaub daheim. Es war jedes Mal eine willkommene Abwechslung.

Barbara, einfach nur Danke für alles! Fürs Zuhören, fürs Ablenken, für jede Tour an den Wochenenden, für das Feiern jedes kleineren und größeren Erfolges und Abschütteln von Rückschlägen. Dafür das Du ein liebevolles Fundament warst, wenn es mal wieder drunter und drüber ging und wir das ganze Projekt zusammen geschafft haben, bin ich Dir aus tiefstem Herzen dankbar.

Vielen Dank Euch allen!

14. Anhang

Tab. 15: Anhang zu Abb. 18 aus Kapitel 6.1.1. Aufgeführt sind alle in der MS identifizierten Proteine zusammen mit der Information, in welcher der ausgeschnittenen Banden diese identifiziert wurden. Protein 1 (grün) wurde als *bait* verwendet. Proteine 2-10 (gelb) wurden nach Abgleich mit Haßdenteufel et al. (2017) als potenzielle membranständige Interaktionspartner identifiziert. 11-13 (blau) sind zum Translokation zählende Proteine. 14 (grau) ist ebenfalls in Haßdenteufel et al. (2017) identifiziert worden, allerdings ein zytosolisches Protein. Die Nummerierung der Liste dient rein der Orientierung.

Nr.	Identifizierte Proteine (110)	Accession Number	MW [kDa]	Identifiziert in Bande #
1	Transmembrane protein 208	TM208	20	4/6
2	Fatty aldehyde dehydrogenase	AL3A2	55	2/3
3	Receptor expression-enhancing protein 5	REEP5	21	6
4	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1	69	1
5	Translocon-associated protein subunit gamma	SSR4	21	5
6	Transmembrane protein 109	TM109	26	5
7	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	TMCO1	21	5
8	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	TMEDA	25	5
9	Transmembrane protein 33	TMM33	28	4
10	Protein YIPF5	YIPF5	28	3
11	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	SC11A	21	6
12	Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2	25	4
13	Translocon-associated protein subunit delta	SSRD	19	6
14	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	18	6
15	Actin, aortic smooth muscle	ACTA	42	1/2/3/4
16	Alpha-adducin	ADDA	81	2
17	Serum albumin	ALBU	69	1
18	Protein arginine N-methyltransferase 5	ANM5	73	1
19	ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 1	AR6P1	23	5
20	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	21	5
21	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	AT5F1	29	4
22	Atlastin-3	ATLA3	61	2
23	ATP synthase subunit a	ATP6	25	5
24	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA	60	2/3
25	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB	57	2/3
26	ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATPO	23	4
27	Beta-1,4-glucuronyltransferase 1	B4GA1	47	3
28	BAG family molecular chaperone regulator 2	BAG2	24	4
29	Basigin	BASI	42	2/3
30	Brain acid soluble protein 1	BASP1	23	3
31	BPI fold-containing family B member 4	BPIB4	65	1
32	BRI3-binding protein	BRI3B	28	5
33	Calmodulin-like protein 5	CALL5	16	1
34	Caspase-14	CASPE	28	4
35	CDP-diaclylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	CDIPT	24	5
36	Calcineurin B homologous protein	CHP1	22	4
37	Lanosterol 14-alpha demethylase	CP51A	57	2
38	Cystatin-A	CYTA	11	3
39	Dermcidin	DCD	11	1/2/3/4/5/6
40	Derlin-1	DERL1	29	4
41	Desmoplakin	DESP	332	1
42	Delta(24)-sterol reductase	DHC24	60	2
43	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1	261	1
44	Desmoglein-1	DSG1	114	1
45	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1	50	3
46	Elongation factor 1-gamma	EF1G	50	3
47	Alpha-enolase	ENOA	47	3
48	ER lumen protein-retaining receptor 1	ERD21	25	5
49	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3	ERGI3	43	3
50	Fatty acyl-CoA reductase 1	FACR1	59	2/3
51	FAS-associated factor 2	FAF2	53	3
52	Filaggrin	FILA	435	1
53	Filaggrin-2	FILA2	248	1
54	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P	36	1
55	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75	74	1
56	Histone H1.3	H13	22	5
57	Hornerin	HORN	282	1/4/5
58	Heat shock 70 protein 1A/1B	HSP71	70	1
59	Heat shock cognate 71 protein	HSP7C	71	1
60	Protein jagunal homolog 1	JAGN1	21	6

Nr.	Identifizierte Proteine (110)	Accession Number	MW [kDa]	Identifiziert in Bande #
61	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10	59	1/2/3/4/5/8
62	Keratin, type I cytoskeletal 13	K1C13	50	2
63	Keratin, type I cytoskeletal 14	K1C14	52	1/3/4/5
64	Keratin, type I cytoskeletal 16	K1C16	51	1/2/3/4/5
65	Keratin, type I cytoskeletal 17	K1C17	48	1
66	Keratin, type I cytoskeletal 9	K1C9	62	1/2/3/4/5/9
67	Keratin, type II cytoskeletal 2	K22E	65	1/2/3/4/5/7
68	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1	66	1/2/3/4/5/6
69	Keratin, type II cytoskeletal 1b	K2C1B	62	1
70	Keratin, type II cytoskeletal 5	K2C5	62	1/2/3/4/5/10
71	Keratin, type II cytoskeletal 6A	K2C6A	60	37653
72	Keratin, type II cytoskeletal 6B	K2C6B	60	3
73	Keratin, type II cytoskeletal 7	K2C7	51	1/2
74	Keratin, type II cytoskeletal 74	K2C74	58	1
75	Keratin, type II cytoskeletal 78	K2C78	57	1
76	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8	54	2
77	Chromosome-associated kinesin KIF4A	KIF4A	140	3
78	Lysozyme C	LYSC	17	1
79	Myosin regulatory light chain 12A	ML12A	20	5
80	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	NDUBA	21	4
81	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	PCAT1	59	2
82	Membrane-associated progesterone receptor component 2	PGRC2	24	5
83	Polymeric immunoglobulin receptor	PIGR	83	1
84	Prolactin-inducible protein	PIP	17	1
85	Junction plakoglobin	PLAK	82	1
86	PRA1 family protein 2	PRAF2	19	6
87	Proline-rich protein 4	PROL4	15	1
88	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	RL40	15	3
89	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	RO52	54	3
90	Reticulon-4	RTN4	130	2/3
91	Suprabasin	SBSN	61	1
92	Vesicle-trafficking protein SEC22b	SC22B	25	4
93	Protein Shroom3	SHRM3	217	2/3/5
94	S-phase kinase-associated protein 1	SKP1	19	5
95	Sterol O-acyltransferase 1	SOAT1	65	2/3
96	Serine palmitoyltransferase 1	SPTC1	53	3
97	Erythrocyte band 7 integral membrane protein	STOM	32	5
98	Surfeit locus protein 4	SURF4	30	4
99	Tubulin alpha-1A chain	TBA1A	50	2/3
100	Tubulin alpha-4A chain	TBA4A	50	2/3
101	Tubulin beta-4B chain	TBB4B	50	2
102	Tubulin beta chain	TBB5	50	2
103	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	TCP4	14	6
104	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3	77	3
105	Transmembrane protein 128	TM128	19	6
106	Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	TMED5	26	4
107	Trypsin-1	TRY1	27	2/3/4/6
108	Trypsin-3	TRY3	33	3/4/5/6
109	Ubiquitin-like protein 4A	UBL4A	18	6
110	Protein YIPF6	YIPF6	26	4

Tab. 16: Anhang zu den Ergebnissen in Kapitel 6.1.2. Vollständige Liste der identifizierten Proteine in der MS nach der Co-IP mit endogenem hSnd2 als *baitprotein*. Nr. 1 (grün), TMEM109 ist in allen MS als membranständiges Protein identifiziert worden. Nr. 2 (blau) ist ebenfalls in allen Co-IP's als zytosolisches Protein identifiziert worden. Orange markierte Felder stellen Proteine dar, die in Kontakt mit dem Sec61 α Protein stehen. Die Nummerierung der Liste dient der Orientierung.

Nr.	Identifizierte Proteine (75)	Accession Number	MW [kDa]	Exclusive Spectrum Count
1	Transmembrane protein 109	TM109	26	6
2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	18	10
3	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	BIP	72	8
4	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	RL40	15	4
5	14-3-3 protein theta	1433T	28	2
6	14-3-3 protein zeta/delta	1433Z	28	6
7	4F2 cell-surface antigen heavy chain	4F2	68	19
8	Alpha-2-macroglobulin	A2MG	163	1
9	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	A2ML1	161	3

Nr.	Identifizierte Proteine (75)	Accession Number	MW [kDa]	Exclusive Spectrum Count
10	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	42	22
11	Beta-actin-like protein 2	ACTBL	42	1
12	Actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC	42	4
13	Actin, cytoplasmic 2	ACTG	42	165
14	Alpha-actinin-1	ACTN1	103	1
15	Serum albumin	ALBU	69	51
16	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	39	5
17	Annexin A2	ANXA2	39	32
18	ASPC1	ASPC1	?	2
19	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60	61	7
20	Complement C4-A	CO4A	193	3
21	Cofilin-1	COF1	19	1
22	Elongation factor 1-alpha 1	EF1A1	50	23
23	Elongation factor 1-delta	EF1D	31	1
24	Elongation factor 2	EF2	95	1
25	Alpha-enolase	ENOA	47	41
26	Filamin-A	FLNA	281	28
27	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P	36	25
28	Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75	74	35
29	Glutathione S-transferase P	GSTP1	23	1
30	Hemoglobin subunit gamma-1	HBG1 (+1)	16	2
31	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK	51	6
32	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM	78	1
33	Histidine-rich glycoprotein	HRG	60	2
34	Heat shock 70 kDa protein 1A	HS71A	70	16
35	Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B	83	21
36	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71	37
37	Heat shock protein beta-1	HSPB1	23	3
38	Eukaryotic initiation factor 4A-I	IF4A1	46	4
39	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain	IGG1	49	30
40	Keratin, type I cytoskeletal 10	K1C10	59	33
41	Keratin, type I cytoskeletal 14	K1C14	52	2
42	K1C9	K1C9	?	1
43	Keratin, type I cytoskeletal 9	K1C9	62	20
44	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	K22E	65	8
45	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1	66	61
46	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 5	KCNH5	112	2
47	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PKM PE=1 SV=4	KPYM	58	38
48	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	37	11
49	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	37	3
50	Prelamin-A/C	LMNA	74	5
51	M4K1	M4K1	?	1
52	Moesin	MOES	68	2
53	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	24	3
54	PRC1	PRC1	?	1
55	Peroxioredoxin-1	PRDX1	22	4
56	Multifunctional protein ADE2	PUR6	47	2
57	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	RO52	54	1
58	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1	39	1
59	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2	37	2
60	Protein SET	SET	33	1
61	SHC1	SHC1	?	5
62	Carabin	TB10C	50	3
63	Tubulin alpha-1B chain	TBA1B	50	31
64	Tubulin beta-4B chain	TBB4B	50	1
65	Tubulin beta chain	TBB5	50	50
66	T-complex protein 1 subunit beta	TCPB	57	1
67	T-complex protein 1 subunit theta	TCPQ	60	1
68	Transketolase	TKT	68	2
69	TOPZ1	TOPZ1	?	1
70	Triosephosphate isomerase	TPIS	31	1
71	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	80	12
72	Serotransferrin	TRFE	77	13
73	Trypsin-1	TRY1	27	3
74	UN13B	UN13B	?	3
75	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	VAPA	28	1

Tab. 17: Auswertung der RTCA Ergebnisse, codiert in der Heatmap in Abb. 48. Dargestellt sind die zusammenfassenden Mittelwerte der einzelnen Experimente der RTCA-Experimente zusammen mit dem SEM und der Anzahl der durchgeführten Experimente. Bestimmt wurde die Steigung des Zellindices vom zwischen Applikationszeitpunkt der Substanz und Maximum bzw. Minimum des Kurvenverlaufs

	Behandlung	Konzentration	Wildtyp	V67G	T185A
H ₂ O als Lösemittel	H ₂ O		0.0275 ±0,0017 (12)	0.0193 ±0,0026 (11)	0.0177 ± 0,0008 (11)
	4-PBA	10 mM	-0.0004 ± 0,0002 (2)	-0.0006 ± 0,0001 (2)	-0.0005 ± 0,0001 (2)
		5 mM	0.0453 ± 0,0002 (2)	0.0342 ± 0,0023 (2)	0.0258 ± 0,0025 (2)
		1 mM	0.0627 ± 0,0054 (7)	0.0395 ± 0,0045 (9)	0.0237 ± 0,0026 (9)
		0,5 mM	0.0470 ± 0,003 (7)	0.0335 ± 0,0026 (5)	0.0239 ± 0,0010 (7)
		0,25 mM	0.0459 ± 0,0056 (5)	0.0309 ± 0,0012 (5)	0.0235 ± 0,0013 (5)
		Dithiothreitol (DTT)	1 mM	0.0137 ± 0,0003 (3)	0.0097 ± 0,0002 (3)
	0,1 mM		0.0360 ± 0,0038 (2)	0.0223 ± 0,0027 (2)	0.0190 ± 0,0003 (2)
	0,05 mM		0.0348 ± 0,0001 (2)	0.0224 ± 0,003 (3)	0.0188 ± 0,0013 (2)
	Puromycin (Puro)	500 µM	-0.0062 ± 0,0001 (3)	-0.0012 ± 0,0000 (3)	-0.0038 ± 0,001 (3)
		5 µM	-0.0025 (1)	-0.0028 ± 0,0003 (2)	-0.0025 ± 0,002 (2)
		1µM	0.0104 ± 0,0024 (2)	0.0034 ± 0,0008 (2)	0.0074 ± 0,0019 (2)
		0,1 µM	0.0237 ± 0,0029 (2)	-0.0149 ± 0,0015 (2)	0.0137 ± 0,0012 (2)

	Behandlung	Konzentration	Wildtyp	V67G	T185A
DMSO als Lösemittel	DMSO		0.0320 ± 0,0026 (9)	0.0272 ± 0,0033 (9)	0.0190 ± ,00007 (8)
	Eeyarestatin1 (ES1)	10 µM	-0.0372 ±0,0036 (3)	-0.0044 ± 0,0008 (3)	-0.0041 ± 0,0002 (3)
		1 µM	0.0208 ±0,0028 (4)	0.0358 ± 0,0076 (4)	0.0120 ± 0,0013 (4)
		0,5 µM	0.0336 ±0,0018 (2)	0.0243 ± 0,0001 (2)	0.0166 ± 0,0012 (2)
		0,1 µM	0.0453 ±0,0009 (2)	0.0425 ± 0,0007 (2)	0.0239 ± 0,0014 (2)
		0,05 µM	0.0320 ±0,0008 (2)	0.0292 ± 0,0033 (2)	0.0198 ± 0,0005 (2)
		Ellagsäure (EA)	10 µg/ml	0.0215 ±0,0042 (6)	0.0169 ± 0,0023 (6)
	5 µg/ml		0.0327 ±0,0082 (3)	0.0276 ± 0,0013 (4)	0.0137 ± 0,0020 (3)
	2,5 µg/ml		0.0336 ±0,0009 (2)	0.0253 ± 0,0041 (2)	0.0064 ± 0,0016 (2)
	Forskolin (FS)	50 µM	0.0564 ±0,001 (2)	0.0559 ± 0,0019 (2)	0.0142 ± 0,0013 (2)
		25 µM	0.0357 ±0,0088 (6)	0.0465 ± 0,0039 (5)	0.0189 ± 0,0011 (5)
		12,5 µM	0.0391 ±0,0014 (2)	0.0373 ± 0,0016 (2)	0.0179 ± 0,0000 (2)
	Tunicamycin (Tuni)	10 µg/ml	-0.0104 ±0,0005 (3)	-0.0049 ± 0,0003 (3)	-0.0063 ± 0,0001 (3)
		1 µg/ml	-0.0117 ±0,0005 (2)	-0.0092 ± 0,0036 (2)	-0.0046 ± 0,0015 (2)
		0,5 µg/ml	-0.0103 ±0,0003 (2)	-0.0117 ± 0,0007 (2)	0.0046 ± 0,0019 (2)
		0,1 µg/ml	0.0164 ±0,003 (2)	-0.0168 ± 0,0006 (2)	0.0148 ± 0,0004 (2)

	Behandlung	Konzentration	Wildtyp	V67G	T185A
	Tudca	200 μ M	0.0281 $\pm 0,0016$ (4)	0.0257 $\pm 0,0015$ (4)	0.0157 $\pm 0,0013$ (4)
		100 μ M	0.0450 $\pm 0,0024$ (4)	0.0386 $\pm 0,0024$ (4)	0.0194 $\pm 0,0011$ (4)
		50 μ M	0.0291 $\pm 0,0012$ (4)	0.0268 $\pm 0,0025$ (4)	0.0211 $\pm 0,0011$ (4)
	Thapsigargin (TG)	1 μ M	-0.0094 $\pm 0,0001$ (3)	-0.0026 $\pm 0,0001$ (3)	-0.0044 $\pm 0,0000$ (3)
		0,1 μ M	-0.0078 $\pm 0,0001$ (2)	-0.0090 $\pm 0,0005$ (2)	-0.0035 $\pm 0,0004$ (2)
		0,05 μ M	-0.0099 $\pm 0,0005$ (2)	-0.0113 $\pm 0,0009$ (2)	-0.0031 $\pm 0,0007$ (2)
	Oligomycin (Oligo)	10 μ M	-0.0068 $\pm 0,0003$ (3)	-0.0081 $\pm 0,0004$ (3)	-0.0065 $\pm 0,0002$ (3)
		5 μ M	-0.0013 $\pm 0,0003$ (2)	-0.0029 $\pm 0,0004$ (2)	0.0011 $\pm 0,0012$ (2)
		1 μ M	0.0004 $\pm 0,0003$ (2)	-0.0052 $\pm 0,0008$ (2)	0.0013 $\pm 0,0012$ (2)

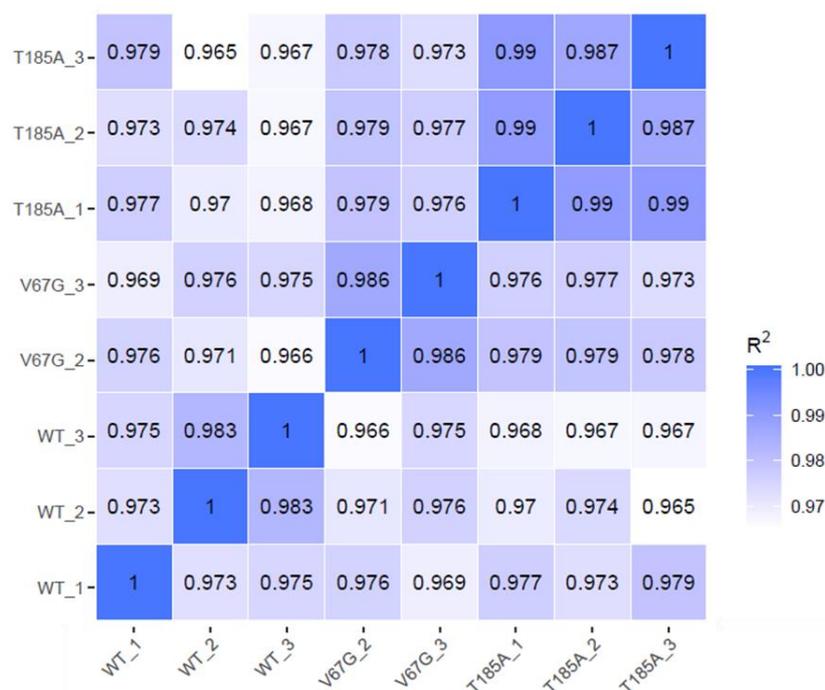


Abb. 65: Globale mRNA Analyse der drei ADTKD assoziierten HeK Zelllinien. Diese wurden in doppelter, bzw. dreifacher Form analysiert durch die Firma Novogen, die ebenfalls die Analyse und die Abbildung zur Verfügung gestellt haben. Dargestellt ist die Übereinstimmung zwischen zwei analysierten Proben, die bei dem R^2 Wert von 1 absolut identisch ist.

15. Lebenslauf

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